

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 895**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/JP2012/073561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14038097**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12768911 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2893345**

54 Título: **Método para evaluar la celulitis y método para evaluar la eficacia de un fármaco contra la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

73 Titular/es:
**SHISEIDO COMPANY LTD. (50.0%)
5-5, Ginza 7-chome
Chuo-kuTokyo 104-0061, JP y
ETH ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:
**YOSHIDA, YUZO;
DETMAR, MICHAEL y
KAJIYA, KENTARO**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 895 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 la celulitis y método para evaluar la eficacia de un fármaco contra la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a un método para evaluar la celulitis y un método para evaluar la eficacia de un fármaco contra la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

Antecedentes de la técnica

- 10 La "celulitis" (también denominada lipodistrofia ginecoide) es un tejido que muestra una apariencia ondulada de la piel que se observa principalmente en el abdomen, muslos y glúteos de las mujeres, y es especialmente un problema cosmético, ya que afecta considerablemente a la apariencia de la piel. La patogénesis de la celulitis no se ha dilucidado completamente de manera teórica o médica, y se considera simplemente una acumulación de grasa subcutánea. Según un análisis no invasivo empleando MRI (Imagen de Resonancia Magnética, de sus siglas en inglés) realizado por Mirrashed, F. y Querleux, B et al., en la piel con celulitis no se observaron cambios morfológicos de las células y tejidos adiposos, pero en la piel con celulitis, se descubrió que una parte de los tejidos grasos subcutáneos se proyectaban profundamente en la capa dérmica (Bibliografía No-patente 1 y 2).

- 15 Debido a que el 40% de las mujeres adultas tienen celulitis, y a que la celulitis afecta significativamente a la apariencia estética, existe una gran demanda para aliviar, prevenir y tratar la celulitis, y en el mercado, tanto a nivel nacional como internacional, ya hay productos y tratamientos estéticos destinados a la celulitis. Sin embargo, ya que no se han dilucidado las características que definen a la celulitis y el mecanismo de formación de la misma, tales productos se dirigen normalmente a un producto que carece de datos eficaces o simplemente a agentes adelgazantes destinados a reducir la cantidad de grasa. Por tanto, en la actualidad hay muy poco que sea realmente eficaz para reducir, prevenir y tratar la celulitis, y aún no están disponibles comercialmente productos específicamente destinados a la celulitis.

- 20 Aunque hay pocas referencias que describan fármacos y/o tratamientos para mejorar la apariencia de la celulitis junto con datos experimentales sobre ellos, la nicotinamida, ácido linoleico conjugado y sulfocarbiosa se divulgan como fármacos que alivian la celulitis mediante la aplicación en la zona afectada con celulitis, junto con datos experimentales (Bibliografía Patente 1 y 2, y Bibliografía No patente 8), y además se describe ala estimulación ultrasónica de 1-4 MHz como un tratamiento para aliviar la celulitis (Bibliografía Patente 3). Aunque estas referencias describen datos que indican el efecto de aliviar la celulitis, no han demostrado de forma clara su mecanismo de acción, y por tanto, aún no se sabe si la reducción de la celulitis es causada por la reducción de la cantidad de grasa o si funciona otro mecanismo diferente a la reducción de grasa. La expresión de β -galactosidasa en los fibroblastos dérmicos se identificó como indicador para evaluar el envejecimiento de la piel (Bibliografía No patente 11).

- 35 Las investigaciones sobre la celulitis se llevan a cabo principalmente mediante la investigación del tejido cutáneo por medio de métodos no invasivos. Sin embargo, además de un problema relacionado al pequeño número de muestras de ensayo debido la naturaleza de los métodos no invasivos, sólo se ha obtenido información fragmentada. Por tanto, apenas se puede decir que la celulitis se haya investigado de forma sistemática. [Lista de referencia]

[Bibliografía Patente]

[PLT 1] WO99/47112

[PLT 2] WO01/17498

- 40 [PLT 3] WO2004/080147

[Bibliografía No patente]

[NPL 1] Mirrashed, P., et al., (2004); Skin Res Technol 10(3):161-8

[NPL 2] Querleux, B., et al., (2002). Skin Res Technol 8(2):118-242

[NPL 3] Mine, S., et al., (2008). PLoS One 3(12):e4066

- 45 [NPL 4] Ordway, G.A., et al., (2009). J. Neurosci Res 87(11):2430-8

[NPL 5] Erickson, H.S., et al., (2009). Nat Protoc 4(6):902-22

[NPL 6] McLaughlin, P.J., et al., (2007). Hum Mol Genet 16(24):3059-70

[NPL 7] Rahn, D.D., et al., (2009), Am J Pathol 174(1):206-15

[NPL 8] Hack, A.A., et al., (1998). J Cell Biol 142(5):1279-87

[NPL 9] Vogelgesang, R., et al., Int J Cosmet Sci 33(2):120-5

[NPL 10] Ana B R R et al., JEADV (2000) 14, 251-262

[NPL 11] Dimri, G. P., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9363-9367

Compendio de la invención

5 Problema de la técnica

Bajo las anteriores circunstancias, existe una necesidad para desarrollar un método para evaluar la celulitis, un fármaco destinado a mejorar la celulitis, y un método para evaluar tal fármaco.

Solución al problema

10 Los presentes investigadores han realizado investigaciones con el propósito de dilucidar las características histológicas y el mecanismo de formación de la celulitis, comprender más específicamente el fenómeno peculiar de la celulitis sobre el nivel tisular empleando una variedad de tejidos celulíticos y de tejido cutáneo, y además, con el propósito de dilucidar el mecanismo de aparición del fenómeno peculiar de la celulitis, emplear un método molecular biológico.

15 Más específicamente, 25 muestras de biopsias de tejidos cutáneos (aquí en lo sucesivo referido como piel celulítica) a partir de los glúteos y muslos de mujeres que tienen celulitis, y 19 muestras de biopsias de tejidos cutáneos (aquí en lo sucesivo referido como piel control de mujer) a partir de los glúteos y muslos de mujeres que no tienen celulitis, se sometieron a análisis tisular empleando tinción de hematoxilina eosina, tinción Sirius Red y tinción Elástica van Gieson.

