

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 406**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 8/72** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/EP2010/062891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO2011026909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10760274 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2473627**

54 Título: **Firma de microARN de la diferenciación epidérmica y sus usos**

30 Prioridad:

**01.12.2009 FR 0905789**  
**02.09.2009 US 239154 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARIONNET, CLAIRE y**  
**BERNERD, FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 620 406 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

Firma de microARN de la diferenciación epidérmica y sus usos

- 5 La presente invención se encuentra en el campo de la cosmética y se refiere a la piel. Se encuadra más generalmente en el contexto de la caracterización del estado de diferenciación epidérmica de la piel y del tratamiento de trastornos, afecciones o patologías relacionadas con la diferenciación epidérmica.
- 10 La epidermis es un epitelio multicapa que ejerce la función de barrera de protección contra su entorno y las agresiones del mismo. Se compone principalmente de queratinocitos, que proliferan en la capa más profunda de la epidermis y que entran en diferenciación migrando desde la profundidad hasta la superficie de la piel. En la superficie de la epidermis, los queratinocitos más diferenciados, llamados corneocitos constituyen el estrato córneo, altamente protector. Por tanto, la epidermis es a la vez el asiento de la multiplicación celular, que tiene lugar en la capa basal y también el asiento de la diferenciación celular, dentro de la capa intermedia, lo que conduce a la
- 15 formación de una estructura de protección bien diferenciada, el estrato córneo. El ciclo completo dura unos veinte días. Este programa corresponde a la expresión de muchos genes específicos que son sucesivamente activados y después reprimidos secuencialmente y de manera coordinada. Este programa implica un gran número de factores de transcripción, enzimas, lípidos y proteínas estructurales. Muchos factores de crecimiento, el calcio, los derivados de vitaminas las A y D3 son importantes reguladores de la proliferación y de la diferenciación de la de queratinocitos.
- 20 Algunos estados fisiológicos o patológicos, así como determinadas agresiones de la superficie de la piel o a través de la corriente sanguínea, conducen a la desregulación de este proceso de diferenciación epidérmica coordinado en el tiempo y en el espacio.
- 25 Entre las patologías cutáneas asociadas con cambios en el programa de diferenciación epidérmica se incluyen muchas enfermedades, genéticas o no [14-15], tales como psoriasis, dermatitis atópica, acné, ictiosis, síndrome de Netherton, pitiriasis rubra pilaris, queratosis pilar, la enfermedad de Darier, queratodermia palmoplantar y poroqueratosis.
- 30 En las circunstancias fisiológicas asociadas con los cambios en la diferenciación epidérmica cabe mencionar por ejemplo la edad con anomalías de la diferenciación terminal y una disminución en la función de barrera [17], la cicatrización que se caracteriza por un cambio de fase de la homeostasis epidérmica (hiperproliferación, migración, re-epitelización y restauración de la diferenciación terminal), xerosis invernal o asociadas con la edad (piel seca, con procesos de acumulación de escamas). [18]
- 35 En las alteraciones causadas por agentes externos que inducen los desajustes de los procesos de diferenciación epidérmica, cabe mencionar por ejemplo [19]: la exposición a la radiación UV solar, calor, agentes exfoliantes, agentes de descamación, agentes deslipidantes o agresiones mecánicas.
- 40 En casos de afecciones leves, se recomiendan emolientes y queratolíticos. Estos tratamientos no afectan al equilibrio proliferación/diferenciación, sino que están destinados a hacer que las lesiones sean tolerables para el paciente y con frecuencia tienen un efecto de suspensión.
- 45 Para afecciones más graves, se recomiendan el ácido retinoico y sus derivados, la vitamina D3, susceptibles de regular la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos, que se han utilizado durante varios años. En algunos casos, también se recomiendan metotrexato y ciclosporina. Todos estos tratamientos tienen efectos secundarios significativos, molestos para los pacientes.
- 50 Para caracterizar mejor el estado de diferenciación epidérmica de una piel o de un epitelio en cultivo del tipo "piel reconstruida" y para evaluar moléculas que pueden modular el proceso de diferenciación epidérmica, las herramientas técnicas disponibles en la actualidad son las siguientes:
- El análisis morfológico y los marcadores bioquímicos de las etapas de la diferenciación epidérmica (inmunohistoquímica). Es una técnica que no permite analizar, solo en términos muy amplios (histología topográfica) o marcador por marcador (inmunohistoquímica), las proteínas conocidas que intervienen en la
  - 55 diferenciación. Esta técnica no permite tener una firma del estado de la piel. Es engorrosa y requiere la disponibilidad de ciertas herramientas tales como anticuerpos que sean específicos de los marcadores buscados, lo cual no es siempre el caso. Por otro lado, es una técnica cuantitativa difícil.
  - Análisis del transcriptoma: es un método ampliamente utilizado para obtener la firma molecular de un tejido sano o enfermo. Esta técnica se basa en el análisis de la expresión de una muestra de transcritos de ARNm de una muestra. Es una técnica que puede ser muy general, con el uso de chips de ADN que pueden contener hasta
  - 60 12.000 genes. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes, especialmente porque requiere un equipo caro (por ejemplo, sistema de Affymetrix™) pero sobre todo porque genera una gran cantidad de datos que a menudo es difícil de usar ya que se debe contar con el apoyo de un servicio de bioinformática eficiente.
  - 65 – El análisis proteómico: permite hacer un balance de las ubicaciones globales del conjunto de las proteínas presentes en un tejido. Esta técnica utiliza muchas técnicas de electroforesis en gel de dos dimensiones y por lo

tanto es muy engorrosa de implementar. Además, la identificación más precisa de las proteínas requiere etapas adicionales y dispositivos muy caros y no requiere conocimientos especiales.

5 Por tanto, existe una necesidad de un método que permita caracterizar fácil y rápidamente el estado de diferenciación de la epidermis de una piel o del epitelio de un cultivo.

10 Los presentes inventores han demostrado, de una manera totalmente inesperada, la existencia de una firma de microARN de la diferenciación epidérmica, que permite no solo caracterizar el estado de la diferenciación epidérmica, sino también tener en cuenta los diversos tratamientos de los trastornos relacionados con la desregulación de este estado de diferenciación.

15 Los microARN (miARN) descubiertos en 1993 son pequeños ARN endógenos que están involucrados en la interferencia del ARN que pueden dirigirse a los ARN mensajeros (ARNm) y generar su degradación o prevenir la traducción. Por tanto, estos miARN juegan papeles reguladores muy importantes en la célula. Además, constituyen una clase de las moléculas reguladoras más abundantes. Tienen un origen endógeno, proceden del pri-miARN codificado por el genoma. Hasta la fecha se han identificado aproximadamente 700 microARN humanos. Sus funciones y objetivos no han sido aclaradas ni demostradas totalmente.

20 Juegan un papel crucial en la regulación de diversas vías celulares y pueden estar implicados en patologías humanas. Los miARN tienen un papel clave en la regulación del desarrollo, la diferenciación, proliferación y apoptosis (revisiones en [1] y [3]). Por ejemplo en los seres humanos, el miR-17-5p y miR-20 son reguladores de la proliferación [4], el miR-223 está involucrado en la granulopoyesis [5].

25 La desregulación de la expresión de los miARN puede contribuir al desarrollo de patologías humanas. Algunos miARN funcionan como supresores de tumores u otros como oncogenes. En la actualidad, existen muy pocos estudios de microARN en la piel, especialmente en la piel humana.

30 En la piel de los animales, los microARN expresados se han clonado por primera vez en ratones. Tienen un papel importante en la morfogénesis de la epidermis y del cabello. [8] Más recientemente, la participación de los microARN en el crecimiento del cabello se ha demostrado en cabras y ovejas. [10] Muy recientemente, en la piel del ratón, se ha identificado el microARN miR203 como uno de los principales intervinientes en la inducción de la diferenciación epidérmica, reduciendo el potencial proliferativo de la célula [11].

35 En los seres humanos, la expresión de los microARN se ha estudiado en la piel normal y se ha comparado con la de la piel psoriásica y el eczema de la piel. El microARN miR203 es altamente expresado en la piel (en comparación con otros órganos) y solo por los queratinocitos. Fue identificado como uno de los microARN sobreexpresado en la piel psoriásica ([12] y documento WO2008/142567) y los autores del documento WO2008/142567 han expuesto los resultados que sugieren una diferencia en la expresión de miR203 entre la capa basal y las capas suprabasales de la epidermis, sin sugerir ningún vínculo con el estado de diferenciación epidérmica de dichos queratinocitos.

40 Por último, se ha demostrado en los seres humanos que algunos microARN (miR-221 y miR-222) estaban involucrados en el control de la progresión del melanoma [13].

