

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 885**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2006 PCT/JP2006/306043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2006 WO06098523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2006 E 06729991 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 1860437**

54 Título: **Método para evaluar una enfermedad de la piel utilizando un antígeno relacionado con el carcinoma de células escamosas como medida**

30 Prioridad:

18.03.2005 JP 2005080533

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

23.12.2016

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LIMITED (100.0%)
5-5, GINZA 7-CHOME
CHUO-KU, TOKYO 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**KATAGIRI, CHIKA;
HIBINO, TOSHIHIKO y
NAKANISHI, JOTARO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 594 885 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar una enfermedad de la piel utilizando un antígeno relacionado con el carcinoma de células escamosas como medida

Campo técnico

- 5 La presente invención proporciona un método para evaluar la enfermedad de la piel usando el antígeno celular del carcinoma de células escamosas (en adelante abreviado como "SCCA") como marcador.

Estado de la técnica

10 La cornificación normal de la piel causa un fenómeno conocido como "desnucleación", por el cual los núcleos de los queratinocitos desaparecen. Los queratinocitos epidérmicos proliferan en las capas basales, y migran a las capas superiores donde maduran en el estrato córneo. Sin embargo, en la piel áspera que no ha sufrido cornificación normal, como resultado de enfermedades de la piel tales como psoriasis o dermatitis atópica, los núcleos de las células cornificadas permanece en un estado no digerido, con lo que las células cornificadas se encuentran en el estrato córneo en un estado inmaduro en el que los núcleos se conservan. Esta enfermedad se conoce como "paraqueratosis". Aunque el fenómeno de la paraqueratosis se conoce desde hace tiempo, el mecanismo por el cual se produce la paraqueratosis, y los marcadores bioquímicos para la misma, son desconocidos.

15 El antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA), un antígeno extraído de las células de carcinoma escamoso, se encuentra en altas concentraciones en la sangre de los pacientes que sufren el carcinoma de células escamosas del cuello uterino, pulmones, esófago o la piel, y se utiliza comúnmente para el diagnóstico del carcinoma de células escamosas (Kato H. et al Cancer 40: 1621-1628 (1977); Mino N. et al Cancer. 62: 730-734 (1988)). En particular, el nivel en sangre de SCCA se correlaciona positivamente con el estado de progresión del carcinoma de células escamosas, la malignidad y el tamaño del tumor, y es un marcador de cáncer especialmente eficaz no sólo para la detección precoz del cáncer, sino también para evaluar los efectos del tratamiento y el diagnóstico del riesgo de recurrencia.

20 Se sabe que SCCA también que se sobreexpresa en la capa superior de la epidermis psoriásica (Takeda A. et al, J. Invest. Dermatol. 118 (1): 147-154 (2002)). La psoriasis es un tipo de enfermedad de la piel que puede adoptar la forma de una paraqueratosis inflamatoria crónica y recurrente caracterizada por la proliferación anormal y la diferenciación de las células epidérmicas y la infiltración de células inflamatorias. El inicio de la psoriasis se atribuye a factores genéticos y a diversos factores ambientales (Hopsu-Havu et al British Journal of Dermatology 109: 77-85 (1983)).

30 Hay dos tipos de genes, es decir, SCCA-1 y SCCA-2, situado en tándem en el cromosoma 18q21.3 que codifica para SCCA. Las proteínas SCCA-1 y SCCA-2 codificadas por estos genes tienen un peso molecular de aproximadamente 45.000, y muestran alta homología del 95% a nivel de ácido nucleico. Las proteínas SCCA pertenecen a la familia del inhibidor de la proteasa de serina-ovoalbúmina (ov-serpina). La familia de la ov-serpina tiene características únicas dentro de la superfamilia de las serpinas. Las serpinas generalmente se secretan y actúan extracelularmente, pero las ov-serpinas son inhibidores de la proteasa que actúan principalmente de forma intracelular.

40 El SCCA-1 es un inhibidor de cisteín proteasas de tipo papaína mientras que el SCCA-2 es un inhibidor de serin proteasas de tipo quimotripsina, y a pesar de su alta homología, las diferencias en la secuencia de aminoácidos del sitio reactivo son las responsables de producir un comportamiento diferente (Schick et al J. Biol. Chem. 272 (3): 1849-55 (1997)). Se conoce que SCCA-1 y SCCA-2 se expresan mucho en enfermedades tales como la psoriasis o por la irradiación con UV, pero su asociación con enfermedades de la piel no se ha dilucidado.

45 A modo de ejemplo, la patente internacional WO02/44736 proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad como el eczema o la psoriasis que comprende detectar la presencia, ausencia o un nivel modulado de un inhibidor de proteasa como el SCCA o SCCA2. Más específicamente, este documento describe la regulación a la baja de la expresión de SCCA o SCCA2 en pacientes con eczema, midiéndose esta expresión a partir de una biopsia de punción o muestras de sangre.

Descripción de la invención

50 Como resultado de la investigación dirigida a elucidar el mecanismo fisiológico de SCCA en la epidermis, los presentes inventores han descubierto que la expresión de SCCA se promueve específicamente en la piel paraqueratósica tal como la psoriasis, y que SCCA es un factor implicado en enfermedades de piel áspera, incluyendo la paraqueratosis. Por tanto, se conjetura que la expresión de SCCA puede servir como un marcador para estas enfermedades de la piel, y la invención por lo tanto se ha completado.

55 La presente invención proporciona un método para evaluar la susceptibilidad de una piel a una enfermedad de la piel la piel seleccionada entre el grupo que consiste en: dermatitis atópica y rugosidad de la piel causado por la hipersensibilidad al polen, caracterizado porque se utiliza como marcador la promoción de la expresión del antígeno

del carcinoma de células escamosas (SCCA) en las células del estrato córneo de la piel. La expresión de SCCA se mide preferiblemente mediante un ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) usando anticuerpos específicos para SCCA, la muestra de estrato córneo de la piel se obtiene mediante cinta adhesiva.

5 El método de la invención permite evaluar enfermedades de la piel tales como la rugosidad y la paraqueratosis a nivel bioquímico. Las enfermedades de la piel que se evalúan con el método de la invención pueden incluir diversos tipos de enfermedades, incluyendo la rugosidad, el envejecimiento de la piel debido a la exposición a la irradiación ultravioleta, por ejemplo, y la sequedad de la piel debida a la reducida capacidad de retención de humedad de la piel por la pérdida de la función barrera de la piel, la paraqueratosis causada por la psoriasis o la dermatitis atópica, y la rugosidad de la piel causada por la hipersensibilidad de polen.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig.1 muestra el análisis de electrotransferencia de Western de un extracto de piel. Se utilizó el anticuerpo H-99 y el anticuerpo h14D¹⁹⁶ para el análisis de inmunotransferencia de zimógeno y de caspasa-14 activa. Se utilizaron 10 µg (carriles 1, 2 y 4) y 1 µg (carril 3) de extracto total de la piel, extracto de piel equivalente y el extracto de queratinocitos.

15 La Fig. 2 muestra el análisis de caspasa-14 purificada. (A) Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la fracción n° 25 obtenida de la cromatografía de Superdex 75 se aplicó a una membrana de PVDF y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie. Se observaron dos bandas de proteína de 17 kDa y 11 kDa. (B) Análisis de electrotransferencia de Western utilizando H-99, h14D¹⁴⁶ y el anticuerpo C20. La banda de 17 kDa resultó positiva para ambos anticuerpos H99 y h14D¹⁴⁶, mientras que la banda de 11 kDa fue reconocida por el anticuerpo C20. M: Marcador; 1: Superdex 75 N° 25; 2: Superdex 75 N° 26-27, comc.

20 La Fig. 3 muestra el efecto de diversos inhibidores de síntesis en la caspasa-14 purificada. Actualmente, se conocen 15 tipos de caspasas humanas, solamente la caspasa-14 se incubó junto con varios péptidos inhibidores de caspasas (YVAD, VDVA, DEVD, VEID, IETD, LEHD, DNLD), inhibidores específicos de la clase de cisteín proteasas (IAA) o serin proteasas (AEBSF). Se utilizó WEHD-MCA como sustrato en presencia de 1,3 M de citrato de sodio y DTT 5 mM, y se midió la actividad de la enzima residual. Las concentraciones de las enzimas ensayadas fueron 5, 2,5 y 1,25 µM. Los valores se representan como valores promedio de múltiples ensayos.

25 La Fig. 4 (A) muestra la actividad de escisión de la caspasa-14 purificada para el ICAD. (B) muestra el análisis de electrotransferencia Western utilizando el anticuerpo FL331. Se identificaron los productos de escisión de 33 kDa y 27 kDa. La incubación con 10µM de SCCA-1 inhibió completamente la escisión de ICAD. La descomposición de ICAD se observó sólo en presencia de una sal cosmotrópica. El análisis de electrotransferencia de Western usando un anticuerpo específico-amino terminal reveló la desaparición de moléculas ICAD intactas durante la incubación prolongada con la caspasa-14. La adición de SCCA-1 a la mezcla dio lugar a la inhibición de la descomposición de ICAD, y no se detectó ningún cambio incluso después de 16 horas de incubación (B). (C) muestra los resultados del examen de la actividad hidrolítica en un sustrato de caspasa sintética, en presencia de una sal cosmotrópica.

35 La Fig. 5 muestra la localización de la caspasa-14 activa y de las células TUNEL positivas. Las secciones finas de la piel humana normal se tiñeron con el anticuerpo H-99 (A), el anticuerpo h14D¹⁴⁶ (B) o TUNEL (C). Para la detección de fluorescencia se utilizó Texas-Red (B). Se utilizó FITC para TUNEL, se usó Texas Red para la inmunotinción y se llevó a cabo una doble tinción para TUNEL y la caspasa. (D) muestra una imagen superpuesta, y (E) muestra el campo claro.

40 La Fig. 6 muestra la co-localización de ICAD y de los núcleos de paraqueratosis en la superficie de la piel. Las secciones finas de la piel humana normal se tiñeron con el anticuerpo FL331 anti-ICAD. Casi la totalidad de los núcleos de la epidermis inferior resultaron positivos para el anticuerpo. El ICAD en la capa superficial de los queratinocitos de la piel del paciente AD se tiñó con este anticuerpo, y se observaron sitios positivos con diferentes tamaños (B). Se observó con frecuencia la tinción nuclear con yoduro de propidio (PI), lo que indica agrupaciones nucleares (C). La observación del campo claro de los mismos sitios indica escalas superpuestas sobre la superficie (D). La imagen superpuesta reveló la presencia de ICAD solamente en los sitios de paraqueratosis (E). También se observaron imágenes superpuestas de tinción nuclear en el campo claro (F).

45 La Fig. 7 muestra la co-localización de SCCA-1 y los núcleos paraqueratósicos. No se detectó prácticamente SCCA-1 en la superficie normal de la piel. Se observaron sitios positivos para SCCA-1 en la capa superficial de la piel del paciente AD (H). Sólo se encontraron grupos nucleares en estos sitios (I). El campo claro se muestra en (J). La imagen superpuesta indica el solapamiento de los sitios positivos para SCCA-1, preferiblemente con sitios que contienen núcleos sin digerir (K). Se muestran imágenes superpuestas separadas correspondientes a la tinción de SCCA-1 y al campo luminoso (L).

50 La Fig. 8 muestra los resultados de examen inmunohistoquímico, lo que indica la expresión de SCCA en la epidermis en las zonas expuestas y no expuestas.

55 La Fig. 9 muestra los resultados del examen inmunohistoquímico que muestra la expresión de SCCA en la piel normal y en la piel psoriásica.

La Fig. 10 muestra los resultados de la medición de SCCA en el estrato córneo de la piel normal mediante ELISA.

La Fig. 11 muestra los resultados comparativos para la medición de la SCCA en la piel normal y en el estrato córneo de la piel psoriásica mediante ELISA.

5 La Fig. 12 muestra los resultados comparativos para la medición de la SCCA en la piel normal y en el estrato córneo de la piel dermatitis atópica mediante ELISA.

La Fig.13 muestra la correlación entre la cantidad de SCCA y de TEWL en la piel normal.

La Fig.14 muestra la correlación entre la rugosidad y la cantidad SCCA-1 de la piel hipersensible al polen.

La Fig. 15 muestra la correlación entre la rugosidad y los niveles de expresión de SCCA-1 en la piel hipersensible al polen.

10 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

Como se mencionó anteriormente, SCCA es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 45.000, cuya expresión se acelera en la psoriasis o en la piel irradiada con UV. Las secuencias de aminoácidos de SCCA-1 y SCCA-2 y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican se enumeran en Takeda A et al. J. Invest. Dermatol. 118, 147-154 (2002) (ibid).

15 La expresión de SCCA se puede medir de acuerdo con la presente invención cuantitativa o cualitativamente, por cualquier método deseado capaz de medir SCCA. En concreto se pueden citar métodos de inmunoensayo que utilizan anticuerpos específicos de SCCA, tales como ELISA utilizando un marcador de enzimático, RIA usando un marcador radiactivo, inmunoturbidimetría, métodos de electrotransferencia de Western, métodos de aglutinación de látex, métodos de hemaglutinación, y similares. También pueden mencionarse métodos de inmunoensayo, tales
20 como ensayos competitivos y de tipo sándwich. Además, la expresión SCCA se puede medir basándose en el nivel de expresión intracelular del gen que codifica para ella. En este caso, la expresión de SCCA se determina preferiblemente midiendo el nivel intracelular de ARNm que codifica para SCCA. La extracción de ARNm y la detección cuantitativa o cualitativa pueden llevarse a cabo por métodos conocidos en el campo, tales como PCR, 3SR, NASBA y TMA. La expresión de SCCA también se puede determinar cualitativamente mediante hibridación in
25 situ o mediante métodos de medición de su bioactividad.