20 Este análisis tisular reveló que la estructura papilar estaba significativamente reducida en la piel celulítica, que la capa de la dermis papilar en la parte superior de la capa dérmica en la piel celulítica era delgada en comparación con la piel control de mujer, mientras que en la piel celulítica no se observaron cambios marcados en la cantidad de fibras de colágeno que contienen colágeno, las fibras de elastina suelen ser más reducidas y alteradas, y que aunque en la piel celulítica no se encontraron cambios morfológicos en las células adiposas y en los tejidos adiposos propiamente dichos, se observaron cambios localizados en forma de proyecciones de grasa.

25 A partir de los descubrimientos histológicos anteriormente mencionados, se dedujo que la causa de la celulitis es doble: la formación de proyecciones de grasa dentro de la piel causada por el incremento de la cantidad de grasa, y los cambios, tales como la elasticidad reducida y el adelgazamiento de la dermis, que en caso contrario deberían jugar un papel amortiguador contra las proyecciones anteriores, conducen a la manifestación hacia el exterior de ondulaciones dentro de la piel. Por tanto, se encontró que la formación de la celulitis puede estar relacionada con no sólo a cambios localizados, tales como la grasa que sobresale, sino también con cambios en la capa de la dermis, a los que hasta la fecha no se les había prestado atención. Por lo tanto, se obtuvo un nuevo descubrimiento que indica que los fármacos adelgazantes destinados a la reducción de peso o a quemar grasa, son insuficientes para mejorar la celulitis, si bien se pueden requerir de fármacos o tratamientos eficaces que se enfrenten a los cambios dérmicos para mejorar la celulitis.

35 Para aclarar la causa de los cambios en las fibras dérmicas entre la piel celulítica y la piel control de mujer, los presentes inventores analizaron el nivel de expresión de los genes de los fibroblastos dérmicos, que constituyen las células más importantes de la dermis y determinan las propiedades de los mismos. Más específicamente, ya que el análisis empleando ARN derivado del tejido de la capa completa humana no puede identificar de forma precisa las propiedades de los fibroblastos debido al tipo de interferencia entre las células y/o órganos diferentes a los fibroblastos que constituyen la mayoría de la capa completa de la piel, los presentes inventores utilizaron un método de microdissección por láser (Bibliografía No patente 4 y 5) para extraer el ARNm de los fibroblastos dérmicos a partir de las disecciones del tejido cutáneo, y a continuación se realizaron los microarrays genéticos. Como un resultado, los presentes inventores han conseguido identificar una pluralidad de genes, cuyo nivel de expresión varía entre la piel celulítica y la piel control de mujer.

40 Como un resultado de examinar específicamente la expresión de los fibroblastos de la piel celulítica mediante el empleo de PCR cuantitativo para esta pluralidad de genes, se confirmó una expresión considerablemente reducida de fibulina-3 y sarcoglicano gamma en la piel celulítica (Figs. 4 y 6), y se observó además una tendencia similar mediante tinción inmunohistológica (Figs. 3 y 5).

50 La fibulina-3 es una de las proteínas extracelulares implicadas en la formación de las fibras elásticas, y, como una función común, se sabe que está relacionada con la formación de las fibras de elastina. (Bibliografía No-patente 6 y 7). Por otro lado, aunque la función del sarcoglicano gamma en la piel, que es un proteoglicano, no se ha demostrado, se conoce como una función común que el sarcoglicano gamma protege el sarcolema del fenotipo de funciones defectuosas individuales.

Por tanto, se piensa que la expresión reducida de fibulina-3 está implicada en la formación de celulitis, a través de la

formación anormal de fibras elásticas, específicamente de fibras de elastina, y la expresión reducida de sarcoglicano gamma también se cree que está implicada en la formación de la celulitis, mediante la función reducida de protección de la membrana celular en los fibroblastos. Sin embargo, la presente invención no debería limitarse por estos mecanismos.

5 Además, cuando se añadieron nicotinamida y ácido linoleico conjugado a células cultivadas, que se conocen por mejorar la apariencia de la celulitis, los presentes inventores encontraron que estos agentes mejoran la expresión de fibulina-3 y sarcoglicano de una manera dependiente de la dosis. Los presentes inventores, concluyeron, por lo tanto, que estos agentes pueden recuperar la normalidad del cambio en la fibra dérmica mejorando la expresión de fibulina-3 y sarcoglicano gamma que se habían reducido en la piel con celulitis, de este modo se puede mejorar la
10 apariencia de a celulitis (Figs. 7 y 8). Además, cuando se aplicó una estimulación ultrasónica de 1 MHz, que se conoce por mejorar la apariencia de la celulitis, no se encontraron cambios en la expresión de fibulina-3, pero se mejoró la expresión de sarcoglicano gamma. Por lo tanto, los presentes inventores concluyeron que el cambio en las fibras dérmicas de la celulitis se recuperó a la normalidad mediante la mejora de la expresión de sarcoglicano gamma (Fig. 9).

15 En base a la investigación anterior y a nuevos descubrimientos demostrados por los presentes inventores, los presentes inventores concluyeron que la expresión reducida de fibulina-3 y sarcoglicano gamma es la causa de la formación de la celulitis, y por tanto, han inventado un método para evaluar la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador, y un método para evaluar un fármaco para reducir, mejorar, prevenir o tratar la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

20 La presente divulgación se refiere a lo siguiente:

[1] Un método para evaluar la celulitis en una muestra de piel recolectada empleando la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

[2] El método de evaluación según el punto [1], en donde dicha muestra de piel es de dermis.

[3] El método de evaluación según el punto [1] o [2], en donde dicha muestra de piel es de fibroblastos dérmicos.

25 [4] Un método para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis, empleando en células cultivadas fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

[5] El método de evaluación según el punto [4] que comprende las:

añadir un fármaco candidato a las células cultivadas;

determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma; y

30 comparar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en el control con la expresión de fibulina-3 y/o de sarcoglicano gamma después de añadir el fármaco candidato.

[6] El método de evaluación según el punto [4] o [5] en donde dichas células cultivadas son fibroblastos dérmicos.

35 [7] El método de evaluación según cualquiera de los puntos [4] a [6], en donde cuando se mejoró la cantidad expresada de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la etapa de comparación anterior, el fármaco candidato se evalúa por tener una actividad de supresión de la celulitis.