45 En la medida en que para cada microARN hay varias decenas de genes diana, los presentes inventores proponen:

- utilizar los microARN como marcadores de la diferenciación. Estos permiten un número mucho menor que los ARN mensajeros para producir perfiles de microARN de una situación, de un tejido, de forma más simple, más rápida y menos costosa que los métodos convencionales globales de transcriptómica;
- 50 – utilizar la firma molecular del microARN de la diferenciación epidérmica para la identificación de moduladores para el tratamiento de afecciones benignas o más graves asociadas con los trastornos de la diferenciación epidérmica. Por moduladores se entienden entidades químicas o de extractos naturales, formulaciones complejas, siARN, inhibidores de miARN como antagonistas, también sistemas instrumentales que utilizan la luz, efectos mecánicos sobre la piel, inyecciones;
- 55 – utilizar miARN o moduladores de estos miARN para el tratamiento cosmético o terapéutico en las afecciones de la diferenciación o de la proliferación epidérmica;
- utilizar la firma de miARN para evaluar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico de la diferenciación epidérmica;
- utilizar la firma molecular del microARN de la diferenciación epidérmica para diagnosticar una piel normal o patológica.

60 Con este fin, se propone utilizar el ensayo de la expresión de algunos microARN identificados.

65 En efecto, sorprendentemente, mediante el análisis sistemático de la expresión de microARN en los queratinocitos epidérmicos, los presentes inventores han demostrado que cuando se inicia el proceso de diferenciación epidérmica y da lugar a la formación de un estrato córneo, los microARN humanos miR-141, miR-148a, miR-182, miR-224, miR-

26a, miR-26b, miR-361-5p, miR-425, miR-455-3p, miR-92b estaban sobreexpresados en los queratinocitos epidérmicos diferenciados en relación con los queratinocitos no diferenciados proliferativos, los cuales no expresan marcadores de diferenciación epidérmica conocidos y no forman corneocitos. Por tanto, estos diez microARN representan una firma molecular de la diferenciación de los queratinocitos.

En cambio, en los queratinocitos muy indiferenciados y altamente proliferativos, los microARN humanos let-7i, miR-22, miR-221, miR-222, miR-29a, miR-29b, miR-663, miR-30a, miR-30c están sobreexpresados en los queratinocitos no diferenciados con respecto a la epidermis diferenciada. Estos nuevos microARN representan la inversa, un estado de indiferenciación epidérmica, asociado a una proliferación intensa.

La presente invención se refiere por tanto a esta firma de microARN de la diferenciación epidérmica y a diversos usos de esta firma, en particular, para evaluar o caracterizar un estado de diferenciación epidérmica, como una nueva herramienta de diagnóstico del trastorno de la diferenciación fisiológica o patológica, como una diana para corregir un defecto la diferenciación epidérmica o como biomarcador y herramienta de exploración para ensayar agentes moduladores de la diferenciación epidérmica. La presente descripción también divulga la utilización de los microARN de esta firma o moduladores de estos microARN, en aplicaciones terapéuticas y cosméticas, en particular en forma de composiciones.

En el contexto de la presente invención, los términos siguientes tienen más particularmente los siguientes significados:

MicroARN (o micro ARN o miARN): Los microARN son ARN de cadena simple, con una longitud de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos, más generalmente de 21 a 24 nucleótidos. Los miARN son represores que actúan después de la transcripción de un gen en ARNm: en efecto, se emparejan con los ARN mensajeros, los cuales guían su degradación o la represión de su traducción en proteína.

La producción de miARN se encuentra bajo el control estricto de una regulación transcripcional y post-transcripcional. Los genes de los miARN son transcritos por la ARN polimerasa en forma de largos transcritos primarios o precursores denominados "pri-miARN". Los precursores miARN se escinden enzimáticamente dentro del núcleo de la célula por una ARNasa III de clase 2 (Drosha) para formar los "pre-miARN". El "pre-miARN" es un ARN largo de aproximadamente 70 nucleótidos, doblado en tallo-bucle imperfecto por medio de bases complementarias entre la primera mitad y la segunda mitad de su secuencia. Los pre-miARN se exportan a continuación al citoplasma donde se unen a otra nucleasa (Dicer) y al complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que contiene las proteínas TRBP (proteína de unión a ARN sensible a la transactivación) y Ago2 (Argonauta 2). Debido a la unión, la proteína Ago2 escinde los extremos 3' del precursor de miARN, generando de este modo el dúplex miARN maduro. Solo la cadena específica del mRNA diana del miARN se mantiene (reacción termodinámica) en el complejo, la otra cadena es degradada y eliminada. El ARNm diana se carga a continuación en el complejo RISC y se degradada.

Aunque la represión de la traducción es la vía de extinción ("silenciamiento") más observada en las células animales, estudios recientes muestran que los miARN también pueden afectar a los niveles de ARNm diana.

HSA-miRxx: esta es la denominación de los micro ARN identificados en los seres humanos (hsa significa Homo sapiens). Las secuencias de todos los microARN conocidos se enumeran en las bases de datos tales como miRBase o microARNdb o son identificadas de manera única por sus números de acceso (xx). A continuación, el número hsa-miRxx se utiliza para referirse a la secuencia del miARN maduro.

En particular, los microARN indicados a continuación tienen la siguiente secuencia:

hsa-miR-141 : miARN maduro : UAACACUGUCUGGUAAGAUGG (SEQ ID N°1)  
 hsa-miR-148a : miARN maduro : UCAGUGCACUACAGAACUUUGU (SEQ ID N°2)  
 hsa-miR-182 : miARN maduro : UUUGCAAUGGUAGAACUCACACU (SEQ ID N°3)  
 hsa-miR-224 : miARN maduro : CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU (SEQ ID N°4)  
 hsa-miR-26a (hsa-miR-26a-1 y hsa-miR-26a-2): miARN maduro : UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU (SEQ ID N°5)  
 hsa-miR-26b : miARN maduro : UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU (SEQ ID N°6)  
 hsa-miR-361-5p : miARN maduro : UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC (SEQ ID N°7)  
 hsa-miR-425 : miARN maduro : AAUGACACGAUCACUCCGUUGA (SEQ ID N°8)  
 hsa-miR-455-3p : miARN maduro : GCAGUCCAUGGGCAUUAUACAC (SEQ ID N°9)  
 hsa-miR-92b : miARN maduro : UAUUGCACUCGUCCCGCCUCC (SEQ ID N°10)  
 hsa-let-7i : miARN maduro : UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU (SEQ ID N°11)  
 hsa-miR-22 : miARN maduro : AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU (SEQ ID N°12)  
 hsa-miR-221 : miARN maduro : AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUC (SEQ ID N°13)  
 hsa-miR-222 : miARN maduro : AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUC (SEQ ID N°14)  
 hsa-miR-29a : miARN maduro : UAGCACCAUCUGAAUCCGGUUA (SEQ ID N°15)  
 hsa-miR-29b : miARN maduro : UAGCACCAUUGAAUCCAGUGUU (SEQ ID N°16)

hsa-miR-663 : miARN maduro : AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC (SEQ ID N°17)  
 hsa-miR-30a : miARN maduro : UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG (SEQ ID N°18)  
 hsa-miR-30c : miARN maduro : UGUAAACAUCUACACUCUCAGC (SEQ ID N°19).

5 El sufijo "hsa" a veces se ha omitido en el contexto de esta descripción, sin embargo, se utiliza para designar a estos 19 microARN, descritos anteriormente.

10 Diferenciación epidérmica (queratinización o cornificación): fenómeno que se produce en el interior de la epidermis y que asegura la continua renovación de la piel humana. La diferenciación epidérmica incluye todos los eventos moleculares, bioquímicos y morfológicos que garantizan la transformación de la capa de células de la epidermis en una célula cornificada anucleada o corneocito, a través de diferentes etapas de la diferenciación epidérmica.

15 Esta diferenciación terminal permite la creación de estructuras especializadas como el estrato córneo que confiere al cuerpo una barrera efectiva contra el medio ambiente. Durante la diferenciación epidérmica, los queratinocitos de la capa más profunda de la epidermis se dividen para dar lugar a dos células hijas idénticas, una de las cuales permanece en su lugar mientras que la segunda migra a la capa superior, la capa de diferenciación, sufriendo cambios morfológicos y bioquímicos.

20 Queratinocitos no diferenciados (o indiferenciados o sin diferenciar) o queratinocitos basales (o de la capa basal o del lecho basal): queratinocitos que expresan las queratinas K5 y K14 y que tienen una actividad mitótica.

Queratinocitos diferenciados: queratinocitos que no tienen ya actividad mitótica y que han comenzado la diferenciación terminal, concretamente por la inducción de las queratinas K1 y K10.