La muestra de la capa córnea de la piel que se utiliza como una muestra puede ser obtenida por cualquier método deseado, pero se prefiere su obtención por medio de cinta adhesiva desde el punto de vista de conveniencia. La obtención con cinta adhesiva es un método en el que una tira de cinta adhesiva se aplica a la superficie de la piel y se despega para fijar una porción de la capa córnea de la piel a la cinta adhesiva despegada para su uso como
30 muestra de la capa córnea. El uso del método de obtención por medio de cinta adhesiva permite la medición de la expresión de SCCA en el estrato córneo usando un solo trozo de cinta, como un método no invasivo de evaluar la rugosidad o paraqueratosis basado en SCCA como el marcador. Un método de obtención por medio de cinta adhesivo preferido es uno en el que la superficie de la piel se limpia primero con etanol o similar para eliminar el sebo y la suciedad, se coloca una tira de cinta adhesiva cortada a un tamaño adecuado (por ejemplo, 2 x 5 cm)
35 suavemente sobre la superficie de la piel y se aplica una fuerza por igual sobre toda la cinta para aplanarlo, después de lo cual la cinta adhesiva se despega con una fuerza uniforme. La cinta adhesiva puede ser cinta de celofán disponible comercialmente, y, por ejemplo, puede ser Scotch Superstrength Mailing Tape (3M), cinta de celofán (CelloTape™, Nichiban Co., Ltd.) o similares. El SCCA en la muestra de estrato córneo de la piel unida a la cinta adhesiva se puede aislar y extraer de la cinta mediante la inmersión de la tira de cinta en una disolución de extracción apropiada, tal como un tampón Tris (pH 8,0) (0,1 M Tris-HCl, 0,14 M NaCl, 0,1% de Tween-20) para la extracción de la capa córnea.
40

Según un modo preferido de la invención, el SCCA se analizó mediante un método de inmunoensayo tal como ELISA. El anticuerpo específico de SCCA utilizado para ELISA puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Lunstrum et al., J Biol. Chem., 261: 9042-9048 (1986) y Hurle et al. J Cell
45 Science, 107: 2623-2634 (1994).

Se prefiere especialmente un inmunoensayo de tipo sándwich como el método para la invención. El método de inmunoensayo de tipo sándwich se lleva a cabo de la siguiente manera, por ejemplo.

50 Uno de los dos anticuerpos específicos para SCCA se inmoviliza sobre un soporte como el anticuerpo primario. El soporte es preferiblemente un soporte sólido, y por ejemplo, el soporte sólido puede ser cualquiera utilizado ordinariamente para métodos de inmunoensayo, tales como un soporte polimérico hecho de estireno o poliestireno realizado con la forma y el tamaño deseados, o un reactor realizado con los materiales apropiados, tales como las paredes internas de los pocillos de una placa de ELISA, pueden mencionarse como un ejemplo.

55 La inmovilización del anticuerpo primario en el soporte puede realizarse por cualquier método ordinario, y, por ejemplo, el anticuerpo primario se puede inmovilizar mediante disolución en una disolución tampón, tal como una

disolución salina tamponada con fosfato (PBS), un tampón de borato o similares para la adsorción sobre el soporte. Además, un anticuerpo u otra proteína que se una al anticuerpo primario, como la proteína C, por ejemplo, se puede inmovilizar primero sobre un soporte y contactar después con el anticuerpo primario. Con el fin de inhibir la unión no específica, el soporte que inmoviliza los anticuerpos primarios se bloquea preferiblemente con un agente de bloqueo, por ejemplo mediante la adición de PBS-BSA o un agente de bloqueo comercialmente disponible tal como BLOCKACE (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), con incubación a aproximadamente 4 - 40° C y preferiblemente 20 - 37° C durante un período de 5 minutos a varios días, preferiblemente de 10 minutos a 24 horas y más preferiblemente de 10 minutos a 3 horas.

El otro anticuerpo de los dos anticuerpos específicos para los SCCA diferentes se etiqueta para su uso como anticuerpo secundario. El marcaje puede ser marcaje enzimático, marcaje radioactivo, marcaje fluorescente o similar. Para el marcaje enzimático, el marcador enzimático puede estar unido directamente al anticuerpo secundario, o el anticuerpo se puede marcarse indirectamente con la enzima mediante un par de proteínas interactivas tales como avidina-biotina. La unión de la enzima al anticuerpo también se puede conseguir, por ejemplo, mediante el uso de un reactivo que introduce grupos tiol disponible comercialmente para introducir grupos tiol en la enzima y en el anticuerpo se se va a marcar, y posteriormente formar enlaces S-S entre ellos. La enzima usada puede ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa o similares. La enzima se puede detectar usando un sustrato específico para la enzima. Por ejemplo, se pueden utilizar TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) o ABTS (2,2'-azina-di [sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]) para la peroxidasa de rábano picante.

El inmunoensayo se lleva a cabo mediante mezclando el soporte que inmoviliza el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario marcado y la muestra de ensayo e incubando la mezcla, para la unión de los SCCA de la muestra de ensayo con el anticuerpo primario inmovilizado sobre el soporte, y la unión del anticuerpo secundario marcado con las moléculas de SCCA.

Por lo tanto, el anticuerpo marcado queda inmovilizado en el soporte mediante de los SCCA de la muestra y el anticuerpo primario inmovilizado sobre el soporte, en una cantidad que refleja la cantidad de SCCA en la muestra. La incubación se lleva a cabo en una disolución tampón apropiada, tal como PBS a aproximadamente 4 - 40° C y preferiblemente 20 - 37° C, durante un período de 5 minutos a varios días, preferiblemente de 10 minutos a 24 horas y más preferiblemente de 10 minutos a 3 horas.

Posteriormente el anticuerpo marcado que no se ha unido se separa del soporte. Cuando el soporte es un vehículo sólido, el procedimiento de separación puede llevarse a cabo de una manera sencilla mediante separación sólido-líquido. Cuando se utiliza una cantidad conocida de anticuerpo secundario marcado, es posible medir ya sea el marcaje unido a soporte o el marcaje no unido, o ambos. Cuando se utiliza una cantidad variable de anticuerpo marcado, se detecta y se mide la cantidad de marcaje unido a vehículo. La detección del marcaje unido a soporte se realiza preferiblemente por lavado del soporte con una disolución de lavado tal como una disolución tampón que contenga un agente tensioactivo adecuado (por ejemplo, PBS-Tween 20) para eliminar el anticuerpo marcado no unido. La detección puede llevarse a cabo por un método ordinario, en función del tipo del marcaje.

A continuación se proporcionan ejemplos concretos para una explicación más detallada de la invención. Sin embargo, la invención no está en modo alguno limitada por los ejemplos.

Ejemplos

1. Elucidación de la relación entre SCCA y paraqueratosis

40 Materiales y métodos

Materiales

Se adquirieron Ac-WEHD-MCA, Ac-YVAD-MCA, Ac-VDVAD-MCA, Ac-DEVD-MCA, Ac-VIED-MCA, Ac-IETD-MCA y Ac-LEHD-MCA del Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japón).

Se adquirieron benciloxicarbonilo (Z) -YVAD-FMK, Z-VDVSD-FMK, Z-DEVD-FMK, Z-VEID-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK y Z-VAD-FMK de Biovision (Mountain View, CA). Se obtuvieron caspasas recombinantes 1-10 de Biomol Research Labs, Inc. (Plymouth Meeting, PA).

La proforma y subunidad grande de la caspasa-14 se detectaron utilizando el anticuerpo H-99 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). El anticuerpo H-99 es un anticuerpo producido en respuesta a un péptido correspondiente a los aminoácidos 24-122 de la caspasa-14 humana, y por lo tanto, reacciona con la proenzima caspasa-14 y su forma procesada (la subunidad grande).

La subunidad pequeña de la caspasa-14 se detectó usando anticuerpo C-20 (Santa Cruz). Se preparó el anticuerpo específico del sitio de escisión (h14D¹⁴⁶) mediante la inmunización de conejos con el pentapéptido sintético TVGGD correspondiente al sitio de procesamiento putativo de la caspasa-14 humana.

Ensayo de la actividad hidrolítica de WEHD-MCA

La actividad de la caspasa-14 se ensayó mediante el método descrito en J. Mikolajczyk et al., *Biochemistry* 43, 10560-9 (2004), con algunas modificaciones, utilizando Ac-WEHD-MCA como sustrato. Brevemente, se preparó una mezcla de ensayo a partir de 45 μ L de disolución tampón de HEPES 0,1 M (pH 7,5), NaCl 0,06 M, 0,01% CHAPS, DTT 5 mM, citrato de sodio 1,3 M y WEHD-MCA 10 M (todas las concentraciones finales). Después de la adición de la muestra de la enzima (5 μ L) a la mezcla, se incubó durante 10-30 minutos. La reacción se suspendió mediante la adición de 150 μ L de 0,1 M de ácido monocloroacético, y se utilizó Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Co., Wolsam, MA) para la medición con una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda luminosa 460 nm. Para el ensayo del inhibidor, la caspasa-14 y el péptido inhibidor se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en el tampón de ensayo, y se añadieron 5 μ L de WEHD-MCA 100 M para empezar el ensayo.

Purificación de la caspasa-14

Células humanas cornificadas (aproximadamente 14 g) raspadas de talón humano sano se extrajeron con Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 0,14 M, usando un homogeneizador de vidrio. Después de centrifugar a 15.000 g durante 60 minutos, se recogió el sobrenadante. Se concentró con Amicon Ultra (Millipore, MA) y se desaló con una columna Fast de desalación HR10 / 10 (Amersham Biosciences), y luego se aplicó el producto en bruto sobre una columna HiPrep 16/10 Q XL. La columna se limpió con Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 - 1 M. La fracción fue rastreada por electrotransferencia de Western utilizando el anticuerpo de la caspasa-14 (H-99) (Santa Cruz Biotechnology, CA) y el anticuerpo h14D¹⁴⁶. Cada fracción se sometió a ensayo de actividad hidrolítica en Ac-Tyr-Glu-His-Asp-metil-coumarinamida (WEHD-MCA) (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japón). La fracción positiva se aplicó a una columna Mono Q equilibrada con la misma disolución tampón, y se eluyó con un gradiente de NaCl de hasta 1 M. La fracción de la caspasa-14 se separó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico positiva Mono S. La columna se equilibró con tampón de ácido acético 20 mM (pH 4,5) y se eluyó con un gradiente de NaCl 0 - 1 M. La fracción positiva se concentró y se aplicó a una columna de cromatofoco Mono P equilibrada con etanolamina 25 mM (pH 8,3). A continuación, se llevó a cabo la elución mientras se forma un gradiente de pH de pH 8 a 5 usando 46 ml de Polybuffer (pH 5,0). La caspasa-14 se sometió a una purificación final usando cromatografía en gel Superdex 75. La concentración de proteína se determinó usando un Kit de ensayo de proteínas de BioRad (BioRad Lab, Hercules, CA).

Preparación de la caspasa-14 recombinante y SCCA-1

En primer lugar, el ADNc que codifica para la caspasa-14 se aisló y se amplificó a partir de cDNA de queratinocitos mediante PCR usando el cebador directo: AAGGATCCAATCCGCGGTCTTTGGAAGAGGAG (SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso: TTTCTGCAGGTTGCAGATACAGCCGTTTCCGGAGGGTGC (SEQ ID NO: 2). El producto de PCR se clonó en un vector pQE-100 DoubleTag (Qiagen, Valencia, CA) y se expresó en *E. coli* JM109.

El ADNc de SSCA1 fue separado de una biblioteca de ADNc de psoriasis (Takeda A. et al, *J. Invest Dermatol*, 118:147-54 (2002)) y se clonó en un vector pQE30 (Qiagen). La proteína recombinante se purificó con agarosa Ni-NTA (Qiagen) y cromatografía Mono Q.

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron especímenes de cuero cabelludo humano mediante cirugía plástica con el consentimiento del paciente. El tejido se fijó con paraformaldehído al 4% (PFA) en tampón fosfato (pH 7,4) y se embebió en parafina. Se prepararon secciones finas y se incubaron durante la noche a 4° C con el anticuerpo apropiado. Se utilizó IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (Nichirei Biosciences) como anticuerpo secundario para la reacción con DAB como el reactivo colorante.

Para la inmunodetección doble de las células TUNEL-positivas y de la caspasa activa, se utilizó Texas Red™ conjugado con IgG anti-conejo (burro) como anticuerpo secundario. La reacción TUNEL se realizó utilizando una Kit de Detección de Muerte Celular *in situ* de Fluoresceína (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de electrotransferencia de Western y el análisis inmunohistoquímico de ICAD, se utilizaron IgG anti-ICAD (FL331, Santa Cruz Biotechnology) y DFF45 / ICAD Ab-2 (NeoMarkers, Fremont, CA).

Se ha reportado con frecuencia la observación de paraqueratosis en clúster en la piel de pacientes con dermatitis atópica activa (DA) (Sakurai K. et al, *J. Dermatol Sci*. 30: 37-42 (2002); Piloto Valdes L. et al., *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 18: 321-4 (1990)). En este experimento, se examinó la localización de ICAD y de SCCA-1 en la piel paraqueratósica utilizando un método no invasivo. Se separó la capa córnea superficial de AD o de la piel sana, y se utilizó el adhesivo médico Aron Alpha A (Sankyo Co., Tokio) para adherirlo al portaobjetos de vidrio. Después de fijarla con paraformaldehído al 3%, la muestra se impregnó con 0,1% Triton X-100 y se puso en contacto durante una noche con anticuerpos anti-ICAD o anti-SCCA-1 para inmunotinción a 4° C. Se utilizaron Ig anti-conejo (ICAD) o anti-IgG de ratón (SCCA-1) conjugados con Alexa Fluor 400 como anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 1 hora. Para la visualización de los núcleos, la muestra se sumergió durante 5

minutos en una disolución de yoduro de piridinio al 0,1% y se lavó 3 veces con PBS. Se utilizó un microscopio Leica DMLA para observar la fluorescencia.

Análisis de electrotransferencia de Western

5 La proteína se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS con un gel de gradiente de 5-20%. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) y se incubó junto con anticuerpo anti-caspasa-14 incluyendo H-99, h14D¹⁴⁶ o C20. Se utilizó IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (Sigma) o IgG anti-cabra como anticuerpos secundarios y se utilizó ECL-Plus (Amersham) como proteína inmunorreactiva para la visualización por quimioluminiscencia.