[8] Un método para evaluar un método cosmético para aliviar la celulitis empleando la cantidad expresada de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

[9] El método de evaluación según el punto [8] que comprende las etapas de:

40 determinar la cantidad expresada de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis de la piel antes de aplicar el método cosmético;

aplicar el método cosmético;

determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis de la piel después de aplicar el método cosmético; y

45 comparar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis antes y después de aplicar el método cosmético.

[10] El método de evaluación según el punto [9] en donde cuando se mejora la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en comparación con la etapa anterior, el método cosmético se evalúa por tener una actividad de supresión de la celulitis.

[11] El método de evaluación según el punto [10] en donde la determinación de la expresión de fibulina-3 y/o

sarcoglicano gamma en la dermis de la piel anterior para una muestra recogida mediante microdissección láser, se realiza mediante PCR cuantitativo.

Efectos ventajosos de la invención

5 La presente invención permite evaluar la celulitis de forma apropiada en un organismo vivo empleando como indicador la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma. También, es posible la evaluación de un fármaco para la actividad de supresión o reducción de la celulitis, y es posible el cribado de un fármaco para tratar, prevenir o aliviar la celulitis, empleando la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador.

Breve descripción de los dibujos

10 [Fig. 1] La Fig. 1 muestra una foto de las apariencias de la piel control y de la piel con celulitis de mujer, y una foto tomada mediante tinción de la sección de piel con tinción Elástica van Gieson. En la piel control de mujer, las fibras de elastina se muestran por estar presentes densamente dispuestas en la dermis, mientras que en la piel con celulitis las fibras de elastina se muestran por estar presentes agregadas, y de forma escasa.

15 [Fig. 2] La Fig. 2 muestra una gráfica del grado de disposición de las fibras de elastina. La puntuación 1 significa que las fibras de elastina en la fotografía están alteradas, y que la cantidad de las mismas es baja. A medida que la puntuación incrementa, las fibras de elastina se disponen perfectamente, y la cantidad de las mismas es mayor.

[Fig. 3] La Fig. 3 es un dibujo que muestra la inmunotinción de fibulina-3 en la dermis. Se demostró que la expresión de fibulina-3 es mayor en la piel control de mujer que no padece de celulitis, mientras que la expresión de fibulina-3 es menor en la piel con celulitis.

20 [Fig. 4] La Fig. 4 es un dibujo que muestra el resultado de determinar la cantidad de ARNm de fibulina-3 en la dermis mediante PCR cuantitativo. Se demostró que en la piel control de mujer que no padece de celulitis, la expresión de fibulina-3 es mayor, mientras que la expresión de fibulina-3 es menor en la piel con celulitis.

[Fig. 5] La Fig. 5 es un dibujo que muestra la inmunotinción de sarcoglicano gamma en la dermis. Se demostró que en la piel control de mujer que no padece de celulitis, la expresión de sarcoglicano gamma es mayor, mientras que la expresión de sarcoglicano gamma es menor en la piel con celulitis.

25 [Fig. 6] La Fig. 6 es un dibujo que muestra el resultado de determinar la cantidad de ARNm de sarcoglicano gamma en la dermis mediante PCR cuantitativo. Se demostró que en la piel control de mujer que no padece de celulitis, la expresión de sarcoglicano gamma es mayor, mientras que la expresión de sarcoglicano gamma es menor en la piel con celulitis.

30 [Fig. 7] La Fig. 7 es un dibujo que muestra los cambios en la expresión de sarcoglicano gamma y fibulina-3 cuando se añadió ácido linoleico a los fibroblastos cultivados.

[Fig. 8] La Fig. 8 es un dibujo que muestra los cambios en la expresión de sarcoglicano gamma y fibulina-3 cuando se añadió nicotinamida a los fibroblastos cultivados.

[Fig. 9] La Fig. 9 es un dibujo que muestra los cambios en la expresión de sarcoglicano gamma y fibulina-3 cuando se aplicó una estimulación ultrasónica de 1 MHz a los fibroblastos cultivados.

35 Descripción de las realizaciones

40 La presente invención se refiere a un método para evaluar la celulitis en una muestra de piel cultivada empleando la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador. Más específicamente, la muestra cultivada es específicamente un tejido dérmico, más preferiblemente fibroblastos dérmicos. La muestra de piel se puede cultivar mediante cualquier método, pero en términos de cultivo sólo las células de interés, se cultivan preferiblemente mediante microdissección por láser.

45 El método para evaluar la celulitis de la presente invención permite evaluar la celulitis en sujetos que padecen celulitis de diferentes grados de gravedad, determinando la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en las muestras de piel obtenidas a partir de sujetos y determinando con antelación la relación entre la expresión y el grado de gravedad. Según el grado de gravedad de la celulitis, hay un método para clasificar la celulitis del grado 0 al 4 a partir de la apariencia de la piel (NLP 1). El criterio de clasificación del grado de gravedad de la celulitis es como se enumera en la siguiente tabla:

[tabla 1]

Gravedad de la celulitis (Grado)	Apariencia de la piel
0	Sin hoyuelos – piel lisa
1	Bajo número de pequeños hoyuelos visibles, poco profundos, escasamente localizados en los muslos
2	Número moderado de hoyuelos visibles (algunos grandes) en los muslos
3	Gran número de hoyuelos visibles (muy grandes) sobre la mayor parte de los muslos
4	Piel con apariencia como el requesón

5 Sin embargo, la clasificación de la gravedad no se debería limitar al método de clasificación anterior, se puede emplear cualquier clasificación. Por ejemplo, también es conocido en la técnica un método para clasificar la celulitis que no se basa en la apariencia de la piel, sino en la observación histopatológica y clínica (NLP10). Según este método de clasificación, la gravedad de la celulitis se puede clasificar como se describe en la siguiente tabla:

[tabla 2]

La gravedad de la celulitis (Grado)	Observación histopatológica y clínica
0	Sin manifestación de celulitis, tanto en la apariencia de la piel como en el tejido cutáneo interno
1	La etapa en donde no hay manifestación en la apariencia de la piel, no se observa cambio clínico, pero aparecen varios cambios en la piel interna
2	La etapa en donde en reposo no se presentan alteraciones de relieve, pero después de la compresión de la piel o después de la contracción muscular, se observa palidez, descenso de la temperatura y/o descenso de la elasticidad
3	La etapa en donde se observa en reposo una evidente piel acolchada y/o con apariencia de piel de naranja, y una sensación palpable de granulaciones delgadas en los niveles profundos, dolor a la palpación, descenso de la elasticidad, palidez y/o descenso de la temperatura
4	La etapa en donde existen las mismas características que en el grado III, con nódulos más palpables, visibles y dolorosos, adherencia en los niveles profundos y una obvia apariencia ondulada de la superficie de la piel

La evaluación de la celulitis en un sujeto se hace posible mediante la correlación con antelación de cada grado en estos métodos de clasificación, etc, con el nivel de expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma.