25 Antagomir: se trata de una nueva clase de oligonucleótidos sintetizados químicamente. Se utilizan para extinguir ("silenciamiento") de la acción de los microARN endógenos. Un antagomir es un pequeño ARN sintético que es perfectamente complementario con un microARN diana, con una o más modificación(es) de base para inhibir la escisión de Ago2 (frecuentemente también se introducen otros cambios para que el antagomir sea más resistente a la degradación).

30 Los antagomirs se utilizan con frecuencia para inhibir la actividad constitutiva de los microARN específicos. Se han descrito numerosos antagomirs. Todos los miARN son susceptibles de ser específicamente inhibidos por un antagomir.

35 Solo la información de la secuencia del microARN diana es necesaria para el desarrollo de un antagomir capaz de inhibir la actividad de dicho microARN diana.

40 Otros inhibidores de miARN son por ejemplo miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes (Exiqon) o los miARN miScript Inhibitors de Qiagen.

La presente invención se refiere a una firma de microARN de la diferenciación epidérmica y por lo tanto una firma representativa del equilibrio entre la proliferación y la diferenciación.

45 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere más específicamente a un método para la determinación del estado de diferenciación epidérmica de un queratinocito humano en una muestra de epitelio humano. Dicho método incluye una etapa de determinar el nivel de expresión en dichos queratinocitos, habiéndose identificado los siguientes microARN por los inventores, concretamente, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c.  
 50 Estos 19 miARN son llamados microARN o miARN de la invención.

55 El nivel de expresión de los microARN se compara con el nivel medio de expresión de dichos miARN en los queratinocitos no diferenciados, preferiblemente los queratinocitos en cultivo no diferenciados o bien en los queratinocitos epidérmicos diferenciados.

Los métodos para la detección y cuantificación de los miARN son muchos y bien conocidos por los expertos en la materia. El Ejemplo 3 detalla las técnicas más utilizadas.

60 Por nivel medio de expresión de un microARN en los queratinocitos no diferenciados, incluyendo los queratinocitos en cultivo no diferenciados, o en los queratinocitos epidérmicos diferenciados se entiende el nivel de expresión generalmente observado en este tipo de células, preferiblemente el correspondiente al nivel medio de expresión determinado en al menos 5 queratinocitos diferentes, representativos de la población de los queratinocitos en cultivo no diferenciados, o bien representativos de la población de queratinocitos epidérmicos diferenciados. Preferiblemente, es el promedio de al menos 10 mediciones, incluso 20 o 100 mediciones diferentes.

65 Preferiblemente, los queratinocitos en cultivo no diferenciados, o los queratinocitos epidérmicos diferenciados en

cuestión son los queratinocitos que provienen de la misma cepa o de la misma población que la del queratinocito en estudio.

5 En el contexto de la puesta en práctica del método como se ha mencionado anteriormente, el queratinocito en estudio se considera como diferenciado o en proceso de diferenciación, si el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b es estadísticamente superior al nivel medio de expresión de dichos miARN en los queratinocitos no diferenciados, tales como los queratinocitos en cultivo no diferenciados.

10 Por nivel estadísticamente superior se entiende que la diferencia observada es significativa desde un punto de vista estadístico, concretamente que es superior a la desviación estándar. Un valor se dice que es estadísticamente superior a otro si la diferencia entre los dos valores es más importante que la incertidumbre que existe entre las mediciones.

15 Preferiblemente, el nivel superior es al menos 20 % mayor que el nivel medio, preferiblemente, es al menos superior al 50 %. De acuerdo con realizaciones particularmente preferidas, el nivel de expresión de los microARN es al menos igual a una vez y media el nivel medio de dichos microARN, preferiblemente es mayor que o igual a dos veces el nivel medio de los microARN seleccionados.

20 Preferiblemente, el nivel de expresión de al menos uno de los microARN seleccionados de hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b es estadísticamente superior a todos los niveles de expresión de dicho miARN en todos los queratinocitos en cultivo indiferenciados en los que se ha permitido alcanzar el nivel medio de expresión de dicho microARN.

25 En otra alternativa, la memoria descriptiva divulga que igualmente se podrá concluir que el queratinocito en estudio está diferenciado o en proceso de diferenciación, si el nivel de expresión de los microARNs hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c, es sustancialmente idéntico al nivel de expresión de dichos microARN en los queratinocitos epidérmicos diferenciados.

30 Preferiblemente, en el caso de al menos 2 o 3, 5, 8 o la totalidad de los microARN seleccionados entre hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c.

35 Por nivel sustancialmente idéntico se entiende que la diferencia en el nivel observado no es estadísticamente significativa, por ejemplo, es menor que la incertidumbre que existe en cuanto la medida del nivel de expresión de dicho microARN.

40 Por el contrario, en el contexto de la realización del método de la invención, se supondrá que el queratinocito en estudio es un queratinocito en un estado no diferenciado o poco diferenciado, si el nivel de expresión de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c es estadísticamente superior al nivel medio de expresión de tales microARN en los queratinocitos epidérmicos diferenciados.

45 En otra alternativa, la memoria descriptiva divulga que igualmente se podrá concluir que el queratinocito en estudio se encuentra en un estado no diferenciado, también llamado indiferenciado o sin diferenciar o en un estado poco diferenciado, si el nivel de expresión de al menos uno de los microARN seleccionados entre hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b es sustancialmente idéntico al nivel de expresión de dicho miARN en los queratinocitos epidérmicos no diferenciados. Preferiblemente, en el caso de al menos 2 o 3, 5, 8 o la totalidad de los microARN seleccionados entre hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b.

50 La presente invención se refiere igualmente a un método de evaluación de la diferencia en la diferenciación epidérmica existente en una muestra de epitelio humano. Mediante este método, es posible caracterizar el estado de diferenciación de esta muestra y así por ejemplo determinar si concuerda con el estado normal de diferenciación de un epitelio humano sano o bien característico de una patología.

55 De acuerdo con este método de la invención, es posible determinar la diferencia en la diferenciación epidérmica existente entre dos capas de queratinocitos de este epitelio, es decir, la diferencia que existe entre estas dos capas en términos de la diferenciación epidérmica y, por lo tanto, definir si una capa está en un estado más diferenciado que otra capa de este epitelio, o por el contrario en un estado proliferativo.

60 El método de evaluación de la diferencia en la diferenciación epidérmica de acuerdo con la invención comprende una etapa de comparación entre dos capas de queratinocitos de dicho epitelio, del nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c.

De hecho, como se detalla anteriormente, los inventores han demostrado la existencia de diferencias significativas en el nivel de expresión que existe a nivel de estos 19 microARN, los llamados microARN de la invención, en los queratinocitos altamente diferenciados y en los queratinocitos no diferenciados. El estudio de las diferencias en el nivel de expresión de estos microARN permite concluir la existencia de una diferencia entre el estado de diferenciación epidérmica de una capa, en relación con la otra capa de queratinocitos del epitelio en estudio.

Aunque es posible establecer una diferencia en el nivel de expresión de varios microARN entre las dos capas, la memoria descriptiva divulga que la diferencia en la diferenciación epidérmica se pone de relieve cuando hay un nivel significativamente diferente de expresión en una capa con respecto a otra, por al menos uno de los microARN de la invención.

Según este método, la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas se caracteriza concretamente por una mayor expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b en una capa con respecto a otra. La diferencia en la expresión de dichos microARN debe ser de un orden de magnitud tal que esta diferencia es significativa desde un punto de vista estadístico.

Preferiblemente, la diferencia en el nivel de expresión de los microARN es un factor igual o mayor que 1,3, preferiblemente mayor que 1,5, incluso igual a o mayor que un factor de 2.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas del epitelio se caracteriza por una mayor expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b en una capa respecto a la otra. La diferencia en el nivel de expresión de los microARN en una capa con respecto a la otra no es necesariamente un factor idéntico para todos los microARN de la lista.

Según este método, la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas también puede caracterizarse igualmente por una mayor expresión de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en una capa con respecto a otra. Una vez más, la diferencia en el nivel de expresión a la que se hace referencia significa una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico.

Preferiblemente, la diferencia en el nivel de expresión de los microARN es un factor igual o mayor que 1,3, preferiblemente mayor que 1,5, o incluso mayor que o igual a un factor de 2.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas del epitelio se caracteriza por una mayor expresión de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c, en una capa con respecto a otra. La diferencia en el nivel de expresión de los microARN en una capa con respecto a la otra no es necesariamente un factor idéntico para todos los microARN de la lista.

En el contexto de la presente invención, la muestra de epitelio, piel o epidermis en cuestión puede ser de diferentes fuentes, puede tratarse o bien de un epitelio cultivado, tal como un epitelio reconstituido tipo "piel reconstruida" o de una muestra obtenida de un individuo, tal como de una biopsia. Por lo tanto, dicha muestra puede ser de una piel humana.