Resultados

10 La caspasa-14 de los queratinocitos se procesa en Asp¹⁴⁶

15 En el análisis de electrotransferencia de Western, el anticuerpo H-99 se detectó solamente en una banda de 17 kDa en el extracto de queratinocitos (Fig. 2). Este resultado no coincide con el resultado para el extracto derivado de piel completa o de los modelos equivalentes a la piel que incluyen la forma de 30 kDa sin procesar. La banda de 17 kDa también es reconocida por el anticuerpo h14D¹⁴⁶ (Fig. 2B), y por lo tanto se conjeturó que se trata de la subunidad grande de la caspasa-14 activa (p17). Esto sugiere que la maduración de la caspasa-14 se logra mediante la escisión en Asp¹⁴⁶ en la etapa final de la diferenciación terminal. La banda de 30 kDa también es reconocida por los anticuerpos H-99 y h14D¹⁴⁶ en los modelos equivalentes a la piel, lo que sugiere la escisión en Asp¹⁴⁶.

Preparación de la caspasa-14 a partir de extracto de queratinocitos

20 Como se presume que la mayor parte de la caspasa-14 en los queratinocitos está presente en la forma procesada, y por lo tanto en la forma activa, (Eckhart L. et al, J. Invest. Dermatol. 115: 1148-51 (2000); Lippens S. et al, Cell Death Differ. 7: 1218-24 (2000); Mikolajczyk, J. y otros, Biochemistry 43: 10560-9 (2004)), se cree que los queratinocitos humanos son una excelente fuente de la caspasa-14 purificada. Sin embargo, también se sabe que los queratinocitos humanos contienen una enzima similar a la caspasa-1 (Takahashi T., J. Invest Dermatol 111: 367-72 (1998)). Los sustratos de la caspasa-1, tales como el sustrato WEHD, pueden ser hidrolizados tanto por la caspasa-1 y como por la caspasa-14. Los presentes inventores ensayaron primero la hidrólisis de WEHD-MCA por la caspasa-1 con citrato de sodio 1,3 M y en presencia o ausencia de ditioneitol 5 mM. Se confirmó que aunque WEHD-MCA es un excelente sustrato para la caspasa-1 en tampón de ensayo de caspasa, la caspasa-1 no puede hidrolizar este sustrato en presencia de un ion cosmótrópico (datos no mostrados). Por tanto, cada fracción se evaluó mediante tres métodos diferentes, concretamente, actividad hidrolítica para WEHD-MCA, reactividad para H-99 y reactividad para el anticuerpo h14D¹⁴⁶. La tabla 1 muestra los resultados de la cromatografía continua. Después de la primera cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna HiPrep Q, el rendimiento mostró un aumento de 170% y la actividad específica se incrementó en aproximadamente 10 veces. Este incremento se debe probablemente al aislamiento de la caspasa-14 a partir de inhibidor endógeno. De acuerdo con el análisis de electrotransferencia de Western, las fracciones nº 16-20 contenían bandas positivas de H-99 y de 14D¹⁴⁶ de peso molecular de 17 kDa. Se encontró también que estas fracciones tienen actividad hidrolítica WEHD-MCA. En la cromatografía de intercambio aniónico Mono Q posterior, se encontró que las fracciones nº 25-nº 29 contenían la caspasa-14 en la forma procesada, en base a la presencia de bandas positivas de 17 kDa de H-99 y de h14D¹⁴⁶. Sólo estas fracciones mostraron actividad hidrolítica WEHD-MCA. La cromatografía Mono S aniónica y Mono P de cromato enfoque fueron eficaces para retirar la proteína contaminante, y la actividad específica se incrementó 3,5 veces y 7 veces, respectivamente. En este caso también, sólo las fracciones positivas de H-99- y positivas de h14D¹⁴⁶ exhibían actividad hidrolítica WEHD-MCA. La etapa final con cromatografía Superdex 75 separa un pico de 30 kDa de peso molecular que se correspondía con el pico de actividad hidrolítica WEHD-MCA. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida demostró que la preparación contenía fragmentos de 17 kDa y de 11 kDa. El primero fue positivo para ambos anticuerpos H-99 y h14D¹⁴⁶ anticuerpos, mientras que el último fue reconocido por el anticuerpo C20. Esto sugirió que la caspasa-14 humana se purificaba como un heterodímero que comprende una subunidad grande (17 kDa) y una subunidad pequeña (11 kDa). Además, la cromatografía de gel Superdex 75 demostró que, a diferencia de otras caspasas, la caspasa-14 existe en los queratinocitos humanos como un monómero similar a la forma granzima B-activada. La Tabla 1 muestra un resumen de los rendimientos de purificación de la caspasa-14. A partir de aproximadamente 100 mg de extracto de proteína soluble se obtuvieron 11,8 g de proteína purificada. La actividad específica aumentó 764 veces, y el rendimiento fue del 9,1%.

Purificación de la caspasa-14

	Concentración de proteína	Volúmenes	Peso de proteína total	Actividad enzimática (AFU)	Actividad específica (mU/mg proteína)	Actividad total	Producción
	µg/ml	ml	µg	AFU (mU)	(mU/mg proteína)	U	(%)
CC TBS Ext	312.0	320.00	99840.0	3.67	11.8	587.34	100.0
Hi Prep Q	1185.0	15.00	17775.0	133.59	112.7	1001.92	170.6
Mono Q	582.0	8.00	4656.0	150.30	258.2	601.19	102.4
Mono S	61.3	8.00	490.4	56.94	928.8	227.75	38.8
Mono P	50.5	1.00	50.5	338.31	6699.2	169.15	28.8
Superdex 75	11.8	1.00	11.8	106.52	9015.1	53.26	9.1

Propiedades enzimáticas de la caspasa-14 purificada

Se examinaron las propiedades enzimáticas de la caspasa-14 purificada (Fig. 3 y 4). La caspasa-14 exhibió sensibilidad a una variedad de inhibidores de la caspasa incluyendo YVAD-FMK (inhibidor de la caspasa-1), VDVAD-FMK (inhibidor de la caspasa-2), DEVD-FMK (inhibidor de la caspasa-3), IETD-FMK (inhibidor de la caspasa-8), LEHD-FMK (inhibidor de la caspasa-9) y VAD-FMK (inhibidor de pan-caspasa) (Fig. 3). El DIEV-FMK no tenía prácticamente ningún efecto. El YVAD-FMK mostró el efecto inhibitor más potente contra la actividad de la caspasa-14. Esto es probablemente debido a la similitud estructural entre la caspasa-1 y la caspasa-14. El inhibidor de pan-caspasa VAD-FMK inhibió la actividad de la caspasa-14 a aproximadamente al mismo nivel que VAD-FMK. El ácido yodoacético (IAA), inhibidor específico de clase para cisteína proteasa o el inhibidor específico de clase fluoruro 4- (2-aminoetil) de bencenosulfonilo (AEBSF) para serin proteasa no mostraron efecto inhibitor significativo en las concentraciones de ensayo en este experimento.

Efecto de la caspasa-14 purificada en la descomposición de ICAD

Los presentes inventores evaluaron el efecto de la caspasa-14 sobre ICAD, en el curso de la búsqueda de los sustratos naturales de la caspasa-14, puesto que la desaparición de los núcleos es un evento muy importante para la diferenciación final. Cuando la caspasa-14 purificada se incubó junto con la proteína ICAD recombinante en un tampón de ensayo habitual de caspasa, el análisis por electrotransferencia de Western usando anticuerpos IgG anti-ICAD no mostró absolutamente ninguna de las actividades hidrolíticas de la caspasa-14 purificada por ICAD (Fig. 4A). En presencia de una sal cosmotrópica, sin embargo, la proteína ICAD intacta se redujo y se incrementaron los dos productos principales de descomposición, lo que indica que la caspasa-14 purificada tiene un efecto limitado sobre la descomposición de ICAD.

La caspasa-14 se inhibe por SCCA-1

A pesar de que SCCA-1 pertenece a la superfamilia de la serpina, inhibe a las cisteína proteasas tales como la papaína y catepsina L (Takeda A. et al., Biol. Chem. 383, 1231-6 (2002)). Esto indica que SCCA-1 es un inhibidor dual inherente similar a CrmA³². Por tanto, los presentes inventores probaron si SCCA-1 puede o no inhibir los miembros de las caspasas. Se utilizaron condiciones cosmotrópicas para la caspasa-14. Cuando las caspasas activas recombinantes se incuban junto con el SCCA-1, ningún miembro de las caspasas (1-10) se vio afectado en la actividad enzimática. Sin embargo, SCCA-1 inhibió la actividad de la caspasa-14 contra WEHD-MCA de una manera dependiente de la dosis (Fig. 4C). SCCA-1 también inhibió la descomposición de ICAD por la caspasa-14. La actividad de la enzima no se recuperó incluso con una incubación más prolongada. Esto sugiere una unión fuerte entre la caspasa-14 y SCCA-1 (Fig. 4B).

La localización de caspasa-14 activa y de células TUNEL positivas

Con el fin de determinar si la caspasa-14 está implicada o no en el proceso de desnucleación, los presentes inventores llevaron a cabo la doble tinción de la caspasa-14 activa y TUNEL. Como se muestra en la Fig. 5A, la caspasa-14, que incluye la proforma y la forma activa se localizó tanto en las células escamosas cornificadas como en las células epidermis humana normales. Esto está en concordancia con los hallazgos anteriores (Lippen S. et al., (2000), *ibid*). La caspasa-14 activa que se detectó con el anticuerpo h14D¹⁴⁶ se limita a algunas células cornificadas y granulocitos (Fig. 5B). La mayoría de las células cornificadas se tiñeron de forma ubicua. Se observaron células TUNEL positivas justo debajo de la capa cornificada, pero la mayoría de estas células positivas estaba altamente confinadas (Fig. 5C). Curiosamente, las células TUNEL positivas estaban completamente localizadas junto a las células positivas para h14D¹⁴⁶. Esto sugiere que se había producido la fragmentación del ADN en las células, y que la caspasa-14 activa está implicada en el proceso.

Co-localización de ICAD y SCCA-1 en los núcleos de paraqueratosis

En secciones transversales del epitelio humano normal, el uso del anticuerpo FL331 demuestra que la mayor parte de ICAD esta localizado en los núcleos de células basales y de células suprabasales. Los citoplasmas resultaban débilmente positivos tanto en células basales como en las células granulares. La inmunorreactividad para ICAD en la capa córnea se redujo drásticamente. Esencialmente se han encontrado los mismo resultados incluso cuando se utiliza el anticuerpo DFF45/ ICAD Ab-2 específico del péptido N-terminal (datos no mostrados). Cuando la capa cornificada superficial del paciente AD se tiñó con anticuerpos anti-ICAD (FL-331), zonas de agrupaciones de diversos tamaños resultaron positivas para el anticuerpo (Fig. 6B). La tinción nuclear con PI indica que los núcleos paraqueratósicos estaban siempre presentes en las zonas como islas (Fig. 6C). El campo claro de la capa cornificada superficial mostró una superficie rugosa muy irregular (Fig. 6D). La imagen superpuesta mostró concordancia entre los sitios paraqueratósicos y los sitios positivos para ICAD (Fig. 6E y 5F). Estos resultados sugieren que la descomposición de ICAD es necesaria para la eliminación de los núcleos en la diferenciación terminal.

En el caso de la piel normal, se detecta un nivel muy bajo de SCCA-1 en la capa granular. También se observó inmunotinción con una distribución irregular significativamente alta de los sitios positivos en la capa córnea superficial con AD activa (Fig. 7H). Del mismo modo, las zonas positivas para SCCA-1 coincidían con la capas de núcleos positivos para PI, es decir, los sitios de paraqueratosis (Fig. 7J-L). Para resumir los resultados, el sistema

ICAD / CAD juega un papel importante en el proceso de desnucleación, y SCCA-1 actúa como un supresor en la reacción.

Discusión

5 La caspasa-14 se expresa principalmente en la epidermis y no se expresa prácticamente en otros tejidos (Van de Craen M. et al., *Cell Death Differ.* 5, 836-46 (1998)). Los informes anteriores han demostrado un vínculo entre la diferenciación terminal de los queratinocitos y el procesamiento de la caspasa-14, y esto ha sugerido la aceleración de la actividad de la proteasa de las caspasas (Lippen S. et al, *Cell Death Differ* 7, 1218-1224 (2000); Eckhart L. et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 655-9 (2000); Hu S.J. *Biol. Chem.* 273: 29648-53 (1988)). Recientemente, Mikolajczyk et al., (2004) (ibid) demostraron que caspasa-14 escindida con granzima-B es enzimáticamente activa en la presencia de sales cosmótrópicas. En esta investigación, los presentes inventores intentaron purificar la caspasa-14 a partir de queratinocitos completamente diferenciados con el fin de examinar si la caspasa-14 humana está activa o no en la etapa final de la diferenciación de los queratinocitos. Los presentes inventores usaron tres anticuerpos diferentes que reconocen la subunidad grande, la proforma (H-99) (que tiene un sitio de escisión de caspasa putativo en Asp¹⁴⁶ (h14D¹⁴⁶)) y la subunidad pequeña (C20). La preparación final consistió en dos bandas de proteínas, específicamente una banda de proteína de 17 kDa reconocida por el anticuerpo h14D¹⁴⁶ y una banda de proteína de 11 kDa reconocida por el anticuerpo C20. Estas bandas de proteínas son subunidades grandes y pequeñas de la caspasa-14 activa. La banda de 17 kDa positiva para H-99 se observó junto al anticuerpo h14D¹⁴⁶ durante la etapa de purificación. Esto sugiere que la subunidad grande termina con Asp¹⁴⁶ en el carboxilo terminal. La región amino terminal de la subunidad pequeña se identificó como Lys¹⁵³- Asp-Ser-Pro-Gln, lo que sugiere que el procesamiento se produjo entre Ile¹⁵² y Lys153. Este sitio es un sitio de corte inusual que una caspasa. Esto también está en concordancia con las conclusiones de Chien A.J. et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (4): 911-7 (30 de agosto 2002)) de que la caspasa-14 inmunoprecipitada a partir de extracto de prepucio se escinde en el mismo sitio. Por lo tanto, se concluyó que la caspasa-14 humana había sido purificada homogéneamente como un heterodímero altamente activo. También se sugirió que el procesamiento en los dos sitios Asp¹⁴⁶ y Ile¹⁵² y la eliminación de los seis restos de la región de unión entre Xxx¹⁴⁷ y Ile¹⁵² están involucrados en la maduración de la caspasa-14. La existencia de dos sitios de escisión diferentes (uno ácido y otro hidrófobo) también sugiere que la activación de la caspasa-14 se lleva a cabo en múltiples etapas por múltiples enzimas.