10 Empleando la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma de la presente invención como indicador, se puede diagnosticar la celulitis en una etapa temprana en la que no es visible en la superficie de la piel, de este modo es específicamente útil en una detección temprana y en la prevención de la celulitis. Si es posible una detección temprana de la celulitis, se permite activar cualquiera de las medidas preventivas que se tienen que tomar antes de que la celulitis aparezca en la superficie de la piel, es decir, antes de que la apariencia de la piel se afecte gravemente, y por tanto, esto es lo más preferible.

En otra realización de la presente invención, la presente invención se refiere a un método para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis mediante el empleo en células cultivadas de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador. Más específicamente, dicho método para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis puede comprender las siguientes etapas de:

- 20 añadir un fármaco candidato a las células cultivadas;
- determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma; y
- comparar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en el control con la expresión de fibulina-3 y/o

sarcoglicano gamma después de añadir el fármaco candidato. Además, cuando se mejoró la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma, se puede incluir en o después de la etapa de comparación, una etapa para determinar que el fármaco candidato tiene una actividad de supresión de la celulitis.

5 El método de la presente invención para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis, se puede emplear en métodos de cribado que permiten la selección de un fármaco candidato que tiene una actividad de disminuir la celulitis mediante el empleo de un fármaco candidato de estudio que contiene una variedad de fármacos candidatos, tal como un compuesto de estudio y un extracto de estudio. Por tanto, el método de la presente invención para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis, se dirige también a un método de cribado para fármacos.

10 La presente divulgación se refiere también a un método para evaluar un método cosmético para aliviar y/o mejorar la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador. Más específicamente, el método para evaluar un método cosmético comprende las etapas de:

determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis de la piel antes de aplicar el método cosmético;

15 aplicar el método cosmético;

determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis de la piel después de aplicar el método cosmético; y

20 comparar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis antes y después de aplicar el método cosmético. El método cosmético incluye, pero no se limita a, la aplicación de un cosmético, ejercicio, masaje y tratamiento ultrasónico. Cuando se mejora la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la dermis de la piel, específicamente en fibroblastos de la dermis de la piel, después de aplicar tal método cosmético en comparación, se puede determinar que es eficaz para aliviar y/o mejorar la celulitis. Tal método para evaluar un método cosmético se puede proporcionar no sólo para un individuo, sino también para una persona de ventas de cosméticos o un esteticista diferente a un médico.

25 Según la presente invención, la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma que se usa como indicador, se puede determinar mediante cualquier método siempre y cuando se pueda emplear en la investigación de la expresión genética, por ejemplo, se puede emplear la determinación de la cantidad de ARNm mediante PCR cuantitativo, la determinación de la cantidad de ARNm mediante transferencia de Northern, y la determinación de la cantidad de proteína mediante la transferencia de Western, ELISA o inmunoprecipitación. Desde el punto de vista
30 determinante, se puede preferir el empleo de una pequeña cantidad de una muestra recogida mediante microdissección por láser, para la determinación de ARNm mediante PCR cuantitativo.

En el método de la presente invención, se puede emplear como indicador la expresión de fibulina-3 y sarcoglicano gamma de forma individual, o se pueden emplear como indicador fibulina-3 y sarcoglicano gamma a la vez.

35 Según la presente invención, la expresión mejorada de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma significa que en relación a la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en el control, la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma después de añadir un fármaco candidato se incrementa, preferiblemente 20% o más, más preferiblemente 35% o más, y lo más preferiblemente 50% o más. El incremento en la expresión puede ser preferiblemente significativo estadísticamente.

40 La dermis es una estructura que se encuentra debajo de la epidermis, y la epidermis y la dermis se separan por la membrana basal. Los fibroblastos están presentes en la dermis, y la dermis anatómicamente se compone de dos capas, de la capa papilar y la capa reticular.

Las células cultivadas pueden ser cualquier célula siempre y cuando se deriven de células cutáneas. En vista de las células relacionadas con la celulitis, se prefieren específicamente las células dérmicas; más preferiblemente células cultivadas derivadas de fibroblastos de la dermis.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de secciones de tejido

50 El análisis tisular se realizó empleando 25 muestras (aquí en lo sucesivo referidas como piel celulítica) de biopsias de tejido cutáneo obtenidas de los glúteos y/o los muslos que mostraban apariencia celulítica, 19 muestras (aquí en lo sucesivo referidas como piel control) de biopsias de tejido cutáneo obtenidas de los glúteos y/o los muslos que no mostraban apariencia celulítica. Todas las biopsias de los tejidos cutáneos se obtuvieron de mujeres. Las biopsias de los tejidos cutáneos se embebieron en un medio compuesto OCT (de temperatura de corte óptimo) (Sakura Finetek) para tejidos congelados, y los portaobjetos de la sección congelada se prepararon empleando un instrumento criostato de preparación de sección congelada (Leica).