La comparación del nivel de expresión de los microARN de la invención se puede realizar entre dos capas cualesquiera de la muestra de epitelio en estudio. Si es una muestra de piel humana, la comparación se realiza preferiblemente entre dos capas opuestas de queratinocitos, por ejemplo entre los queratinocitos de la capa basal y los de la capa córnea del epitelio. Cabe señalar aquí que los estudios recientes indican de hecho que los corneocitos producen o contienen microARN.

La comparación del nivel de expresión también se puede realizar entre dos capas suficientemente próximas de la muestra, por ejemplo, con el fin de resaltar las diferentes etapas de diferenciación.

La presente invención también se refiere a diversas aplicaciones de los métodos de caracterización descritos anteriormente y por lo tanto utiliza la firma de los microARN descritos por los inventores, en particular, como una herramienta de diagnóstico de los trastornos de la diferenciación, fisiológicos o patológicos, como un objetivo para corregir un defecto de la diferenciación epidérmica o como biomarcador y herramienta de exploración para el ensayo de moduladores de la diferenciación epidérmica.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere por tanto a un procedimiento para la determinación de la eficacia de un tratamiento llevado a cabo en un epitelio. Tal procedimiento comprende comparar antes y después del tratamiento, la firma de microARN de la diferenciación epidérmica del epitelio. Así, el procedimiento comprende comparar el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-

221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en los queratinocitos de este epitelio, antes y después del tratamiento, no realizándose dicho procedimiento en seres humanos.

De hecho, los inventores han demostrado la variación del nivel de expresión de los 19 microARN durante los procesos de diferenciación epidérmica que tienen lugar en la epidermis. La modificación del nivel de expresión de estos microARN por lo tanto es representativa de una modificación en el estado de diferenciación en respuesta al tratamiento probado. Una vez más, la modificación en el nivel de expresión significa una modificación significativa desde el punto de vista estadístico, por lo tanto, con intensidad suficiente y repetible, observable en un número significativo de queratinocitos representativos del epitelio en estudio.

Como alternativa, el procedimiento de determinación de la eficacia de un tratamiento aplicado a un epitelio en el sentido de la presente invención puede incluir también la comparación antes y después del tratamiento de ensayo de la diferencia de diferenciación epidérmica de este epitelio. De acuerdo con esta variante del procedimiento, por lo tanto, se determina, antes del tratamiento, la diferencia de diferenciación epidérmica existente entre dos capas del epitelio y se compara el resultado obtenido en cuanto a la diferencia en la diferenciación epidérmica existente entre estas mismas dos capas después del tratamiento. Por lo tanto, se determina si el tratamiento que se está probando ha modificado o no la diferencia existente entre estas dos capas, por ejemplo reduciendo la diferencia en el estado de diferenciación entre las dos capas, es decir, mediante la reducción de las diferencias en los niveles de expresión de los microARN de la invención entre las dos capas, o aumentando la diferencia en la diferenciación epidérmica. Dicho procedimiento no se realiza en los seres humanos.

El tratamiento probado mediante este procedimiento puede consistir en cualquier tratamiento. Preferiblemente, es la aplicación tópica de una molécula, por revestimiento o por inyección, preferiblemente subcutánea. La molécula aplicada puede ser una sola entidad química o la combinación o la asociación de diferentes entidades, pueden ser principios activos de moléculas naturales, proteínas, ARN, ADN, aceite esencial, entidad química resultante de extractos naturales, una formulación compleja de una molécula de ADN, un microARN, un siARN, un inhibidor de miARN, en particular un antagomir, etc.

Las moléculas particularmente preferidas en el contexto del tratamiento a ensayar de acuerdo con la invención incluyen especialmente los ARN, en particular los microARN o moléculas que modifican la expresión de los microARN naturales, tales como los inhibidores de miARN y concretamente los antagomirs.

Puede ser también la aplicación de la radiación electromagnética, independientemente de la longitud de onda, por ejemplo, longitudes de onda visibles, UV, IR o X. El tratamiento de acuerdo con la presente invención también abarca la aplicación de diferentes efectos mecánicos.

El procedimiento de la invención se considera eficaz si se provoca una modificación en el nivel de expresión de al menos un micro ARN de la invención dentro del epitelio en estudio. Preferiblemente, dicho tratamiento se considera eficaz si provoca la modificación del nivel de expresión de al menos dos, o incluso al menos cinco de dichos microARN en el epitelio. Dicho tratamiento puede causar una modificación en el nivel de expresión de al menos 10, 15 o incluso 19 microARN de la invención. Las modificaciones producidas en el nivel de expresión de los microARN de la invención no son necesariamente de la misma magnitud para todos los microARN.

Preferiblemente, en el sentido de la presente invención, un tratamiento probado se considerará eficaz si provoca una modificación en el nivel de expresión de al menos un microARN seleccionado de entre hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b concomitantemente con una modificación en el nivel de expresión en el sentido inverso al anterior de al menos un microARN seleccionado entre hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c. Por lo tanto un tratamiento efectivo en el sentido de la invención producirá un aumento en el nivel de expresión de al menos un microARN seleccionado entre hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b y, al mismo tiempo también la disminución del nivel de expresión de al menos un microARN seleccionado entre hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c.

También es posible mediante los métodos de determinación de la eficacia de un tratamiento de la presente solicitud, objetivar el efecto beneficioso de un agente, en particular de un producto cosmético por ejemplo de una composición cosmética, en cuanto a su efecto sobre el estado de diferenciación epidérmica de la piel. Los métodos de determinación in vitro descritos anteriormente se pueden utilizar en un protocolo de ensayo que permite determinar los productos susceptibles de ser calificados como agente que tiene un efecto sobre el estado proliferativo o diferenciado de los queratinocitos de la piel.

Además, mediante esta prueba, es posible promocionar el producto a los consumidores, destacando los resultados obtenidos con este producto en los métodos de determinación descritos en la presente invención. La evaluación del efecto sobre el estado de diferenciación epidérmica se basa en el estudio de la expresión de los microARN de la invención. La presente memoria descriptiva, por tanto, divulga igualmente un método para recomendar un producto

señalando que su efecto en un protocolo de ensayo consiste en un método de determinación como el descrito anteriormente. La memoria descriptiva, por tanto, divulga un método para la promoción de un producto cosmético que consiste en conseguir un estado de eficacia, acción o propiedad de dicho producto demostrada por al menos una prueba llevada a cabo como se describe anteriormente.

5 Dicha promoción del producto se puede hacer por cualquier canal de comunicación. Se pueden citar, en particular, por el vendedor, directamente en el punto de venta, a través de la radio y la televisión, sobre todo en el contexto de anuncios publicitarios. También se puede hacer por el canal de la prensa escrita o por medio de cualquier otro documento, en particular con fines publicitarios (folleto). También se puede hacer por Internet, o por cualquier otra red informática adecuada. También se puede hacer directamente en el producto, incluyendo en su envase o cualquier folleto que puede estar asociado con el mismo.

15 La presente invención, según un tercer aspecto, se refiere también a varios procedimientos para la exploración de moléculas por su acción sobre el proceso de la diferenciación epidérmica. En particular, la invención se refiere a un método de exploración de moduladores de los procesos de diferenciación epidérmica en un epitelio, que comprende evaluar el estado de la diferenciación epidérmica de los queratinocitos en este epitelio antes y después de la aplicación del modulador a explorar.

20 Tales procesos de exploración se realizan ex vivo o in vitro, por ejemplo, en epitelios en cultivo o en muestras de epitelio.

La evaluación del estado de diferenciación epidérmica de los queratinocitos en este epitelio se realiza mediante uno de los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

25 Como se ha descrito anteriormente, el epitelio al que se hace referencia puede ser un epitelio en cultivo, como un epitelio reconstituido, del tipo "piel reconstruida" o una muestra obtenida de un ser humano, por ejemplo durante una biopsia.

30 Como alternativa, la memoria descriptiva divulga igualmente un método de exploración de moduladores de los procesos de diferenciación epidérmica dentro de un epitelio, que comprende evaluar la diferencia en la diferenciación epidérmica de este epitelio, antes y después de la aplicación del modulador a explorar.

35 La evaluación de la diferencia en la diferenciación epidérmica de los queratinocitos de este epitelio se consigue mediante uno de los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

El modulador en cuestión puede ser cualquier entidad química, por ejemplo, derivados de extractos naturales o sintéticos, puede ser una formulación compleja, una molécula de ADN, un microARN, un siARN o un inhibidor de miARN tal como un antagomir, por ejemplo. Esta lista obviamente no es exhaustiva.

40 Como alternativa, el modulador puede ser un sistema instrumental que utiliza radiación electromagnética, preferiblemente una radiación visible de longitud de onda visible, UV, IR o X, o un sistema que utiliza efectos mecánicos.