30 Las propiedades enzimáticas de la caspasa-14 purificada resultaron muy únicas. La caspasa-14 purificada exhibió una sensibilidad a los inhibidores relativamente amplia con respecto a los inhibidores de caspasa conocidos. En particular, el inhibidor de caspasa-1 YVAD-FMK exhibió la inhibición más fuerte. YVAD-FMK mostró mayor actividad que WEHD-MCA y otros sustratos YCAD-MCA de la caspasa-1. Esto sugiere una estrecha relación entre la caspasa-1 y la caspasa-14. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la caspasa-14 tiene propiedades significativamente diferentes. Se demostró, por primera vez, que SCCA-1 es un inhibidor endógeno de la caspasa-14. La propiedad más específica a SCCA-1 es su alta especificidad por la caspasa-14. Los otros miembros, las caspasas 1-10, nunca habían sido reportados como afectados por SCCA-1. SCCA-1 no inhibe la actividad de la caspasa-3 cuando se utiliza el sustrato sintético DEVD-MCA o el sustrato natural ICAD. Este comportamiento contrasta con CrmA. Se sabe que CrmA también inhibe a varias caspasas incluyendo la caspasa-1 y la caspasa-8 (Gagliardini V. et al, *Science* 263: 826-8 (1994)). Se sabe que XIAP inhibe a las caspasas 3, 7 y 9 (Srinivasula S. M. y otros, *Nature* 410: 112-6 (2001)). Dado que la proteína anti-apoptótica p35 inhibe a las caspasas 1, 3, 6, 7, 8 y 10, que se cree que tiene un espectro más amplio. El hecho de que todas estas proteínas inhibitoras CrmA, IAP y p35 puedan inhibir a algunas caspasas iniciales y activas sugiere que estas moléculas participan en la activación de la ruta apoptótica clásica. Por otra parte, los resultados de los presentes inventores sugieren fuertemente que SCCA-1 no juega un papel clave en la apoptosis normal, pero es un regulador importante en el proceso de denucleación mediado por la caspasa-14.

45 El mecanismo molecular de este proceso aún no se había dilucidado. Los presentes inventores han demostrado que la caspasa-14 humana puede descomponer ICAD en presencia de una sal cosmótrópica. ICAD (también conocido como el factor de fragmentación de ADN "DFF45") es un inhibidor de endonucleasas dependiente de magnesio conocidas como ADNasas activadas por caspasa (CAD) (o DFF40). El sistema de ICAD / CAD juega un papel importante en la descomposición de ADN cromosómico durante la muerte celular apoptótica. El ICAD unido a CAD existe como un complejo inactivo. La caspasa-3 exhibe una proteólisis de ICAD limitada, escindiéndolo en los dos sitios Asp¹¹⁷ y Asp²²⁴. La escisión activa a CAD para iniciar la degradación del ADN (Nagata S. *Exp. Cell Res.* 256, 12-8 (2000)). La caspasa-3 no se requiere necesariamente para la escisión de la mayoría de las proteína celulares durante la apoptosis, pero es necesaria para la escisión de ICAD (Tang D. et al., *J. Biol. Chem.* 273, 28549-52 (1998)). Esto significa que la caspasa-3 es muy importante para la fragmentación del ADN, mientras que otras caspasas activas, por ejemplo las caspasas 6 y 7, no son importantes. Curiosamente, la caspasa-14 produjo fragmentos de escisión de 12 kDa y 35 kDa similares a ICAD. El análisis de secuencia reveló el mismo sitio de escisión. Esto sugiere que la caspasa-14 puede servir como un sustituto total de la caspasa-3. Aunque la caspasa-14 puede descomponer ICAD, es claramente diferente de la caspasa-3 pro-apoptosis por las siguientes razones. En primer lugar, la sobreexpresión de la caspasa-14 no induce la muerte celular apoptótica (Van de Craen. *Cell Death Differ.* 5, 838-46 (1998)). Esto contrasta con la caspasa-3. En segundo lugar, la caspasa-14 no se activa por diversos estímulos apoptóticos (Lippens et al. (2000), ibid). La caspasa inicial u otras caspasas no eran capaces de procesar la procaspasa-14, y esto concuerda con las observaciones anteriores (Lippens et al. (2000), ibid). La activación sólo se produce durante la diferenciación terminal (Eckhart L. et al., (2000), ibid). En tercer lugar, la

síntesis de la caspasa-14 se limita a la diferenciación de los queratinocitos en el tejido adulto (Eckhart L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 655-9 (2000)). La capacidad de la caspasa-14 para escindir ICAD está regulada de una manera muy diferente a la de la caspasa-3. La degradación de ICAD por la caspasa-14 requiere una concentración anormalmente alta de iones cosmotrópicos. Las otras caspasas son prácticamente inactivas a una concentración de iones semejante. Desde un punto de vista general, ya que la activación de la caspasa-14 está regulada por el programa de diferenciación de los queratinocitos, se cree que tiene un papel especial entre las caspasas.

Los experimentos *in vivo* proporcionan más respaldo a la función del sistema ICAD / CAD en la diferenciación terminal de los queratinocitos. La investigación inmunohistoquímica ha demostrado que ICAD está presente en los núcleos de los queratinocitos basales y de los queratinocitos escamosos, desapareciendo en las células granulares, y que la desaparición de los núcleos se produce durante la diferenciación terminal. Se observó inmunotinción positiva de ICAD en las zonas irregulares de la epidermis superficial de los pacientes AD. Estas zonas tienen superficies ligeramente rugosas y baja semi-transparencia. De hecho se co-localizaban, agregados de núcleos no digeridos, PI-positivos en estas regiones, mientras que otras regiones no se tiñeron por el anticuerpo anti-ICAD. La cinta de extracción de muestras de piel de pacientes AD mostró la presencia de la proteína ICAD intacta, pero se detectó en extractos sanos. Estos resultados sugieren que ICAD está implicado en el proceso de desnucleación durante la diferenciación terminal.

SCCA-1 prácticamente no se expresa en la epidermis normal. Por otro lado, se ha publicado que su expresión es alta en la epidermis psoriásica, la mucosa oral y el esófago (Takeda A. et al., J. Invest. Dermatol 118, 147-54 (2002)). Curiosamente, la paraqueratosis también está presente en dichos tejidos. Los presentes inventores han demostrado que también se encuentra una fuerte tinción de SCCA-1 en las zonas de paraqueratosis. SCCA-1 y ICAD fueron constantemente localizados juntos en los mismos sitios donde se encontraron agregados de núcleos. Puesto que no había otras zonas de la superficie epidérmica negativas para la SCCA-1 o ICAD, la co-localización de estas moléculas en los sitios paraqueratósicos sugiere que las moléculas están implicadas en la supresión del proceso de desnucleación. Se ha publicado que el inhibidor pan-caspasa VAD-FMK inhibe la desaparición de los núcleos en los modelos equivalentes a la piel (Weil et al., 1999). El descubrimiento de los presentes inventores de que VAD-FMK es uno de los más potentes inhibidores de la caspasa-14 aumenta la posibilidad de que la caspasa-14 sea un candidato en esta reacción. La caspasa-14 esta regulado a la baja en las zonas de paraqueratosis de la piel psoriásica, y no se encuentra en la epidermis oral. En la epidermis oral, la desaparición de los núcleos o bien se altera de alguna manera, o no se produce (Lippens et al., (2000), *ibid*). Curiosamente, SCCA-1 está regulada al alza en estos tejidos. Se cree que probablemente la expresión anormal de estas moléculas conduce a la diferenciación incompleta, incluida la presencia permanente de núcleos.

El mecanismo de activación de la caspasa-14 en la piel no se comprende completamente. La activación sólo se observa en los modelos de piel o equivalentes a la piel, y no en sistemas de cultivo celular (Eckhart L. et al. (2000), *ibid*). Los presentes inventores llevaron a cabo pruebas reales en diferentes condiciones. Las condiciones incluyen la adición de suero, ampliar el período de cultivo hasta el día 14 después de la confluencia en presencia o en ausencia de calcio, el tratamiento con el ionóforo de calcio A23187, o la exposición al aire durante un período de 30 minutos suficiente para regular al alza la mayoría de los marcadores de diferenciación. Aunque estos estímulos de diferenciación inducen la expresión del ARNm de la caspasa-14, ninguno resultó eficaz para producir la activación de la caspasa-14 (datos no presentados). El proceso de activación está estrictamente controlado y está fuertemente inhibido en cultivos en monocapa. Se cree que la estratificación y la exposición al aire son necesarios para la activación. Claramente, la activación de la caspasa-14 no depende del programa de apoptosis, pero esta controlada por el programa de diferenciación. Durante el proceso de diferenciación terminal, muchas proteasas están activadas, incluyendo las proteasas de serina, de cisteína y del ácido aspártico. Las proteasas de suero de tipo tripsina y quimotripsina presumiblemente desempeñan un papel en la desnucleación de los queratinocitos más exteriores. Algunas proteasas de cisteína, tales como la cathepsina B y L, están reguladas al alza en los queratinocitos diferenciados. La cathepsina D y las proteasas ácido aspártico también participan supuestamente en desnucleación de los queratinocitos. Estas enzimas también contribuyen a veces a otros mecanismos de diferenciación tales como la activación de la caspasa-14, por ejemplo.

Para resumir lo anterior, los presentes inventores purificaron la caspasa-14 a partir de extracto de queratinocitos humanos. La caspasa-14 induce la desaparición de los núcleos aparentemente por apoptosis, pero se sugiere considerablemente que los cambios son cambios distinguibles mediante de la degradación de ICAD en la etapa final de la diferenciación de queratinocitos. Aunque el proceso implica varios factores apoptóticos, no es un proceso de muerte celular que conduce a la eliminación de las células dañadas, sino más bien es un proceso constitutivo que completa una estructura general que realiza una función de barrera como papel principal. La expresión anormal de la caspasa-14 o de SCCA-1 afecta directamente el programa de diferenciación, dando como resultado la paraqueratosis y la pérdida de la función de barrera.

2. Evaluación de enfermedades de la piel como un indicador de la expresión de SCCA por las células del estrato córneo de la piel

Materiales y métodos

(1) Los anticuerpos

5 Se prepararon anticuerpos policlonales que reconocen tanto SCCA-1 y 2 usando SCCA (SCCA-1 y SCCA-2) purificado a partir de las escamas de la epidermis psoriásica. Después de centrifugar los extracto de escamas de la epidermis psoriásica (extracto: 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,14 M NaCl), el sobrenadante se purificó con Sephacryl S-200, DEAE Sepharosa, Mono Q, Mono S, Mono P, Superosa 6 y se usó como antígeno para la inmunización de conejos.

10 El anticuerpo monoclonal anti-SCCA-1 y el anticuerpo monoclonal anti-SCCA-2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.

(2) Examen inmunohistoquímico

15 Los especímenes de epidermis se fijaron con acetona fría y después se incluyeron en parafina, de acuerdo con el protocolo de Amex (Sato Y. et al. Am. J. Pathol., 125, 431-435 (1986)). Las secciones se desparafinaron con xileno y se enjuagaron con acetona y después con PBS. Los sitios de unión no específicos de las secciones se bloquearon con 10% de suero de cabra normal (Histofine, Tokio, Japón).

20 Las secciones de epidermis fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-SCCA-1 (dilución 1:500), con un anticuerpo monoclonal anti-SCCA-2 (1: 500 dilución) purificado como se describió anteriormente o con un anticuerpo policlonal anti-SCCA (dilución 1:500). Después de enjuagar con PBS, las secciones se colorean con un Sistema Envision de DAKO (DAKO Corp., CA, EE.UU.) y posteriormente se realiza la contratinción con hematoxilina y se observa.

(3) ELISA

25 Las muestras del estrato córneo de la piel se obtuvieron mediante cintas adhesivas, en donde la cinta adhesiva transparente (Cello tape <-> por Nichiban) fue adhiere a la superficie de la piel y luego se despegar. Después de adherirse al estrato córneo de la piel, la cinta se corta, se sumerge en un tampón de extracción (0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,14 M NaCl, 0,1% Tween-20, 1 ml), y se sometió a tratamiento con ultrasonidos (20 sec x 4) para preparar un extracto de la muestra.

30 Se dispensó el anticuerpo policlonal de SCCA diluido con PBS (dilución 1: 1000) 100 l en cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente para la unión a la fase sólida de la placa. Con el fin de inhibir la unión no específica a la placa, se realizó una incubación durante 1 hora con una disolución de bloqueo (disolución de Blockace diluida con PBS-Tween 20, 300 l / pocillo).

35 Se añadieron 50 l de extracto de la muestra a cada pocillo de la placa de ELISA, y la reacción se llevó a cabo a 37° C durante 2 horas. Se añadió el anticuerpo monoclonal de SCCA-1 (dilución 1:1000) o el anticuerpo monoclonal de SCCA-2 (dilución 1:1000) y la reacción se continuó a 37° C durante 1 hora. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante para su reacción a 37° C durante 1 hora, y después de enjuagar con 0,1% de Tween-20 PBS, se añadió tetrametilbencidina (TMB) a los 3', 3', 5', 5', se utilizó un kit de sustrato TMB de EIA Peroxidase (BIO-RAD) para colorear, y la medición se realizó a 630 nm.

Medición de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

40 La medida de TEWL de los ejemplares (cara humana y parte interna del brazo sanos) se llevó a cabo utilizando un TEWAmeter (TM120).

Resultados

(1) Examen inmunohistoquímico

45 La Fig. 8 muestra los resultados de la observación al microscopio de los especímenes de la epidermis de la parte superior del brazo (humano, de 24 años), de la cadera (humano, de 46 años de edad) y del muslo (humano, 75 años de edad) como zonas no expuestas (zonas que están expuestas a la luz solar relativamente con poca frecuencia), y de los especímenes de la epidermis de la mejilla (humanos, edades 20, 76) y del párpado (humano, 82 años) como zonas expuestas (zonas que están expuestas a la luz solar con relativa frecuencia), utilizando como anticuerpo el anticuerpo policlonal anti-SCCA que se une a SCCA-1 y a SCCA-2. De la Fig. 8 se aprecia que SCCA aumentaba significativamente en la epidermis superior de las zonas expuestas que están constantemente expuestas a condiciones más duras, tales como los rayos ultravioleta, en comparación con las zonas no expuestas.