Ejemplo 2: Tinción histoquímica

Después de secar al aire las secciones de los tejidos obtenidas en el Ejemplo 1, se sometió a cada sección de tejido a tinción Elástica de van Gieson empleando reactivos de tinción Elástica de van Gieson (Merck) según el método descrito en las instrucciones. A partir del resultado de la tinción Elástica de van Gieson se alteró el alineamiento de las fibras de elastina en la dermis de la piel con celulitis, y las fibras de elastina se agregaron y disminuyeron en comparación con la piel control (Figura 1). Para indicar claramente este punto, se seleccionaron de forma aleatoria catorce muestras de secciones tisulares con celulitis y nueve muestras control de secciones tisulares control, y después se puntuaron en un ensayo ciego por dos observadores. Se determinó que la puntuación consistía de cinco grados de progreso, y cuando la puntuación era 5, que era la de mayor grado, se determinaron las fibras de elastina por ser ricas y alinearse perfectamente en la dermis, mientras que cuando la puntuación era 1, que era la de menor grado, las fibras de elastina se determinaron por estar disminuidas y desordenadas. Las puntuaciones medias determinadas por los dos observadores se dividieron en el grupo con celulitis y el grupo control, y se marcaron respectivamente para determinar la tendencia de las puntuaciones. Como resultado, se demostró que el alineamiento de las fibras de elastina en el grupo con celulitis estaba alterado, y las fibras de elastina en el grupo con celulitis estaban agregadas y disminuidas (Figura 2). A partir de estos resultados, los presentes inventores concluyeron que las fibras de elastina cutáneas, que deberían jugar un papel como un amortiguador contra las ondas formadas por la proyección de grasa en la dermis, están agregadas y reducidas, de este modo las ondas formadas por proyección de la grasa en la dermis aparecen en la superficie de la piel para formar la celulitis.

Después de secar al aire las secciones tisulares obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó la tinción inmunohistológica de fibulina-3 y sarcoglicano gamma como sigue. Después de fijar las secciones tisulares en PFA 4% durante 15 minutos, las secciones tisulares se lavaron con PBS, y se sometieron a tinción inmunológica empleando el sistema de Amplificación de la Señal de Tiramida libre de Biotina CSAll (DAKO) según el protocolo de DAKO. Los anticuerpos empleados fueron el anticuerpo anti-humano de fibulina-3 (Santa Cruz) y el anticuerpo anti-humano de sarcoglicano gamma (Abcam). Después de la tinción DAB, las secciones se montaron con un agente de montaje y un cubreobjetos, y se examinaron bajo el microscopio, tal como un microscopio fluorescente (Olympus) y se tomaron fotos (Figs. 3 y 5).

Ejemplo 3: Extracción de trazas de ARN derivado de fibroblastos de las secciones de tejido cutáneo, síntesis de ADNc y amplificación

Se prepararon portaobjetos de la sección tisular a partir de las secciones tisulares preparadas con un instrumento criostato de preparación de sección congelada (Leica), empleando portaobjetos de membrana de vidrio PEN (Dispositivo Molecular), y después se tiñeron empleando un kit de tinción para sección congelada (Arcturus). Posteriormente, los portaobjetos de la sección tisular se sumergieron durante 30 segundos en etanol 75% preparado con agua destilada libre en RNasa (aquí en lo sucesivo referido como agua destilada) sumergida durante 30 segundos en agua destilada, y a continuación se tiñeron durante 20 segundos en 100 µl de disolución de tinción Histogene (Arcturus). Después de lavar en agua destilada durante 30 segundos, los portaobjetos se sumergieron y se deshidrataron en series de etanol 75%, 95% y 100%, y en xileno durante 30 minutos, respectivamente. Los portaobjetos de sección tisular decolorados y deshidratados se fijaron en un instrumento Veritas de microdissección láser (Arcturus), y se microdisseccionaron áreas que contienen fibroblastos, que son células individuales localizadas en la dermis, procurando al mismo tiempo no contaminar con vasos sanguíneos u otros órganos auxiliares. Posteriormente, se llevo a cabo la extracción y purificación de trazas de ARN empleando el kit Micro Plus Rneasy (Qiagen). Se colocó un área de la sección que contiene fibroblastos microdisseccionados en un tubo de 500 µl que contiene 350 µl de tampón plus RLT que contiene mercaptoetanol 1%, a fin de extraer el ARN. Después, según el protocolo de Qiagen, las trazas de ARN se purificaron y se aislaron. Después de enfriar sobre hielo, se transfirió a un proceso de síntesis de ADNc. Empleando el Sistema Pico WTOvation (NuGEN) según el protocolo proporcionado, el ADNc monocatenario se sintetizó en base al ARN extraído como patrón, y a continuación se amplificó. La síntesis y amplificación de ADNc se confirmaron utilizando el Bioanalizador 2100 (Agilent). La concentración se determinó utilizando un instrumento Nanodrop de cuantificación de ácido nucleico (Thermo Scientific).

Ejemplo 4: PCR cuantitativo de fibulina-3 y sarcoglicano gamma

El PCR cuantitativo se llevo a cabo usando como patrón el ADNc sintetizado, y usando además un reactivo de reacción LightCycler (marca comercial registrada) FastStar DNA MasterPlus SYBR Green (Roche), y un instrumento de reacción LightCycler (Roche) o un Sistema PCR a Tiempo Real AB 7900 HT Fast (Applied Biosystems). La condición para la composición fue como se describe en el protocolo de Roche. La temperatura de re-asociación de los cebadores se estableció a 60°C, y se cuantificó empleando el método $\Delta\Delta C_t$.

La secuencia de información de los pares de cebadores empleados en el PCR cuantitativo fue como sigue:

G3PDH sentido: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
 antisentido: 5'-TGGGATTTCCATTGATGACA-3'
 ARNr 18S sentido: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

antisentido: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

Fibulina-3 dsentido: 5'-GCTTCCGTTGTTATCCACGAAATCC-3'

antisentido: 5'-CTGTATCTGGAAGATGTCTGATGGC-3'

sarcoglicano gamma sentido: 5'-GAGGCCAGAGAATCAGTATGTCTAC-3'

5 antisentido: 5'-CCATCTTTTGTACACACAAGTGGCC-3'

Se corrigió la cantidad de ADNc en el grupo control, y se comparó la expresión de fibulina-3 y sarcoglicano gamma entre la piel control de mujer y la piel con celulitis, respectivamente. Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 6.