45 De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de diagnóstico del estado de una epidermis, a través del uso de la firma de microARN presentada por los inventores. Un procedimiento de diagnóstico de este tipo comprende determinar la diferencia en la diferenciación epidérmica existente en la epidermis entre la capa basal y la capa córnea y comparar la diferencia en la diferenciación epidérmica media existente en la epidermis normal del mismo tipo entre la capa basal y la capa córnea.

50 La determinación de la diferencia en la diferenciación epidérmica se lleva a cabo utilizando diferentes métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Esta se lleva a cabo en una muestra de epidermis de la piel a diagnosticar.

55 La diferencia en la diferenciación epidérmica media existente en una epidermis normal del mismo tipo, entre la capa basal y la capa córnea, corresponde a un valor medio de varias mediciones llevadas a cabo en varias epidermis de sujetos cuya piel está sana y es del mismo tipo que la de la epidermis a diagnosticar. Por el mismo tipo, se entiende edad comparable, origen étnico y colores idénticos. Se trata de un valor medio que corresponde a un estado "normal" o "sano", exento de cualquier enfermedad o lesión de la epidermis.

60 Mediante este procedimiento de diagnóstico, con el que está bien establecido el perfil de microARN de la piel a diagnosticar y por comparación, se puede diagnosticar eventualmente el envejecimiento prematuro, un fotoenvejecimiento o los daños causados por la radiación solar, un envejecimiento o los daños causados por el estrés, el acné, u otro trastorno fisiológico o patológico.

65 De acuerdo incluso con otro aspecto, la presente solicitud tiene también por objeto la utilización del ensayo de la expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a,

hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en los queratinocitos en una muestra de epitelio humano para determinar el estado de diferenciación epidérmica de dichos queratinocitos.

5 De hecho, los presentes inventores han demostrado que este ensayo permite con la firma de microARN determinar la diferenciación epidérmica.

De acuerdo con un incluso otro aspecto, la memoria descriptiva divulga diversos usos, cosméticos y en terapia, de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o de moduladores de la expresión de dichos miARN y sobre todo particularmente de los inhibidores de miARN tales como los antagomirs.

De hecho, debido a la importancia de estos microARN en el proceso de diferenciación epidérmica de la piel, la modulación de su nivel en los queratinocitos puede influir en la diferenciación epidérmica, por ejemplo, reduciendo la velocidad o por el contrario acelerando con el fin de reducir o acelerar el proceso de renovación de la capa córnea. La modulación del nivel de los microARN de la invención en los queratinocitos se lleva a cabo preferiblemente mediante la introducción de los microARN de la invención, con el fin de aumentar su nivel en los queratinocitos, en particular, el uso de microARN para corregir la desregulación endógena de los microARN. La modulación también puede conseguirse mediante la introducción de moduladores de dichos microARN, preferiblemente, la introducción de inhibidores de miARN, por ejemplo antagomirs dirigidos a los microARN de la invención con el fin de reducir su nivel en los queratinocitos. Otros inhibidores de miARN específicamente contemplados dentro del alcance de esta invención incluyen miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

La memoria descriptiva divulga un microARN seleccionado entre los 19 microARN de la invención, o un modulador de este microARN, en particular, un inhibidor de miARN, tal como un antagomir, dirigido contra este microARN, para su uso terapéutico para el tratamiento de patologías de la piel asociadas con un programa de diferenciación epidérmica. Las patologías en cuestión son preferiblemente patologías que generan el mal funcionamiento de la diferenciación epidérmica.

Patologías consideradas especialmente en el contexto de esta memoria descriptiva incluyen psoriasis, dermatitis atópica, acné, ictiosis, síndrome de Netherton, pitiriasis rubra pilaris, queratosis pilar, enfermedad de Darier, queratodermia palmoplantar y poroqueratosis.

La memoria descriptiva divulga composiciones que comprenden al menos dos, posiblemente tres, preferiblemente al menos 5, 10, 15 o los 19 microARN de la invención para las aplicaciones terapéuticas mencionadas anteriormente o inhibidores de miARN, concretamente de antagomirs de al menos varios de estos microARN.

En cuanto a las aplicaciones terapéuticas, si el efecto terapéutico deseado es un aumento del estado de diferenciación epidérmica de la piel a tratar, la memoria descriptiva divulga composiciones que comprenden los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b para su uso en terapia, preferiblemente para el tratamiento de patologías de la piel asociadas con el programa de diferenciación epidérmica, incluyendo psoriasis, dermatitis atópica, acné, ictiosis, síndrome de Netherton, pitiriasis rubra pilaris, queratosis pilar, enfermedad de Darier, queratodermias palmoplantares y poroqueratosis. Las composiciones comprenden además de los microARN citados, inhibidores de miARN como los antagomirs dirigidos contra los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c para su uso en el tratamiento de dichas patologías. Otros inhibidores de miARN específicamente contempladas dentro del alcance de esta invención incluyen miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

En las situaciones en las que se requiere una estimulación de la diferenciación terminal, una composición o producto para la aplicación terapéutica mencionada, por lo tanto comprende:

- todos los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b o moduladores de estos microARN que provocan un aumento de la expresión e
- inhibidores de miARN, como antagomirs dirigidos contra los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o moduladores de estos microARN que provocan la represión de su expresión.

Los inhibidores de miARN específicamente contemplados dentro del alcance de esta invención incluyen especialmente antagomirs, miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

A la inversa, si el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, es retardar la diferenciación epidérmica, o bien promover el potencial de proliferación de los queratinocitos de la piel tratada, la memoria descriptiva divulga composiciones que comprenden los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c para su uso en terapia, preferiblemente para el tratamiento de patologías de la piel asociadas con el programa de diferenciación epidérmica, incluyendo psoriasis, dermatitis atópica, acné, ictiosis, síndrome de Netherton, pitiriasis rubra pilaris, queratosis pilaris, enfermedad de Darier, queratodermia palmoplantar y poroqueratosis. Las composiciones comprenden, además de los microARN citados, inhibidores de miARN, por ejemplo antagonismos dirigidos contra los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b para su uso en el tratamiento de dichas patologías.

En las situaciones en las que se requiere una reducción de la diferenciación terminal, una composición o producto para la aplicación terapéutica mencionada incluye por lo tanto:

- todos los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o moduladores de estos microARN que provocan un aumento de la expresión e
- inhibidores de miARN, por ejemplo, antagonismos dirigidos contra los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b o moduladores de estos microARN que provocan un aumento de la supresión de la expresión.

Los inhibidores de los miARN específicamente contemplados dentro del alcance de esta invención incluyen antagonismos, miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

Preferiblemente, las composiciones para su uso en terapia se formulan con excipientes farmacéuticamente aceptables para aplicación tópica o ingestión.

La presente divulgación también proporciona composiciones cosméticas que comprenden los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o bien un modulador de dichos microARN, preferiblemente un inhibidor de miARN, tales como un antagonismo dirigido contra uno de dichos microARN, en particular para aplicaciones cosméticas en una piel humana no patológica.

Los diversos usos enumerados en terapia o en cosmética, preferiblemente implican la aplicación tópica, local de microARN o la composición que comprende dichos microARN o inhibidores de dichos miARN, por ejemplo, antagonismos. Debido a su pequeño tamaño, los microARN y sus inhibidores son de hecho capaces de atravesar la membrana de los queratinocitos y cambiar el nivel de estos microARN en los queratinocitos tratados. Además, debido a su naturaleza fisicoquímica, es poco probable que lleguen a las capas más profundas de la piel, lo que limita su acción a la epidermis.

La estabilidad de los microARN y sus inhibidores, especialmente los antagonismos, sugiere que su acción es transitoria y, por lo tanto, esta memoria descriptiva divulga las aplicaciones de terapia o en cosmética que implican aplicaciones renovadas en la piel a tratar.

Por lo tanto, la memoria descriptiva divulga en particular un método de tratamiento de trastornos asociados a la diferenciación epidérmica en situaciones cosméticas fisiológicas, no patológicas, que comprenden la aplicación tópica a la piel de un individuo de un microARN seleccionado entre hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c y/o de un modulador de la expresión de uno de estos microARN, preferiblemente de un inhibidor de miARN, por ejemplo, de un antagonismo dirigido contra uno de estos microARN.

Los trastornos de la diferenciación epidérmica en situaciones cosméticas están asociados en particular a la edad, la dermatoheliosis, la sequedad de la piel o xerosis o a las agresiones químicas, especialmente mediante agentes exfoliantes, descamantes, deslipidantes o agresiones mecánicas. Estos trastornos no son patológicos y el tratamiento no debe ser considerado como un tratamiento terapéutico, sino exclusivamente un tratamiento cosmético, teniendo principalmente como objetivo el tratamiento de estos trastornos mejorar la apariencia de la piel y la comodidad la persona.