50 La Fig. 9 muestra la expresión de SCCA-1 y 2 en la epidermis superior normal (50 años de edad, hombre) y en la epidermis superior psoriásica. Como muestran claramente estas fotografías, SCCA-1 y 2 se expresaron sólo

débilmente en la piel normal, mientras que SCCA-1 y 2 se expresaron especialmente en la piel psoriásica, una enfermedad inflamatoria paraqueratósica.

Por lo tanto se concluyó como resultado que la expresión del SCCA se promueve de manera significativa en las zonas expuestas y paraqueratósicas de la piel, en comparación con el estrato córneo de la piel sana.

5 (2) ELISA

1) Expresión de SCCA en la capa córnea de la piel normal

Se obtuvo el estrato córneo de zonas de la piel expuestas que presentan un estado de piel saludable (cara y la mejilla) y de zonas de la piel no expuestas que presentan un estado de piel sana (parte interna del brazo) mediante cintas adhesivas, y se midió la expresión de los niveles de SCCA-1 y SCCA-2 por ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 10.

La expresión de SCCA-1 y 2 se aceleró especialmente en las zonas expuestas en comparación con las zonas no expuestas. Por lo tanto, ELISA permite determinar cuantitativamente que SCCA, y en particular SCCA-1 se promueve de manera significativa en la epidermis superior de las zonas expuestas que están constantemente expuestas a ambientes agresivos, incluso si presentan propiedades saludables, en comparación con las zonas no expuestas.

2) Expresión de SCCA en la capa córnea de la piel psoriásica

Se llevó a cabo la obtención mediante la cinta adhesiva de piel de individuos que presentan una condición saludable de la piel (área no expuesta: brazo interior) y la piel de pacientes que sufren de psoriasis, para obtener estrato córneo, y se midieron los niveles de expresión de SCCA-1 y SCCA-2 mediante ELISA. Como zonas de la piel de pacientes con psoriasis, se analizaron zonas de sarpullido con prurito, zonas de sarpullido sin prurito, y zonas sin sarpullido. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Aunque prácticamente no se observa ninguna expresión de SCCA-1 o -2 en la capa córnea de la piel de individuos sanos, se encontró un aumento significativo de la expresión de SCCA-1 y -2 en el estrato córneo de las zonas de sarpullido de los pacientes con psoriasis, independientemente de que fuesen o no acompañadas de prurito. Dicho sea de paso, no se detectó casi expresión de SCCA-1 o -2 incluso en los pacientes con psoriasis en zonas de la piel que no presentan síntomas de la psoriasis (zonas sin sarpullido).

3) Expresión SCCA en el estrato córneo de piel con dermatitis atópica

Se llevó a cabo la obtención mediante cinta adhesiva de piel de individuos que presentan un estado saludable de la piel (área no expuesta: brazo interior) y de la piel de pacientes que sufren dermatitis atópica, para obtener estrato córneo, y se midieron los niveles de expresión de SCCA-1 y SCCA-2 mediante ELISA. Las zonas de sarpullido y las zonas sin sarpullido se evaluaron como las zonas de la piel del paciente con dermatitis atópica. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

Aunque no se observa prácticamente ninguna expresión de SCCA-1 o 2 en la capa córnea de la piel de individuos sanos, se encontró que aumentó significativamente la expresión de SCCA-1 y 2 en el estrato córneo de las zonas afectadas de pacientes con dermatitis atópica, fuesen o no zonas de sarpullido. En el caso de la dermatitis atópica es posible, por lo tanto, el diagnóstico de la enfermedad usando SCCA-1 y/o 2 como marcador, incluso antes de que aparezcan los síntomas de la dermatitis atópica. Por lo tanto, SCCA puede ser utilizado como marcador para valorar la susceptibilidad a la dermatitis atópica, permitiendo así la prevención y el tratamiento temprano (por ejemplo, antes de la aparición).

40 4) Correlación entre la expresión de SCCA y la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

Se midió la expresión de SCCA en el estrato córneo de la piel mediante ELISA y también se examinó TEWL como un parámetro fisiológico de la piel, para determinar la correlación entre la expresión de SCCA y TEWL. Los resultados se muestran en la Fig. 12. Para SCCA-1 y TEWL el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,876, mientras que para SCCA-2 y TEWL el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.600, ambos eran correlaciones significativas, y por lo tanto se demostró que la TEWL alta con un estado relativamente malo de la piel va acompañado del aumento de la expresión de SCCA-1 y 2, y especialmente SCCA-1.

5) Expresión de SCCA en el estrato córneo de la piel hipersensible al polen

Se tomaron muestras mediante cinta adhesiva para obtener el estrato córneo de la piel de un individuo que presenta un estado saludable de la piel (control) y de la piel de un paciente que sufre de piel áspera debido a la hipersensibilidad al polen, y se examinó la correlación entre la piel rugosa hipersensible al polen de y TEWL al mismo tiempo que se midió la expresión de SCCA-1 piel rugosa hipersensible al polen mediante ELISA. Las zonas de la piel seleccionadas fueron la parte interna del brazo (sección no expuesta) y la frente (sección expuesta).

5 La figura Fig.14 muestra la correlación entre la piel áspera hipersensible al polen y TEWL (A), y la expresión de SCCA-1 (B). Como los gráficos muestran claramente, la hipersensibilidad polen exhibió un aumento significativo de la TEWL y una función barrera de la piel reducida, mientras que la piel áspera había incrementado notablemente la expresión de SCCA-1 en comparación con los individuos sanos. Por lo tanto, SCCA-1 se demostró claramente ser un marcador de la rugosidad de la piel debido a la hipersensibilidad de polen. Por otra parte, en la piel hipersensible al polen, el aumento de TEWL, es decir, la función barrera reducida, también se encontró en la parte interna del brazo que no está expuesta a la luz, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria sistémica y el aumento de SCCA deteriora la función barrera del cuerpo. La Fig. 15 muestra la correlación entre la piel áspera y la expresión aumentada de SCCA-1 para la piel hipersensible al polen. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,8086 para SCCA-1 y TEWL, que es una correlación significativa. Por lo tanto, se demostró que la expresión de SCCA-1 aumenta con una función barrera de la piel reducida, es decir, empeorando la rugosidad de la piel, debido a la hipersensibilidad al polen.

15 En consecuencia, SCCA puede ser utilizado como un marcador para valorar la susceptibilidad la rugosidad de la piel asociada a la hipersensibilidad al polen incluso antes de que aparezcan los síntomas de la rugosidad de la piel, permitiendo así la prevención y el tratamiento temprano (por ejemplo, antes de la aparición). Por otra parte, el descubrimiento de la paraqueratosis en la piel hipersensible al polen es completamente nuevo, y el hecho de que la alteración de la función barrera y la paraqueratosis de la piel hipersensible al polen se asocien con SCCA es de gran interés.

Lista de secuencias

- <110> SHISEIDO CO. LTD.
 <120> Método para evaluar una enfermedad de la piel basado en un antígeno del carcinoma de células escamosas
 5 <130> SSD-S628
- <150> JP 2005-080533
 <151> 2005-03-18
- 10 <160> 2
 <210> 1
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 15 <223> Cebador directo
- <400> 1
 aaggatccaa tccgcggtct ttggaagagg ag 32
- 20 <210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 25 <223> Cebador inverso
- <400> 2
 tttctgcagg ttgcagatac agccgittcc ggagggtgc 39

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar la susceptibilidad de una piel a una enfermedad de la piel seleccionada entre el grupo que consiste en: dermatitis atópica y rugosidad de la piel causada por la hipersensibilidad al polen, caracterizada porque se utiliza como marcador la promoción de la expresión del antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA) en las células del estrato córneo de la piel y se mide la expresión del antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA) en una muestra del estrato córneo de la piel.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de SCCA se mide mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un anticuerpo específico para SCCA.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra del estrato córneo de la piel se obtiene mediante cinta adhesiva.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el SCCA es SCCA-1.