Ejemplo 5: Experimento tras la adición de fármacos conocidos para mejorar la celulitis

10 Se colocaron los fibroblastos derivados del tejido cutáneo humano en una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno tipo I (IWAKI), y se incubaron hasta una confluencia de 70-80% en un suero fetal bovino 10% enriquecido con DMEM (Gibco/Invitrogen) bajo la condición de 37°C y CO₂ 5%. Después de reemplazar con un medio libre en suero durante medio día, se reemplazó además con un medio libre de suero con diferentes concentraciones de ácido linoleico conjugado (Sigma) (0,001% v/v, 0,01% v/v) o nicotinamida (Sigma) (0,0005% v/v, 0,005% v/v). 24 horas después, se recuperó el ARN empleando un kit mini RNeasy (Quiagen) según el protocolo de Qiagen. Como
15 un control, se preparó y recuperó el ARN mediante sustitución del medio con un medio libre de suero intacto, y recuperando el ARN 24 horas después de su uso. Se determinó la concentración del ARN recuperado empleando un instrumento Nanodrop de cuantificación de ácido nucleico (Thermo Scientific). Después de ajustar la concentración de ARN del grupo control comparativo a la misma concentración, se sintetizó el ADNc a partir del ARN empleando un kit de síntesis de ADNc, un kit de transcripción inversa del ADNc de Alta capacidad (Applied Biosystems) según
20 el protocolo de Applied Biosystem. Empleando un método descrito en el Ejemplo 4, en la Fig. 7 y en la Fig. 8, se muestran los cambios en la expresión de fibulina-3 y en la expresión de sarcoglicano gamma cuando se emplearon fármacos conocidos que mejoran la celulitis.

Ejemplo 6: Sonicación de células cultivadas

25 Se colocaron los fibroblastos derivados del tejido cutáneo humano en una placa pocillo de 35 mm (Becton Dickinson), y se cultivaron hasta una confluencia de 70-80% en un suero fetal bovino 10% enriquecido con DMEM (Gibco/Invitrogen) bajo la condición de 37°C y CO₂ 5%. Después de reemplazar con un medio libre en suero durante medio día, se reemplazó además con un medio libre de suero fresco, y se sometió a una estimulación ultrasónica de 1 MHz a una distancia de 0,5 mm empleando una máquina cosmética ultrasónica (Matsushita Denko). El tiempo de estimulación se estableció en 20 segundos, considerando que las células se estimularon de forma directa. Después
30 de 24 horas de estimulación, se recuperó el ARN según el protocolo de Qiagen. La concentración del ARN recuperado se determinó empleando un instrumento Nanodrop de cuantificación de ácido nucleico (Thermo Scientific). Después de ajustar la concentración de ARN del grupo control comparativo a la misma concentración, se sintetizó el ADNc a partir del ARN empleando un kit de síntesis de ADNc, un kit de transcripción inversa del ADNc de Alta capacidad (Applied Biosystems) según el protocolo de Applied Biosystem. Empleando un método descrito en el
35 Ejemplo Práctico 4, en la Fig. 9 se muestran los cambios en la expresión de fibulina-3 y en la expresión de sarcoglicano gamma cuando se llevó a cabo la sonicación.

Lista de secuencias

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

40 <120> Método para evaluar la celulitis y método para evaluar la eficacia de un fármaco contra la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador

<130> AA680-PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

45 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de G3PDH

50 <400> 1

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador inverso de G3PDH

<400> 2
 tgggatttcc attgatgaca 20

10 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de 18S rRNA

15 <400> 3
 cggctaccac atccaaggaa 20

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso de 18S rRNA

<400> 4
 gctggaatta ccgcggt 18

25 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo de Fibulina-3

30 <400> 5
 gcttccgtg ttatccacga aatcc 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador inverso de Fibulina-3

<400> 6
 ctgtatctgg aagatgtctg atggc 25

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo de Sarcoglicano gamma

<400> 7
 gaggccagag aatcagtatg tctac 25

50 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA

ES 2 647 895 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de Sarcoglicano gamma

<400> 8

5 ccatcttttg ttacacaaa gtggcc 26

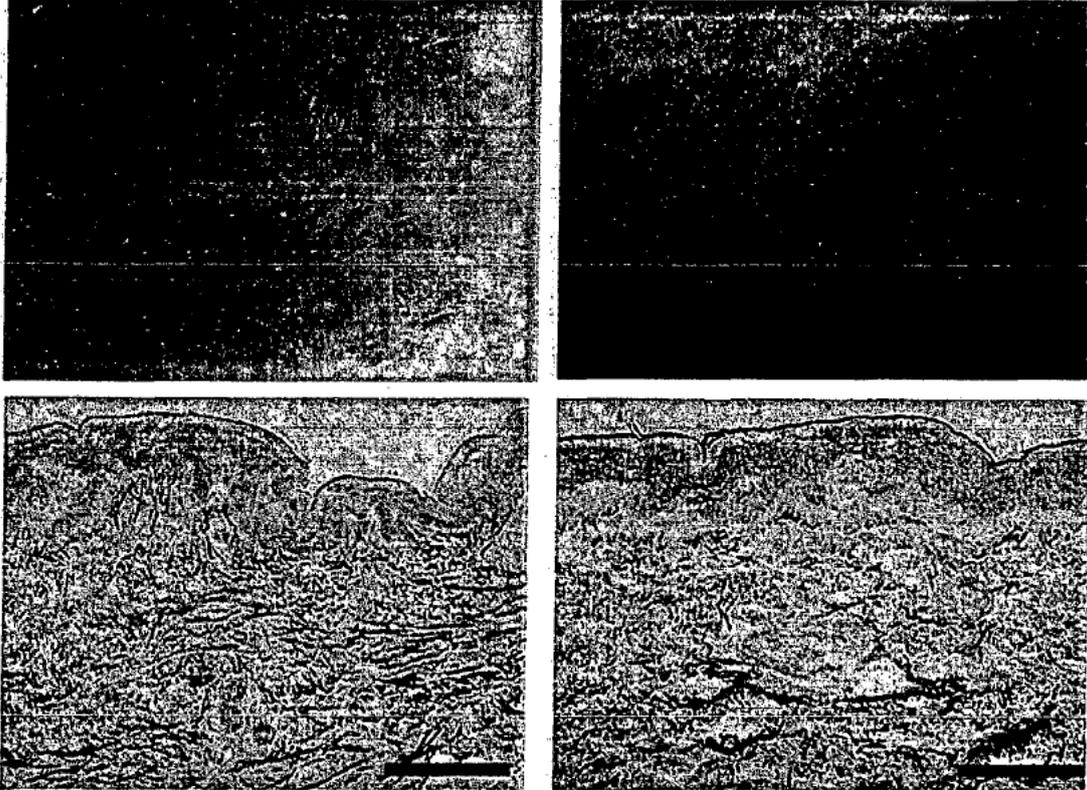
REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la celulitis, que comprende determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en una muestra de piel recogida y determinar el grado de gravedad de la celulitis empleando como indicador la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma.
- 5 2. El método de evaluación según la reivindicación 1, en donde dicha muestra de piel es dermis.
3. El método de evaluación según la reivindicación 1, en donde dicha muestra de piel es de fibroblastos cutáneos.
4. Un método para evaluar un fármaco para mejorar, prevenir o tratar la celulitis empleando fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma como indicador en células cultivadas, que comprende las etapas de:
 - 10 añadir un fármaco candidato a las células cultivadas;
 - determinar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma;
 - comparar la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en el control con la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma después de añadir el fármaco candidato; y
 - 15 evaluar el fármaco candidato por tener una actividad de supresión de la celulitis, cuando se mejoró la expresión de fibulina-3 y/o sarcoglicano gamma en la etapa de comparación anterior.
5. El método de evaluación según la reivindicación 4, en donde dichas células cultivadas son fibroblastos cutáneos.