Más específicamente, los trastornos asociados a la edad consisten en modificaciones en la diferenciación epidérmica con el envejecimiento cronológico. De hecho, durante el proceso de envejecimiento, la epidermis sufre numerosas transformaciones que tienen repercusiones en el proceso de diferenciación epidérmica y en la formación de las capas córneas funcionales. De particular interés es un adelgazamiento de la epidermis, con un número muy reducido de capas suprabasales y una reducción en el compartimento proliferativo con una disminución en el número de células clonogénicas y, por lo tanto, también en el recambio epidérmico. Los marcadores de diferenciación clásicos, tales como el perfil de expresión de las queratinas se modifica con una expresión de las

queratinas 16 y 17 que no se encuentran en una epidermis joven y sana. La proporción de las queratinas K1 y K15 está reducida, así como la de la filagrina, principal componente de las capas granulares. La proporción de transglutaminasa 1 también se vio que disminuía con la edad. La función de barrera se deteriora con el aumento de la permeabilidad.

5 Los trastornos asociados con la dermatoheliosis o “foto-envejecimiento”, se entienden como las modificaciones ocurridas en la diferenciación epidérmica con la exposición crónica a la luz solar. Dicha piel “fotoenvejecida” se caracteriza en particular por el aspecto de cuero curtido y la presencia de arrugas más pronunciadas, esta piel también está modificada a nivel epidérmico, con una sobreexpresión de las queratinas K6, K16, K17 y una  
10 disminución de la filagrina y de la transglutaminasa. Estas alteraciones se han asociado a la formación de arrugas. Las proteínas SPRR implicadas en la formación de capas córneas también se ven afectadas por la radiación UV. También se sabe que la exposición aguda al sol provoca modificaciones epidérmicas que afectan a la función de barrera y a la homeostasis epidérmica.

15 Los trastornos asociados a la sequedad o xerosis se deben principalmente al hecho de que la piel seca se caracteriza principalmente por una disminución en el contenido de lípidos de la epidermis y una alteración de la capa córnea. Las queratinas 1 y 10 están reducidas y las queratinas K5 y K14 aumentadas. El nivel de expresión de la filagrina se ve alterado, así como el de la involucrina.

20 Las agresiones químicas, incluyendo las debidas a agentes exfoliantes, descamantes, deslipidantes y las agresiones mecánicas son responsables de las modificaciones en la homeostasis epidérmica e inducir alteraciones de la función barrera proporcionada por la capa córnea. El proceso de diferenciación epidérmica normal, permite restaurar la homeostasis epidérmica y la función de barrera normal.

25 Mediante la aplicación, preferiblemente tópica, de los microARN de la invención o de los inhibidores específicos de estos miARN, es posible tratar los diferentes trastornos no patológicos mencionados anteriormente, en aplicaciones cosméticas.

30 La presente memoria descriptiva también divulga composiciones o productos cosméticos, que comprenden al menos uno de los microARN de la invención o que comprende al menos un modulador de la expresión de uno de los microARN de la invención, para corregir o mejorar la apariencia de la piel, su textura, su brillo, sus imperfecciones o su microrrelieve. Un modulador de la expresión de uno de los microARN de la invención es un principio activo que provoca el aumento o la supresión de la expresión de uno de dichos microARN. Tal modulador activo de la expresión de uno de los microARN se identifica, por ejemplo, mediante los métodos de exploración descritos  
35 anteriormente o es un antagomir de un microARN de la invención.

El producto o composición cosmética en cuestión puede estar en cualquier forma galénica, por ejemplo, formulado como leche, crema, gel, nebulizador o jabón, para ser administrado por vía tópica, o en forma ingerible por vía oral.

40 Puede ser especialmente una combinación de diferentes principios activos, tales como una combinación de al menos dos microARN de la invención, o un microARN de la invención y un modulador de microARN de la invención, o dos moduladores de los microARN de la invención. También puede ser la combinación de un principio activo y de un instrumento, especialmente de un instrumento del tipo para el tratamiento mecánico, luminoso, eléctrico o electromagnético.

45 Dentro del ámbito de la presente memoria descriptiva, se divulgan especialmente productos cosméticos llamados “anti-envejecimiento” para reducir las imperfecciones de las superficies asociadas con los trastornos de la diferenciación y el aspecto apergaminado de la piel envejecida. También se contemplan productos cosméticos específicos para las pieles envejecidas expuestas al sol, restaurando una mejor calidad y modificando el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación epidérmica, gracias a los microARN de la invención o a los moduladores de dichos microARN.

50 La memoria descriptiva también divulga productos cosméticos para después del sol, para compensar las modificaciones en la diferenciación inducidas por la exposición aguda al sol. También se divulgan los productos que permiten regular los trastornos de la pigmentación al estimular la diferenciación epidérmica y la descamación de los queratinocitos con el fin de eliminar más rápidamente el exceso de melanina responsable del trastorno pigmentario.

60 Otros productos cosméticos son igualmente productos desarrollados específicamente para la piel seca, los cuales tienen un efecto hidratante, también por la modulación de las fases terminales de la diferenciación epidérmica. Los productos de reparación para mejorar el proceso de reparación cutánea durante la cicatrización también se contemplan dentro del alcance de esta invención. También es posible formular productos destinados a las pieles dañadas, ya sea en el contexto de procedimientos específicos (productos para después de la exfoliación, para después del láser...) o en situaciones cotidianas, tales como la contaminación, los productos hogar, etc.

65 Para situaciones en las que se requiere una estimulación de la diferenciación terminal con el fin de aumentar la función de barrera y la capa córnea, una composición o producto cosmético tal como se define en la presente

memoria descriptiva comprende:

- al menos uno, y preferiblemente al menos 2, 3, 5 o la totalidad de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b o de los moduladores de estos microARN que provocan un aumento de su expresión y/u opcionalmente
- inhibidores de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o moduladores de estos microARN que provocan la supresión de su expresión. Los inhibidores de los miARN específicamente contemplados dentro del alcance de esta invención incluyen antagomirs, miRCURY LNATM microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

Para las situaciones en las que se requiere una reducción de la diferenciación terminal y una reducción en la formación de las capas córneas, una composición o producto cosmético en el sentido de la presente memoria descriptiva comprende:

- al menos uno, y preferiblemente al menos 2, 3, 5 o la totalidad de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c o moduladores de estos microARN que provocan un aumento de su expresión y/u opcionalmente
- inhibidores de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b o moduladores de estos microARN que provocan la supresión de su expresión. Los inhibidores de los miARN específicamente contemplados dentro del alcance de esta invención incluyen antagomirs, miRCURY LNATM microRNA Knockdown Probes (Exiqon) y los miScript miRNA Inhibitors de Qiagen.

La presente invención también tiene por objeto un kit para determinar el estado de diferenciación de un queratinocito humano, que comprende medios para la determinación de la expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c y la mención a un nivel de referencia para la expresión de dichos microARN.

Un kit particularmente preferido en el contexto de la presente invención es un equipo de tal modo que el nivel de referencia es el nivel medio de expresión de dichos miARN en los queratinocitos en cultivo no diferenciados.

En otra alternativa, un kit de acuerdo con la invención se puede usar con un nivel de referencia que corresponde al nivel medio de expresión de dichos microARN en los queratinocitos epidérmicos diferenciados.

Las diversas realizaciones preferidas descritas más específicamente para uno o los otros aspectos de la invención son igualmente aplicables a otros aspectos de la invención.

#### Parte experimental:

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### Cultivo de queratinocitos humanos en monocapa

Se obtienen queratinocitos epidérmicos humanos normales de mamoplastia y se cultivan convencionalmente de acuerdo con el método de Rheinwald y Green, sobre una capa nutritiva de fibroblastos Swiss 3T3 previamente tratada con mitomicina.

##### Pieles reconstruidas

Las pieles reconstruidas in vitro que comprenden una epidermis estratificada y diferenciada con las capas córneas y una dérmica equivalente viva, están realizadas con queratinocitos humanos normales y fibroblastos dérmicos humanos normales.

Brevemente, los equivalentes dérmicos se realizan con colágeno I bovino y un millón de fibroblastos humanos de la dermis. Los queratinocitos normales se siembran después de la contracción de las redes a razón de 500.000 queratinocitos y se cultivan en el medio convencional durante 7 días. El cultivo se monta a continuación sobre la matriz para la fase de inmersión (interfase aire-líquido, 7 días).

Al final de este período, las pieles tienen una morfología muy similar a la piel humana normal. A continuación, se pueden utilizar para diferentes experimentos manteniendo el medio de cultivo debajo de la piel que es alimentado por capilaridad.