Fig.1

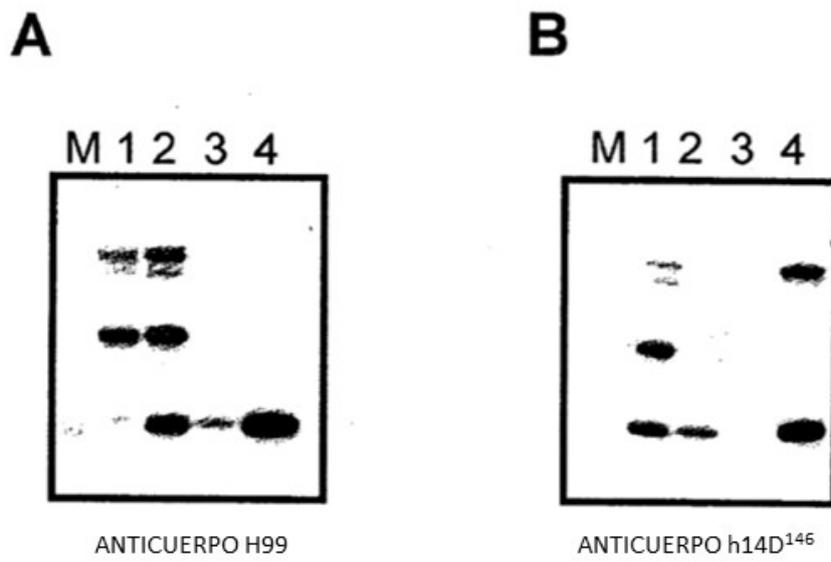


Fig.2

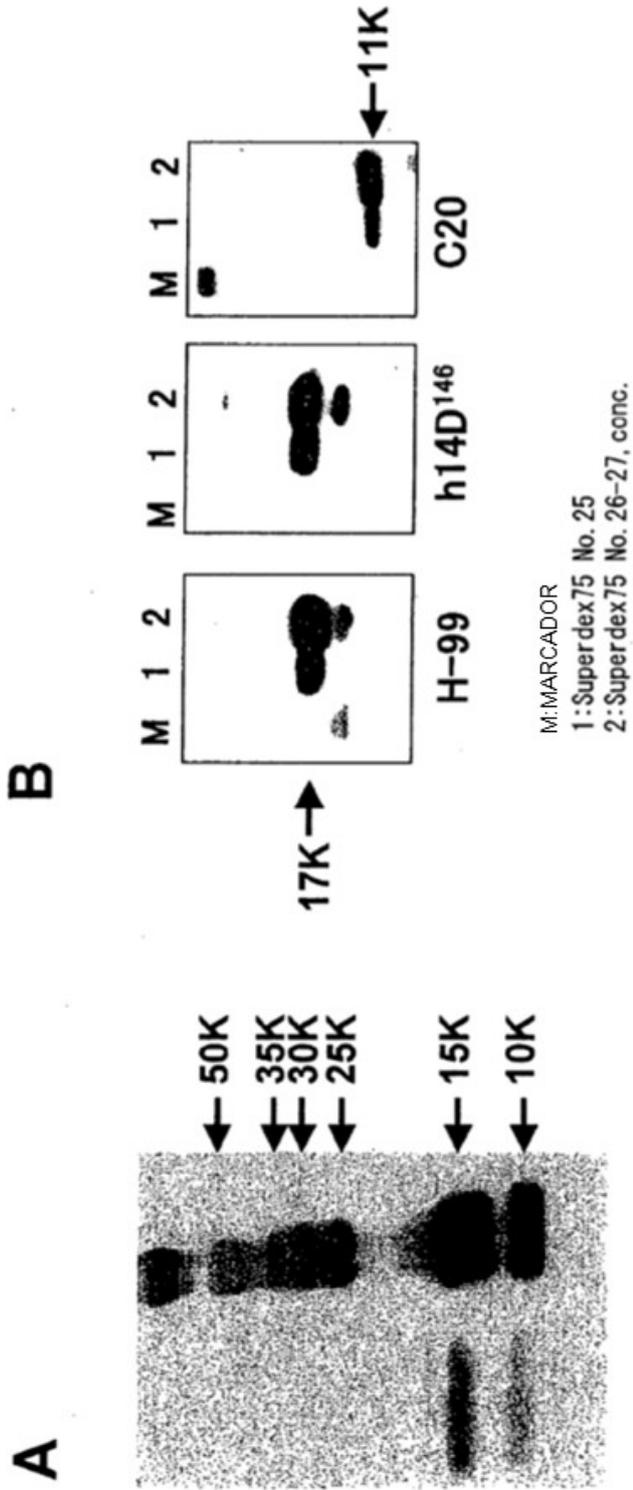


Fig.3

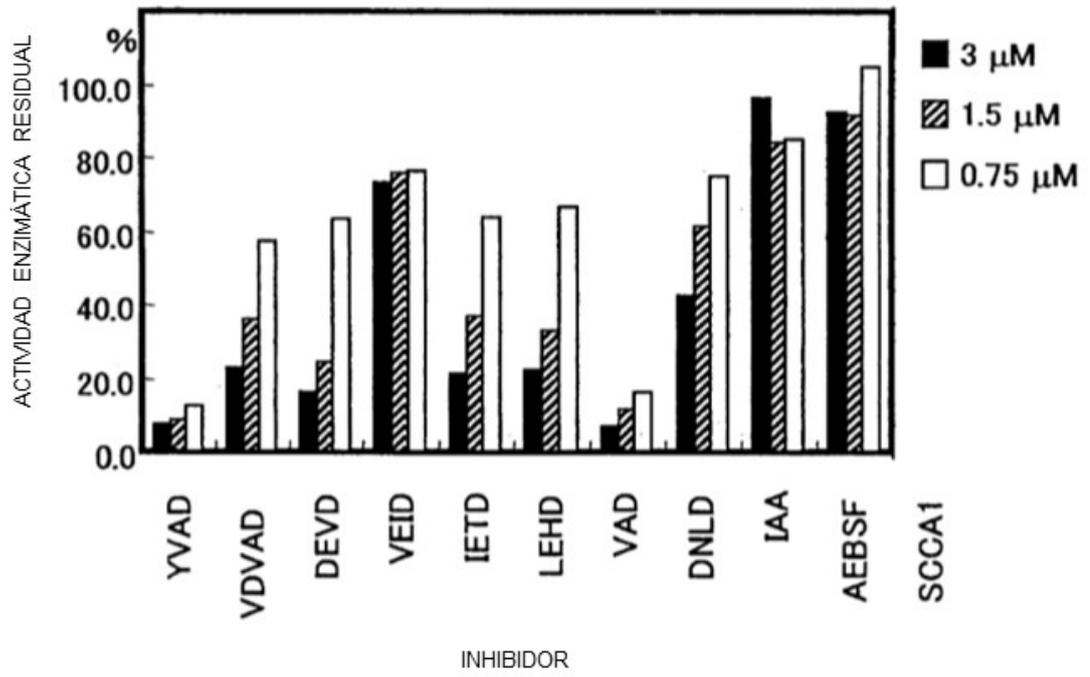


Fig.4

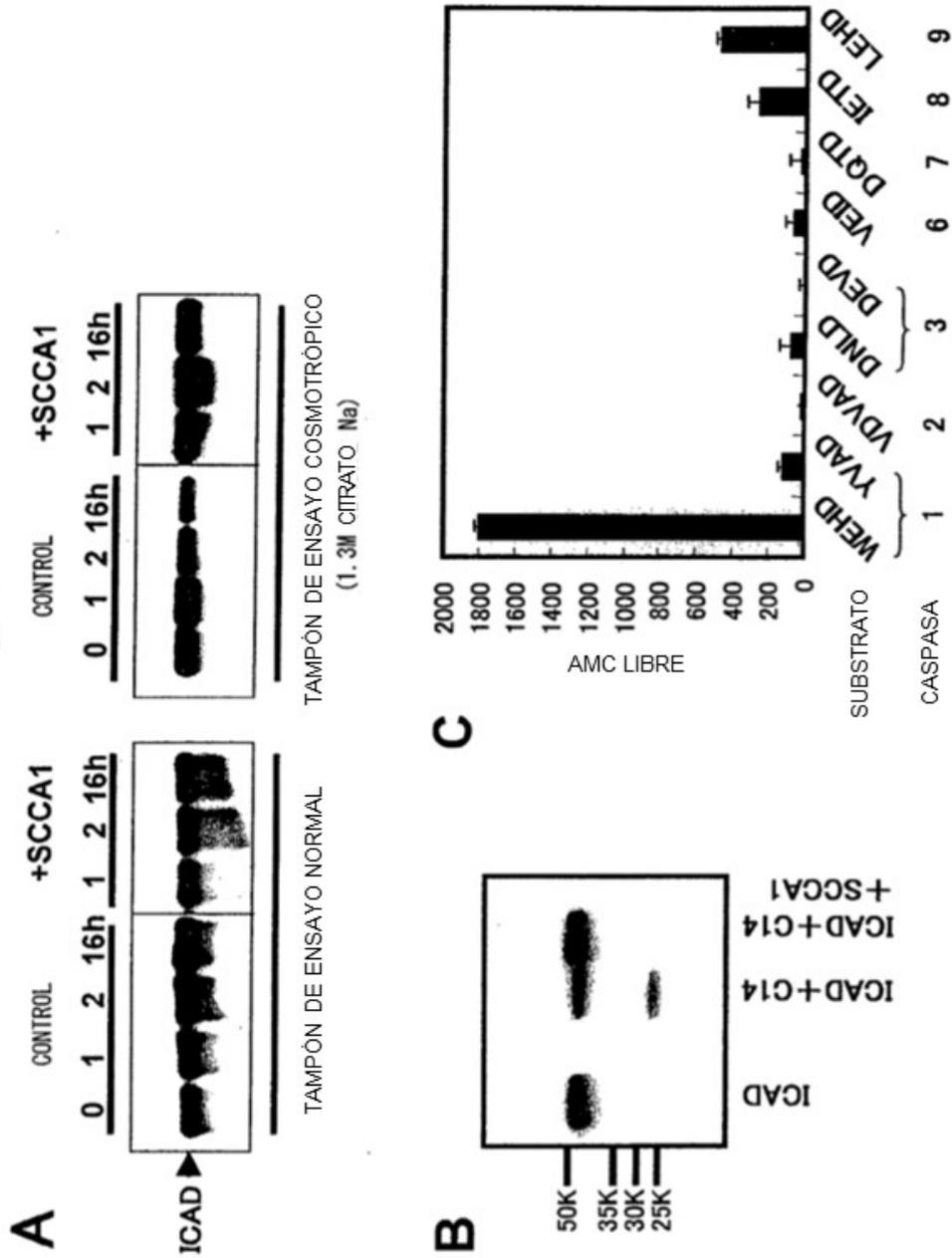


Fig.5

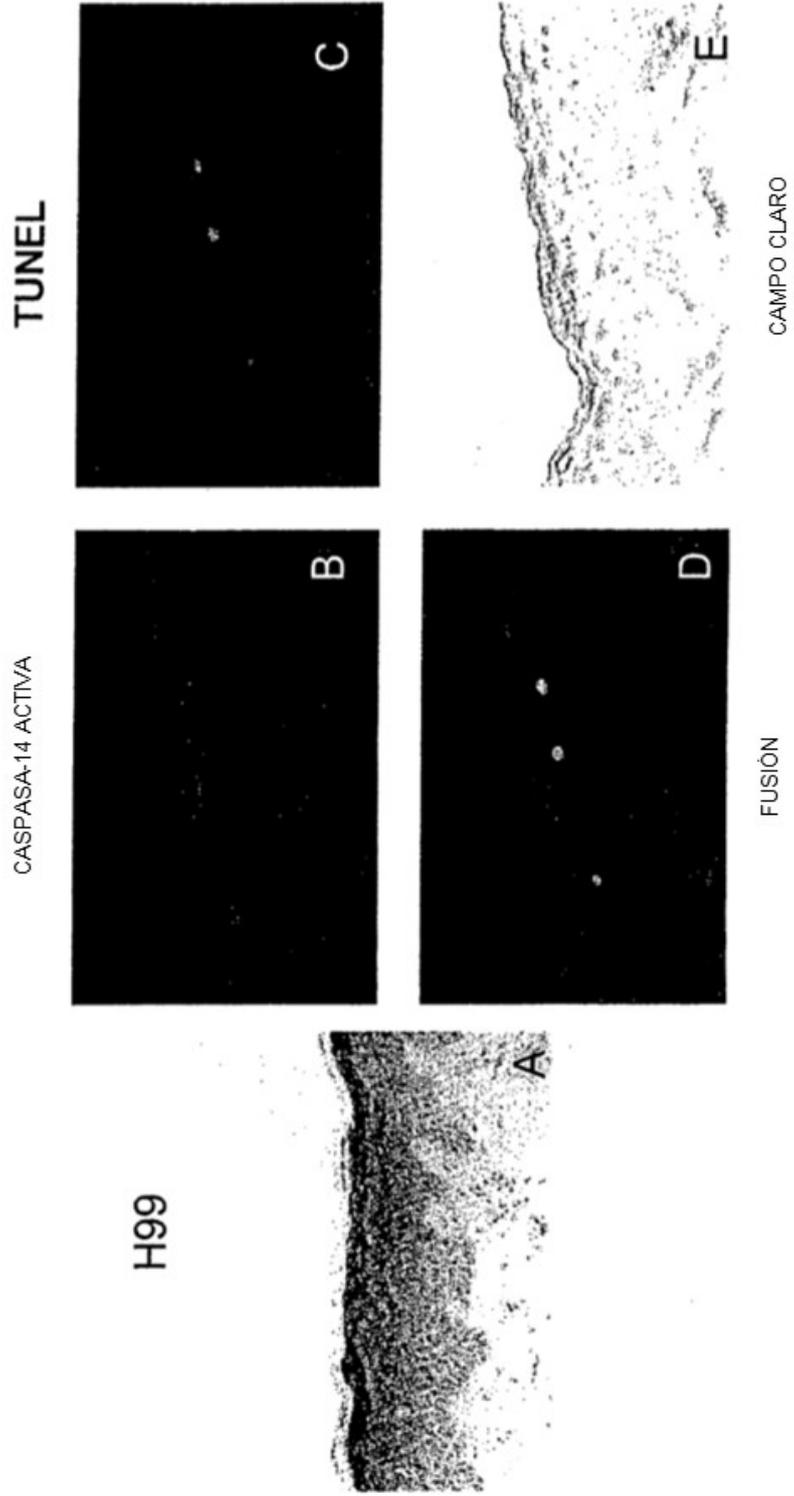