Fig. 1

piel control de mujer

piel con celulitis



200um

Fig.2

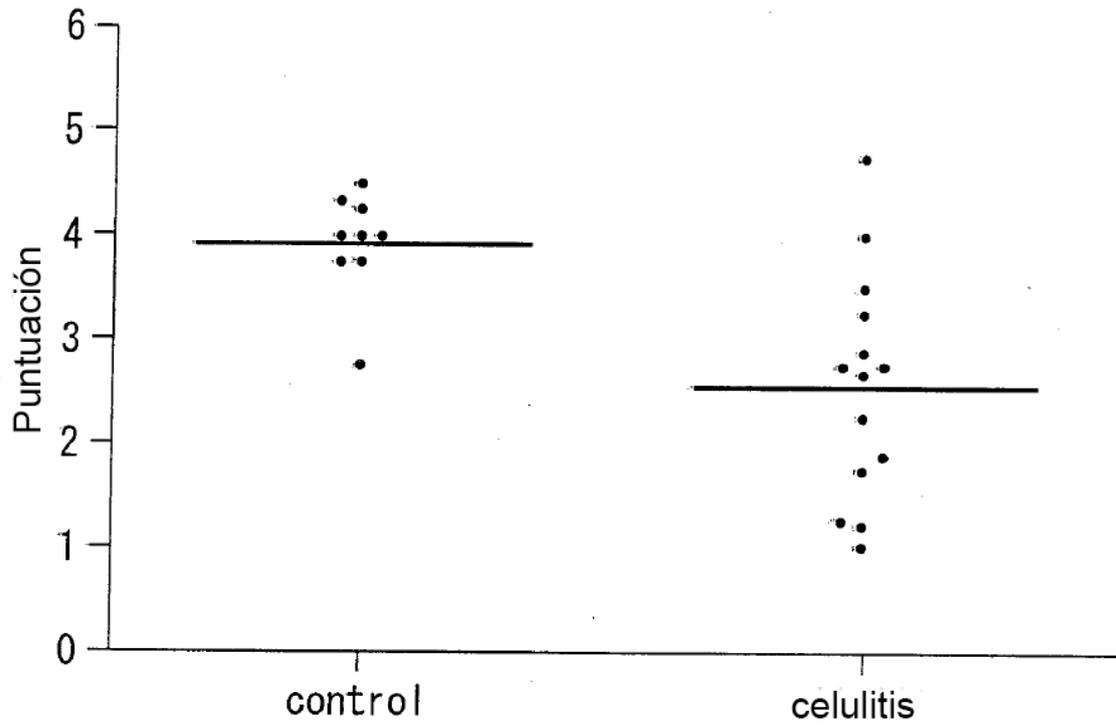
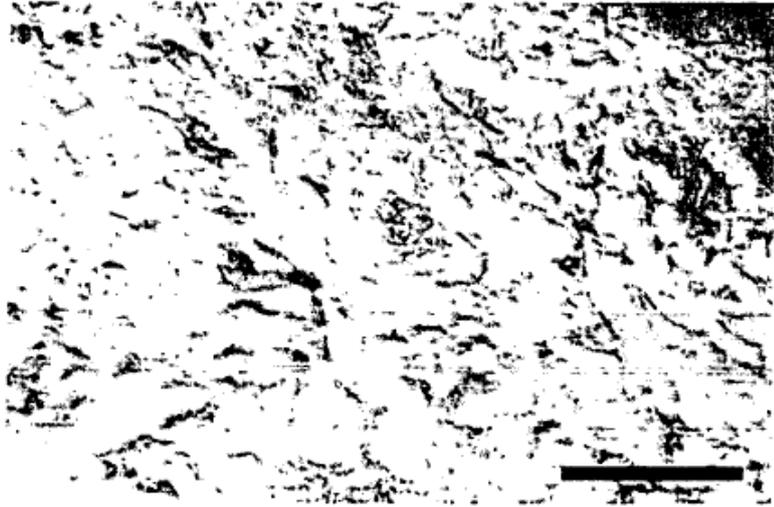
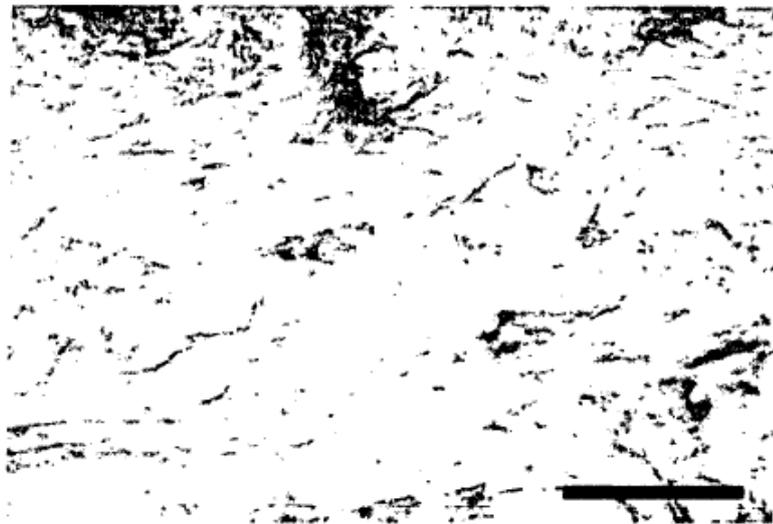