Extracción del ARN total de los queratinocitos

Lisis celular:

5 Los queratinocitos en cultivo en monocapa se someten a lisis en placa de cultivo en el tampón Tri Reagent.

Las epidermis reconstruidas de las pieles reconstruidas se separan de las dermis equivalentes utilizando fórceps. Estas epidermis se trituraron manualmente en frascos de vidrio en tampón de lisis Tri Reagent.

10 Extracción del ARN total

El ARN total se extrajo mediante la técnica convencional de lisis en solución de isotiocianato de guanidinio y después se extrajo gracias a una mezcla de fenol/cloroformo.

15 Hibridación de los microARN en los chips  $\mu$ Parafluo™ “MiRHuman 10.0”.

20 Los ARN pequeños se extraen del ARN total (filtro Microcon, Millipore) y se extienden en 3' con una cola de poliA. Un oligonucleótido marcado por fluorescencia se liga a la cola de poliA. Los ARN pequeños se hibridan a continuación en los chips  $\mu$ Parafluo™ “MiRHuman 10.0” (Atactic Technologies, LC Sciences). Estos contienen las secuencias complementarias a todos los microARN humanos enumerados en miRBase 10.0 (711 microARN maduros). Las secuencias se depositaron 5 veces en el chip. La fluorescencia se cuantifica y las señales se normalizan. La tasa de fluorescencia refleja el nivel de expresión de cada microARN en la muestra.

Análisis estadístico

25 La expresión de cada microARN se comparó estadísticamente entre la muestra “queratinocitos cultivados” y la muestra “queratinocitos en la epidermis reconstruida” mediante la prueba de la t de Student ( $p < 0,05$ ).

30 EJEMPLO 1: Lista de 10 microARN sobreexpresados en los queratinocitos de la epidermis reconstruida diferenciada en comparación con los queratinocitos en cultivo en monocapa no diferenciados.

35 Se utilizaron en el estudio tres líneas de queratinocitos normales humanos primarios obtenidos de mamoplastias (PH202, PH64 y PH63). La expresión de todos los microARN humanos conocidos se cuantificó, en los queratinocitos cultivados en monocapa, es decir, los queratinocitos no diferenciados (2D) y en paralelo en las epidermis reconstruidas con estos mismos queratinocitos (3D).

40 La expresión de cada microARN se comparó estadísticamente entre las muestras de “queratinocitos en cultivo” y la muestra “queratinocitos en la epidermis reconstruida” por medio de la prueba t de Student que da la probabilidad p. Cada microARN citado en la Tabla 1 tiene un nivel estadísticamente superior en la epidermis con respecto a los queratinocitos no diferenciados ( $p < 0, 05$ ) y esto para cada línea celular estudiada. La relación de la expresión 3D/2D se da para cada línea. Por ejemplo miR-141 es como promedio 2,3 veces más abundante en los queratinocitos derivados de la epidermis reconstruida que en los queratinocitos cultivados en monocapa.

45 Tabla 1: microARN sobreexpresados en los queratinocitos de la epidermis reconstruida (3D), es decir diferenciados, con relación a los queratinocitos en cultivo en monocapa (2D), es decir, no diferenciados.

Queratinocitos		2D		3D		Valor p	Relación 3D/2D	Media de la relación 3D/2D
Nombre del micro ARN		Media de la señal	Desviación estándar	Media de la señal	Desviación estándar			
hsa-miR-141	PH202	1047	127	1930	491	0,004	1,8	2,3
	PH64	526	68	1405	86	0,00002	2,7	
	PH63	916	111	2079	387	0,0002	2,3	
hsa-miR-148a	PH202	214	39	619	50	0,00008	2,9	4,1
	PH64	127	37	703	53	0,0002	5,5	
	PH63	117	21	466	49	0,000004	4,0	
hsa-miR-182	PH202	538	80	922	94	0,0002	1,7	1,6
	PH64	519	63	873	116	0,0003	1,7	
	PH63	530	38	724	58	0,0003	1,4	
hsa-	PH202	513	108	805	245	0,02	1,6	

Nombre del micro ARN	Queratinocitos		2D		3D		Valor p	Relación 3D/2D	Media de la relación 3D/2D
	Media de la señal	Desviación estándar	Media de la señal	Desviación estándar	Media de la señal	Desviación estándar			
miR-224	PH64	574	164	1085	278	0,005	1,9	1,8	
	PH63	393	90	723	138	0,002	1,8		
hsa-miR-26a	PH202	4673	495	7757	610	0,00007	1,7		
	PH64	4370	704	7025	681	0,001	1,6	1,6	
	PH63	4616	589	6707	346	0,002	1,5		
hsa-miR-26b	PH202	820	106	1110	82	0,004	1,4		
	PH64	654	175	1390	154	0,002	2,1	2,0	
	PH63	297	67	750	80	0,0005	2,5		
hsa-miR-361-5p	PH202	337	46	723	37	0,0001	2,1		
	PH64	505	88	1269	99	0,0001	2,5	2,3	
	PH63	369	58	853	36	0,0003	2,3		
hsa-miR-425	PH202	339	16	559	41	0,00002	1,6		
	PH64	416	71	551	67	0,02	1,3	1,4	
	PH63	502	44	581	22	0,02	1,2		
hsa-miR-455-3p	PH202	299	38	1053	96	0,0000005	3,5		
	PH64	284	64	1265	187	0,00003	4,5	3,7	
	PH63	325	50	1012	83	0,00001	3,1		
hsa-miR-92b	PH202	1104	107	1632	112	0,0002	1,5		
	PH64	1487	252	2400	150	0,001	1,6	1,5	
	PH63	1482	129	1906	135	0,002	1,3		

EJEMPLO 2: Lista de 9 microARN sobreexpresados en queratinocitos en cultivo en monocapa no diferenciados con respecto a los queratinocitos de la epidermis reconstruida diferenciados.

5 Se utilizaron en el estudio 3 líneas de queratinocitos humanos normales primarios obtenidos de mamoplastias (PH202, PH64 y PH63). La expresión de todos los microARN humanos conocidos se cuantificó, en los queratinocitos cultivados en monocapa, es decir, los queratinocitos no diferenciados y de forma paralela en las epidermis reconstruidas con estos mismos queratinocitos. La expresión de cada microARN se comparó estadísticamente entre la muestra “queratinocitos en cultivo” y la muestra “queratinocito en la epidermis reconstruida” utilizando la prueba t de Student que da la probabilidad p. Cada microARN citado en esta tabla tiene un nivel estadísticamente superior en los queratinocitos no diferenciados con respecto a los queratinocitos de la epidermis reconstruida ( $p < 0,05$ ) y esto para cada línea celular estudiada.

15 La relación de expresión 2D/3D se da para cada línea. Por ejemplo miR-29b es como promedio 6,7 veces más abundante en los queratinocitos cultivados en monocapa que en los queratinocitos de la epidermis reconstruida.

Tabla 2: microARN sobreexpresados en los queratinocitos en cultivo monocapa (2D), es decir, no diferenciados, con relación a los queratinocitos de la epidermis reconstruida (3D), es decir diferenciados

Nombre del micro ARN	Queratinocitos			2D			3D			
	Medida de la señal	Desviación estándar	Medida de la señal	Medida de la señal	Desviación estándar	Medida de la señal	Desviación estándar	Relación 3D/2D	Valor p	Medida de la relación 3D/2D
hsa-let-7i	PH202	2947	77	1211	111	1211	111	0,00003	2,4	2,4
	PH64	2573	297	1208	157	1208	157	0,00002	2,1	2,4
	PH63	3125	179	1178	90	1178	90	0,0000001	2,7	2,7
hsa-miR-22	PH202	2668	241	2316	96	2316	96	0,03	1,2	1,4
	PH64	2497	436	1645	155	1645	155	0,004	1,5	1,4
	PH63	3661	361	2386	155	2386	155	0,0002	1,5	1,5
hsa-miR-221	PH202	5556	792	3184	175	3184	175	0,0005	1,7	2,0
	PH64	3213	774	1844	117	1844	117	0,01	1,7	2,0
	PH63	5558	360	2321	75	2321	75	0,000001	2,4	2,4
hsa-miR-222	PH202	6069	637	3022	195	3022	195	0,00002	2,0	2,4
	PH64	3901	303	1867	106	1867	106	0,000001	2,1	2,4
	PH63	7763	505	2580	170	2580	170	0,00000003	3,0	3,0
hsa-miR-29a	PH202	7593	1191	3826	357	3826	357	0,00023	2,0	3,0
	PH64	9569	1407	2624	550	2624	550	0,00001	3,6	3,0
	PH63	11055	291	3258	272	3258	272	0,00001	3,4	3,4
hsa-miR-29b	PH202	1070	116	192	13	192	13	0,0000001	5,6	6,7
	PH64	734	136	96	40	96	40	0,0002	7,7	6,7
	PH63	947	60	135	18	135	18	0,0000007	7,0	7,0
hsa-miR-663	PH202	1537	157	564	31	564	31	0,000002	2,7	2,0
	PH64	1090	199	691	129	691	129	0,008	1,6	2,0
	PH63	2053	241	1233	110	1233	110	0,0001	1,7	2,0
hsa-miR-30a	PH202	707	46	404	28	404	28	0,0000004	1,7	1,9
	PH64	787	104	504	147	504	147	0,02	1,6	1,9
	PH63	901	89	374	38	374	38	0,000003	2,4	2,4
hsa-miR-30c	PH202	1667	111	990	77	990	77	0,00001	1,7	1,6
	PH64	2260	325	1315	115	1315	115	0,0004	1,7	1,6
	PH63	1619	216	1215	109	1215	109	0,009	1,3	1,3

EJEMPLO 3: Métodos de detección de los miARN.