Fig.6

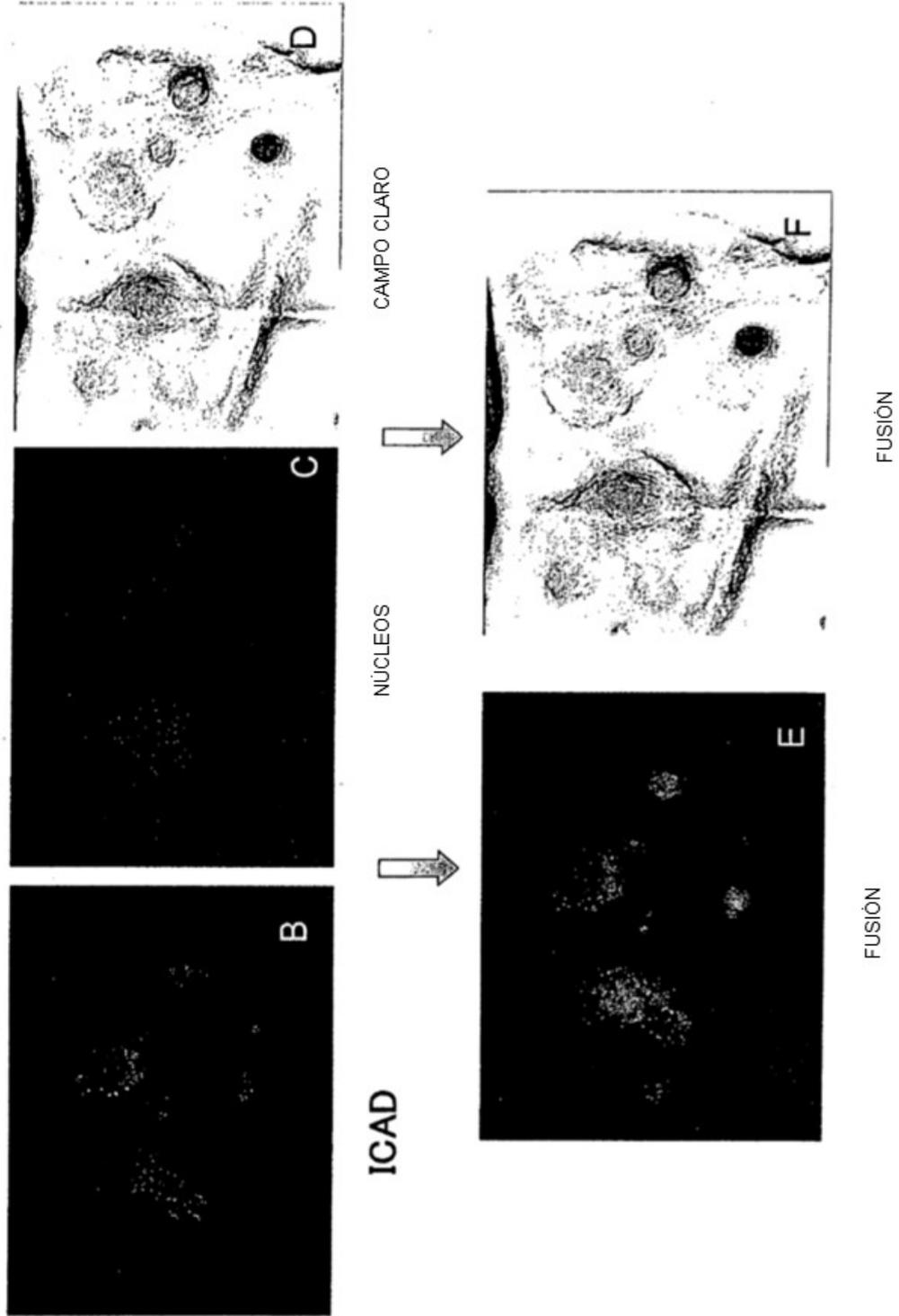


Fig.7

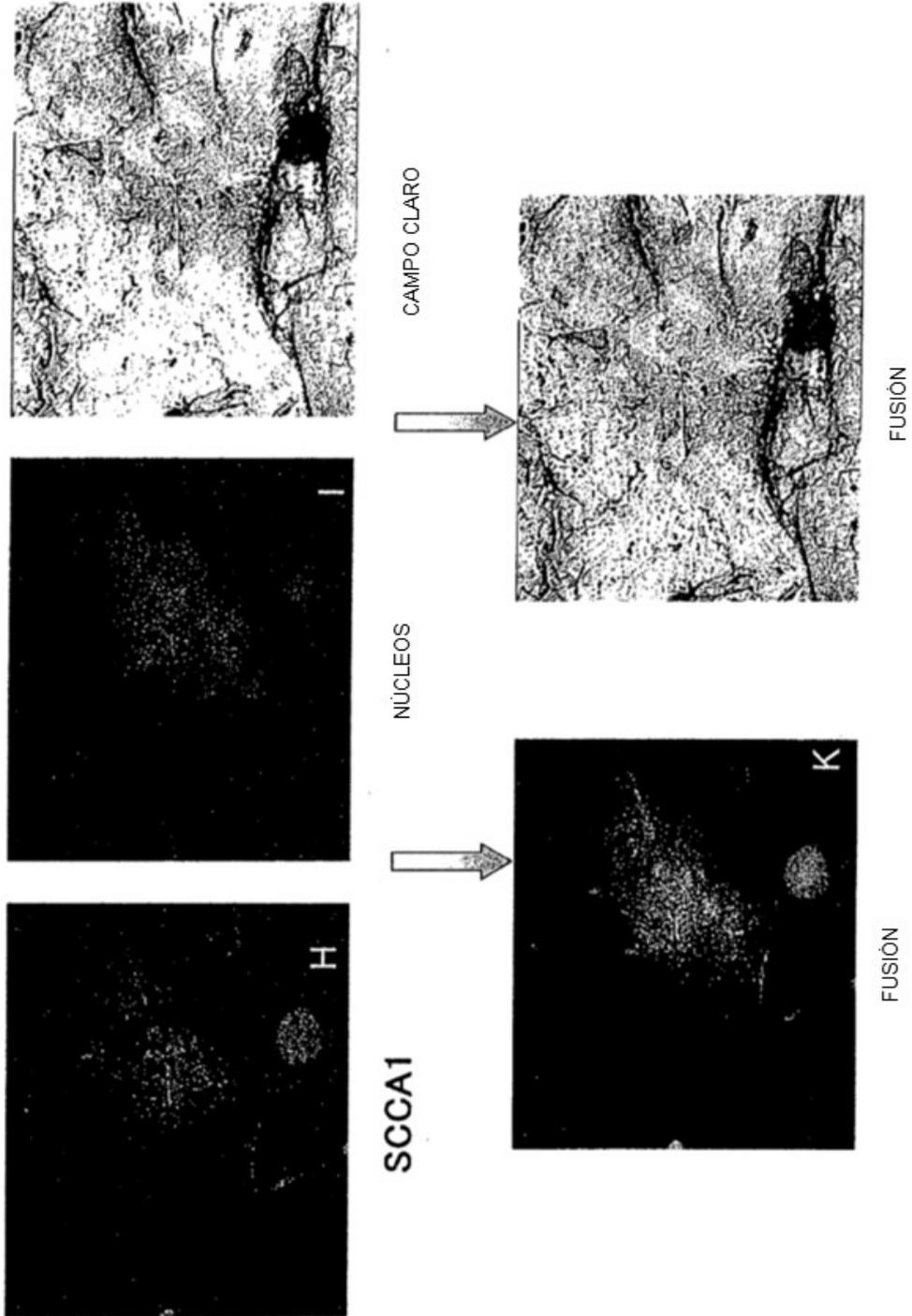


Fig.8

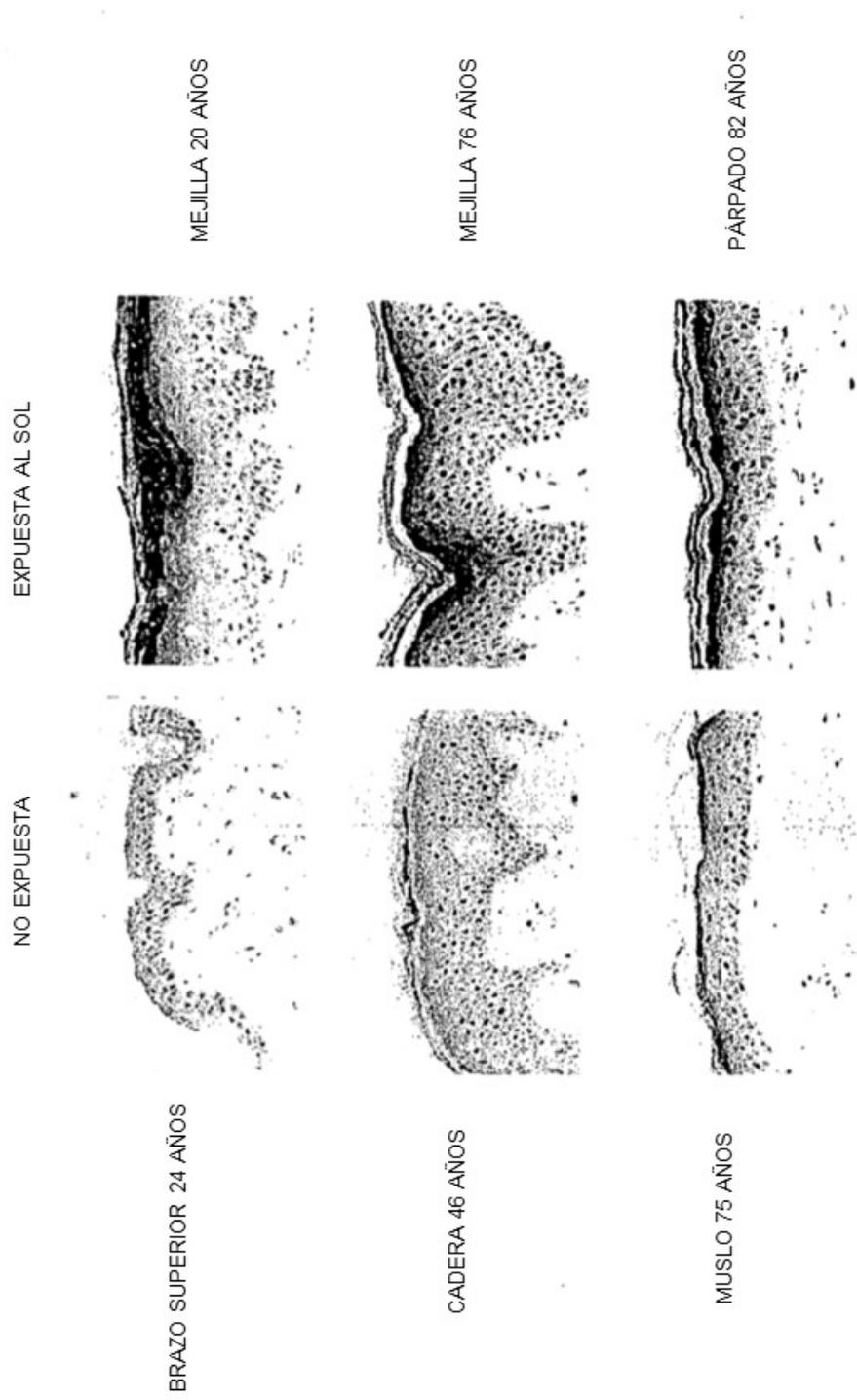


Fig.9

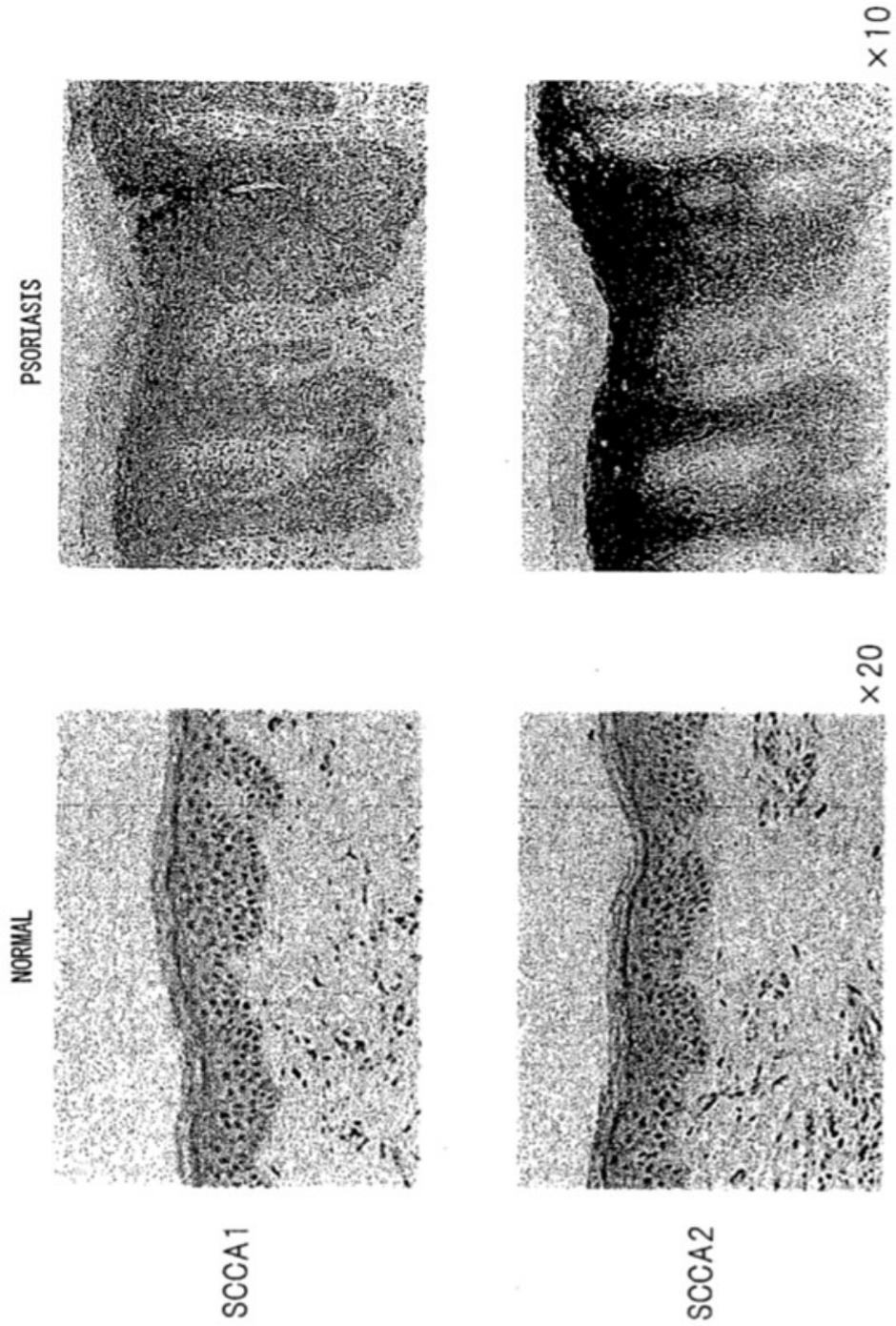


Fig.10

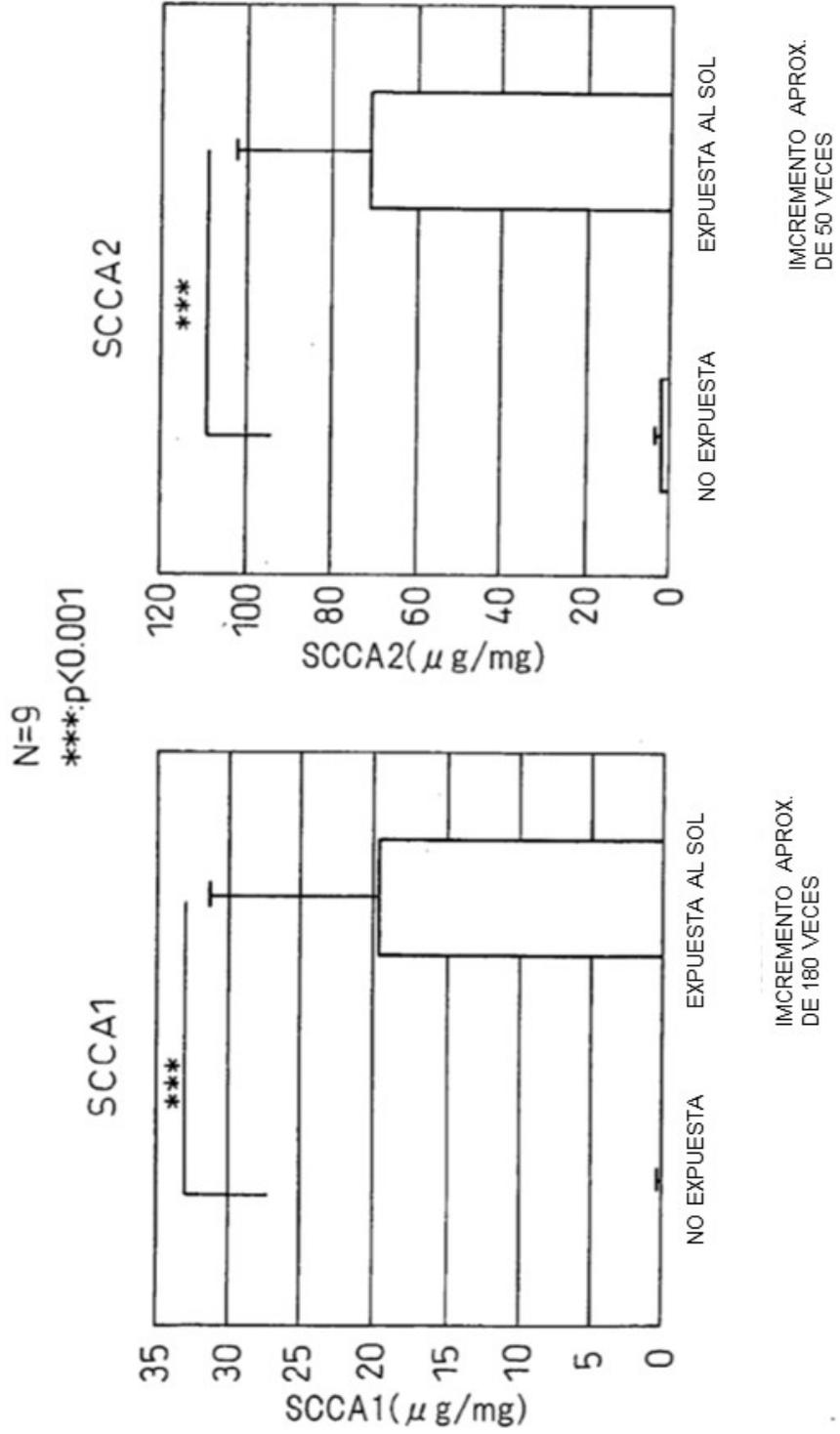


Fig.11

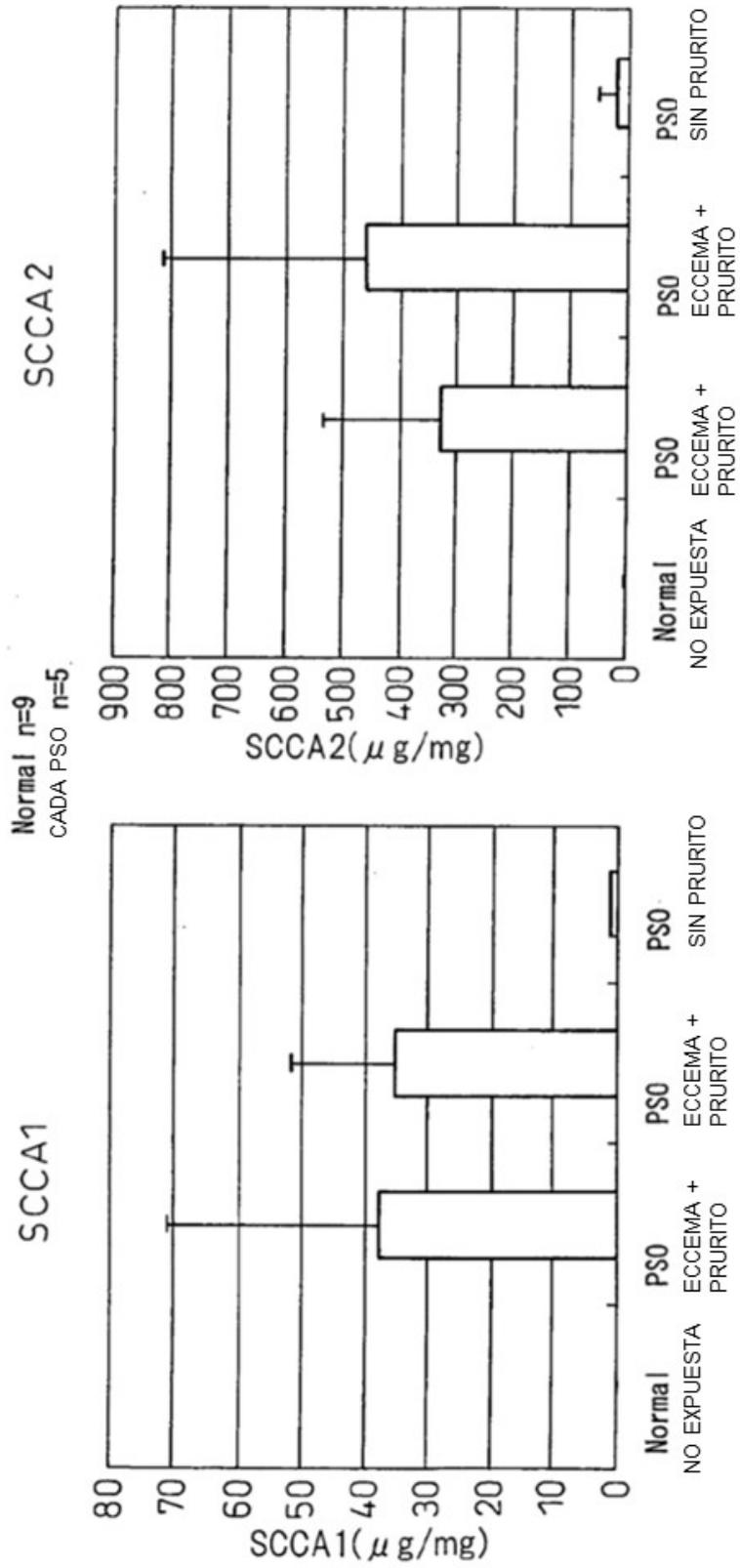


Fig.12

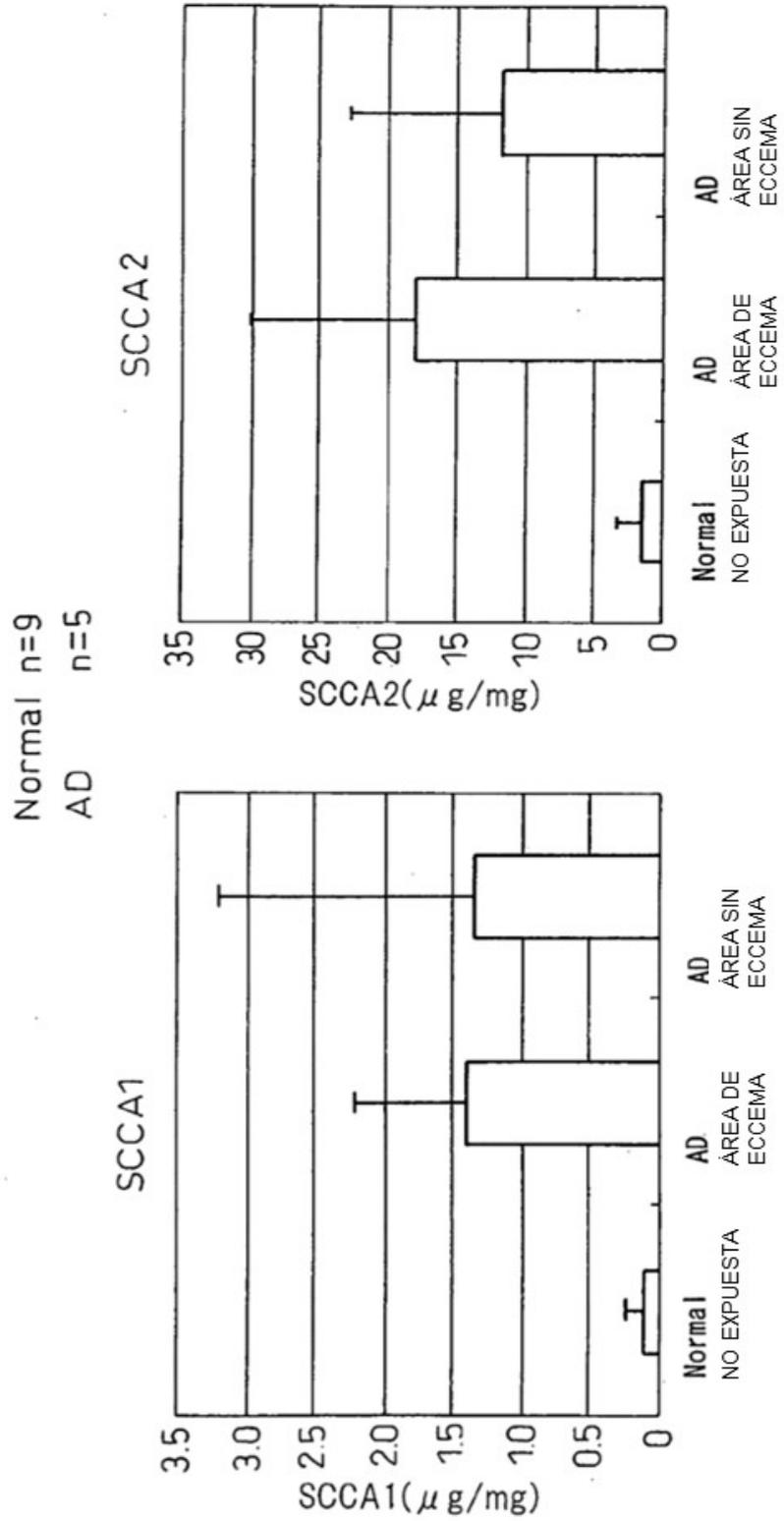


Fig.13

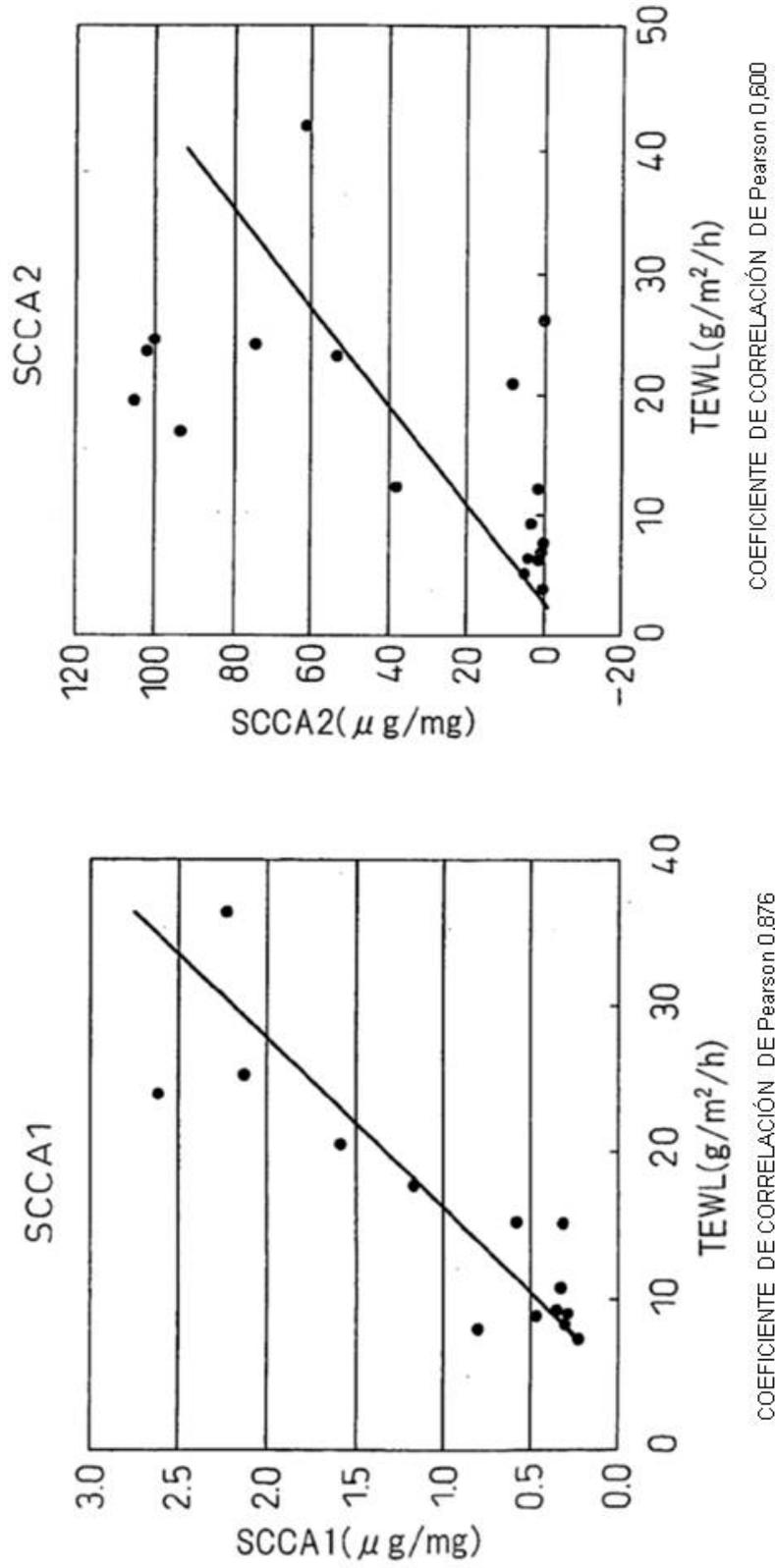


Fig.14

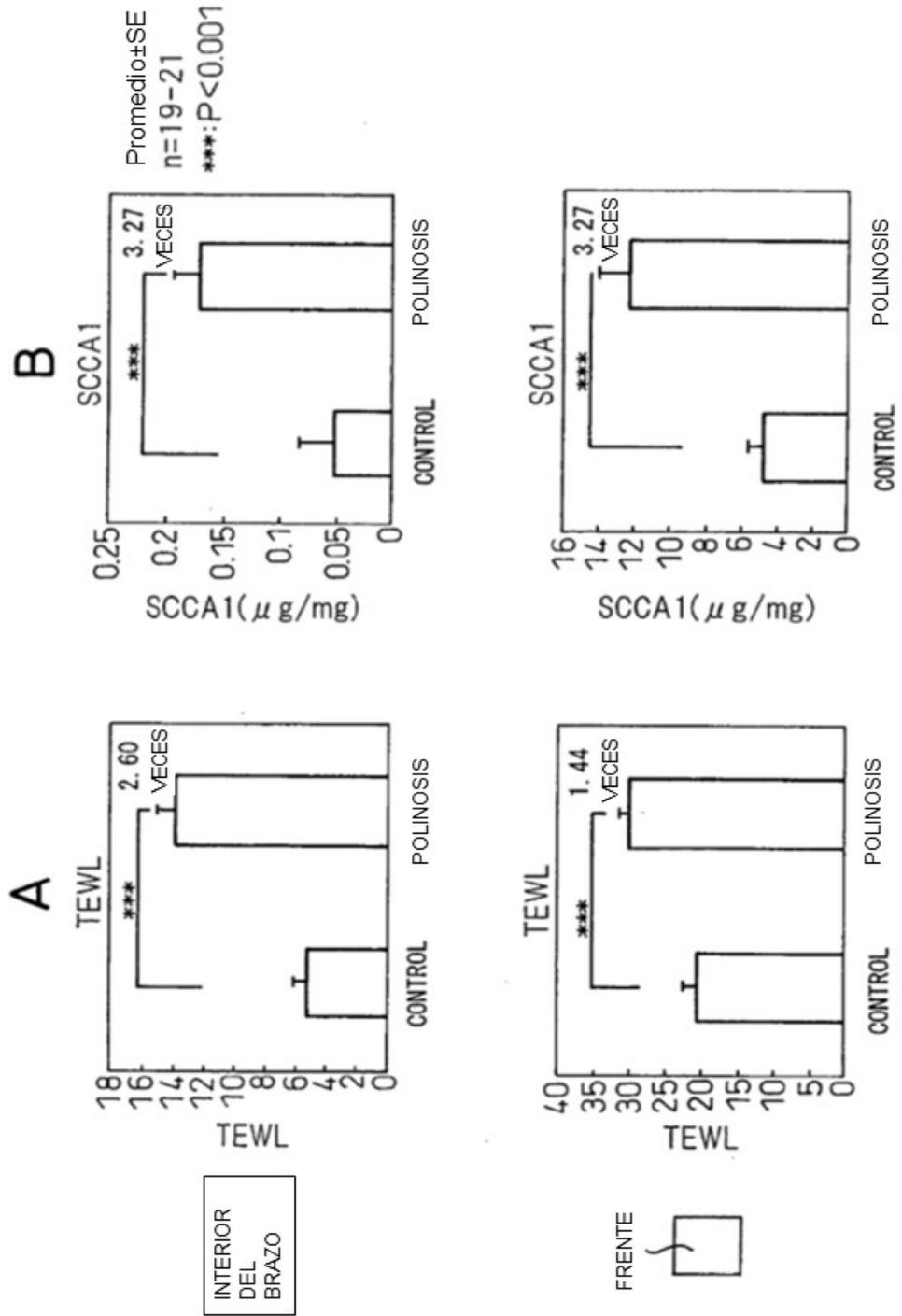


Fig. 15