Transferencia Northern:

- 5 Esta técnica convencional es cualitativa y cuantitativa. Permite el análisis de algunos miARN durante un experimento. Este método requiere el uso de 5 a 50 µg de ARN total.

RT Q-PCR

- 10 Este método permite el estudio de los precursores de los miARN y fue adaptado para el estudio de miARN maduros. Está comercializado (Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays) y se describe en varios artículos [23].

Microchip de miARN

- 15 Este método, como el de los microchips para ARNm convencionales, se basa en el marcado fluorescente de los ADNc complementarios de los miARN de una muestra y la hibridación de estos ADNc marcados en una placa en la que se depositan previamente las secuencias conocidas de los miARN [25].

- 20 Según algunos autores, esta tecnología de microchip de miARN, si integra regularmente nuevas secuencias de miARN obtenidas de miRBase sería el método de elección para el análisis del perfil global de la expresión de los miARN.

- 25 Por otra parte, en ciertas situaciones, tales como la presente invención, el perfil de expresión de los miARN es más informativo que el perfil de expresión de los ARN mensajeros.

Hibridación in situ de los microARN

- 30 Esta técnica es más sensible que la hibridación in situ convencional de los mARN, ya que mediante el método convencional de fijación, los ARN pequeños se difunden más que los ARN largos y se pierden durante las etapas de hibridación y de lavado. Se han desarrollado técnicas para superar este inconveniente, además existen en el mercado sondas de miARN (Exiqon, Dinamarca) [27].

Transgén indicador de miARN

- 35 En esta técnica, un gen indicador GFP o LacZ se coloca bajo el control de un promotor que incluye la parte 3'UTR complementaria de un miARN.

BIBLIOGRAFÍA

- 40 1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.  
 3. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132: 4653-62.  
 4. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-43.  
 45 5. Fazi F, Rosa A, Fatica A et al. A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123: 819-31.  
 8. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet.* 2006; 38: 356-62.  
 10. Wenguang Z, Jianghong W, Jinquan L et al. A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs. *OMICS.* 2007; 11: 385-96.  
 50 11. Yi R, Poy MN, Stoffel M et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 2008; 452: 225-9.  
 12. Sonkoly E, Wei T, Janson PC et al. MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? *PLoS.ONE.* 2007; 2: e610.  
 55 13. Felicetti F, Errico MC, Bottero L et al. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008; 68: 2745-54.  
 14. Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H et al. Inherited disorders of epidermal keratinization. *J Dermatol Sci* 1998; 18: 139-54.  
 15. Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2007; 157: 441-9.  
 60 17. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM et al. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J.Clin.Invest* 1995; 95: 2281-90.  
 18. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 6-15.  
 65

19. Marionnet C, Bernerd F, Dumas A et al. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1447-58.  
 23. Chen C, Ridzon DA et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179.  
 25. Vagin VV et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 2006; 313: 320-324.  
 27. Takada S et al. Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e115.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> L'OREAL	
	<120> Firma de microARN de la diferenciación epidérmica y sus usos	
15	<130> B08358A CS	
	<150> US 61/239154	
	<151> 02-09-2009	
20	<150> FR 09/05789	
	<151> 01-12-2009	
	<160> 19	
25	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 22	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
35	uaacacuguc ugguaagau gg	22
	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> ARN	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	ucagugcacu acagaacuuu gu	22
	<210> 3	
45	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
50	uuuggcaaug guagaacua cacu	24
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ARN	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
	caagucacua gugguuccgu u	21
	<210> 5	
60	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
65	uucaaguaau ccaggauagg cu	22

ES 2 620 406 T3

	<210> 6 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
5		
	<400> 6 uucaaguaau ucaggauagg u	21
10	<210> 7 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
15	<400> 7 uuaucagaau cuccaggggu ac	22
20	<210> 8 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 8 aaugacacga ucacucccggu uga	23
25	<210> 9 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 9 gcaguccaug ggcauuaca c	21
35	<210> 10 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 10 uauugcacuc gucccggccu cc	22
45	<210> 11 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 11 ugagguagua guuugugcug uu	22
50	<210> 12 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 12 aagcugccag uugaagaacu gu	22
60	<210> 13 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 13 agcuacauug ucugcugggu uuc	23
65	<210> 14 <211> 21	

## ES 2 620 406 T3

	<212> ARN <213> Homo sapiens	
5	<400> 14 agcuacaucu ggcuacuggg u	21
10	<210> 15 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
15	<400> 15 uagcaccauc ugaaaucggu ua	22
20	<210> 16 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
25	<400> 16 uagcaccauu ugaaaucagu guu	23
30	<210> 17 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
35	<400> 17 aggcggggcg ccgctgggacc gc	22
40	<210> 18 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 18 uguaaacauc cucgacugga ag	22
	<210> 19 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 19 uguaaacauc cuacacucuc agc	23

**REIVINDICACIONES**

1. Método de determinación del estado de diferenciación epidérmica de un queratinocito humano en una muestra de epitelio humano aislado, que comprende:
- 5
- determinar el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en dicho queratinocito y
  - 10 - comparar el nivel de expresión de los microARN con el nivel medio de expresión de estos microARN en queratinocitos en cultivo no diferenciados o en queratinocitos epidérmicos diferenciados, que proceden preferiblemente de la misma línea o de la misma población.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho queratinocito se considera diferenciado si el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b es estadísticamente superior al nivel medio de expresión de los microARN correspondientes en los queratinocitos en cultivo no diferenciados.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho queratinocito se considera no diferenciado si el nivel de expresión de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c es estadísticamente superior al nivel medio de expresión de los microARN correspondientes en los queratinocitos epidérmicos diferenciados.
4. Método de evaluación de la diferencia en la diferenciación epidérmica existente en una muestra de epitelio humano aislado, que comprende comparar entre dos capas de queratinocitos de dicho epitelio, el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas se caracteriza por una mayor expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425 y hsa-miR-92b en una capa en comparación con la otra, en un factor mayor que 1,3, preferiblemente mayor que 1,5.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la diferencia en la diferenciación epidérmica entre las dos capas se caracteriza por una mayor expresión de los microARN hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en una capa en comparación con la otra, en un factor mayor que 1,3, preferiblemente mayor que 1,5.
7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha muestra procede de piel humana o de un epitelio de cultivo de tipo "piel reconstruida".
8. Procedimiento de determinación de la eficacia de un tratamiento de un epitelio, que comprende comparar, antes y después del tratamiento, el nivel de expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en los queratinocitos de este epitelio, en el que dicho procedimiento no se lleva a cabo en los seres humanos.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho tratamiento se considera eficaz si provoca una modificación en el nivel de expresión de al menos uno, preferiblemente de al menos dos o cinco, de dichos microARN en el epitelio.
10. Procedimiento de exploración in vitro o ex vivo de moduladores del proceso de diferenciación epidérmica en un epitelio, que comprende evaluar el estado de diferenciación epidérmica de los queratinocitos en este epitelio mediante un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, antes y después de la aplicación del modulador a explorar.
11. Procedimiento de diagnóstico del estado de una epidermis, que comprende:
- determinar la diferencia en la diferenciación epidérmica existente en esta epidermis entre la capa basal y la capa córnea, utilizando un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 a 7 y
  - compararla con la diferencia en la diferenciación epidérmica media existente en una epidermis normal del mismo tipo, entre la capa basal y la capa córnea.
12. Uso de un ensayo de la expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-

miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c en los queratinocitos en una muestra de epitelio humano aislado, para la determinación del estado de diferenciación epidérmica de dichos queratinocitos.

- 5 13. Uso in vitro de un kit para la determinación del estado de diferenciación de un queratinocito humano, que comprende medios para el ensayo de la expresión de los microARN hsa-miR-455-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-148a, hsa-miR-182, hsa-miR-224, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-425, hsa-miR-92b, hsa-let-7i, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-663, hsa-miR-30a y hsa-miR-30c y la mención de un nivel de referencia para la expresión de dichos microARN.