Fig.3

piel control
de mujer



piel con
celulitis



200um

Fig.4

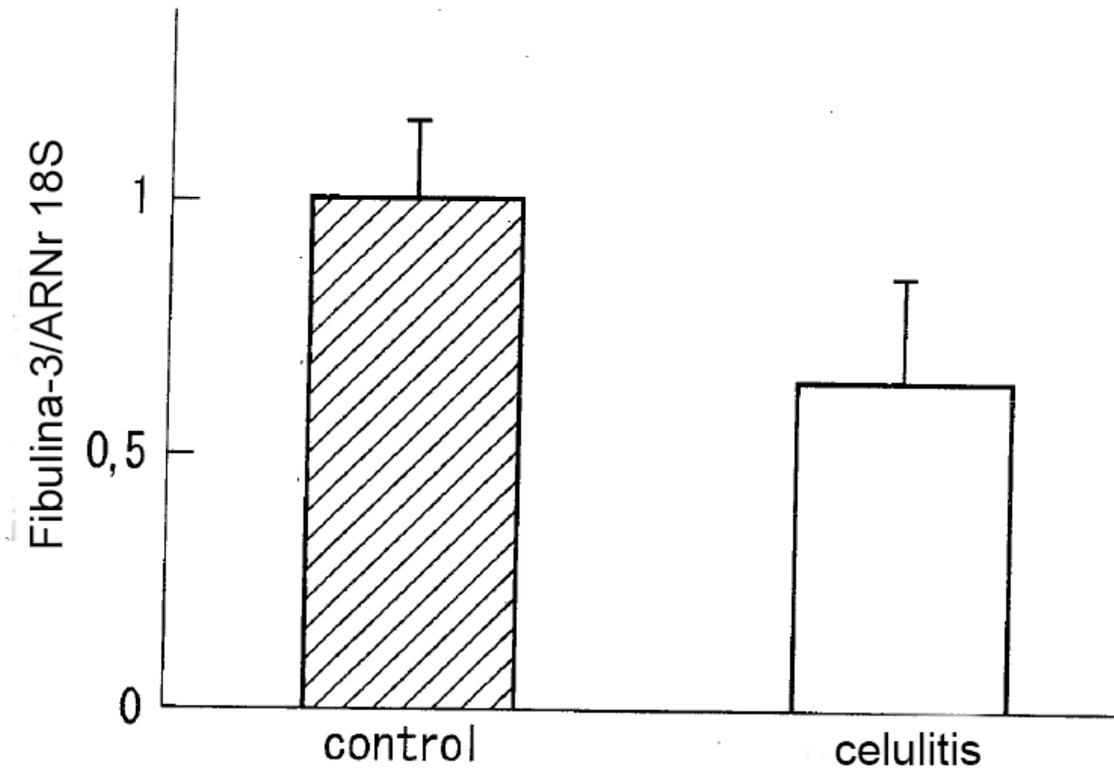
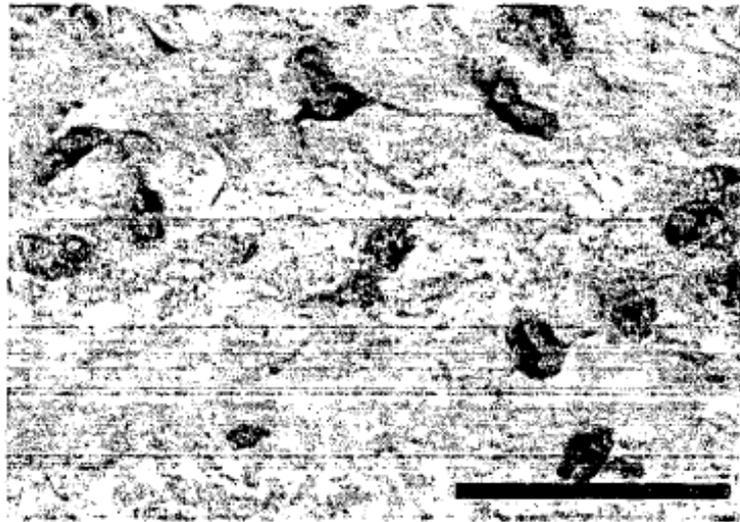
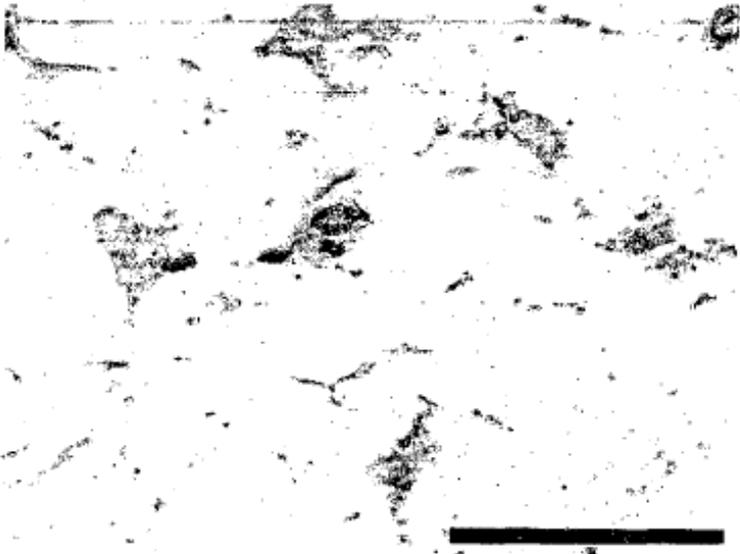


Fig.5

piel control
de mujer



piel con
celulitis



50um

Fig.6

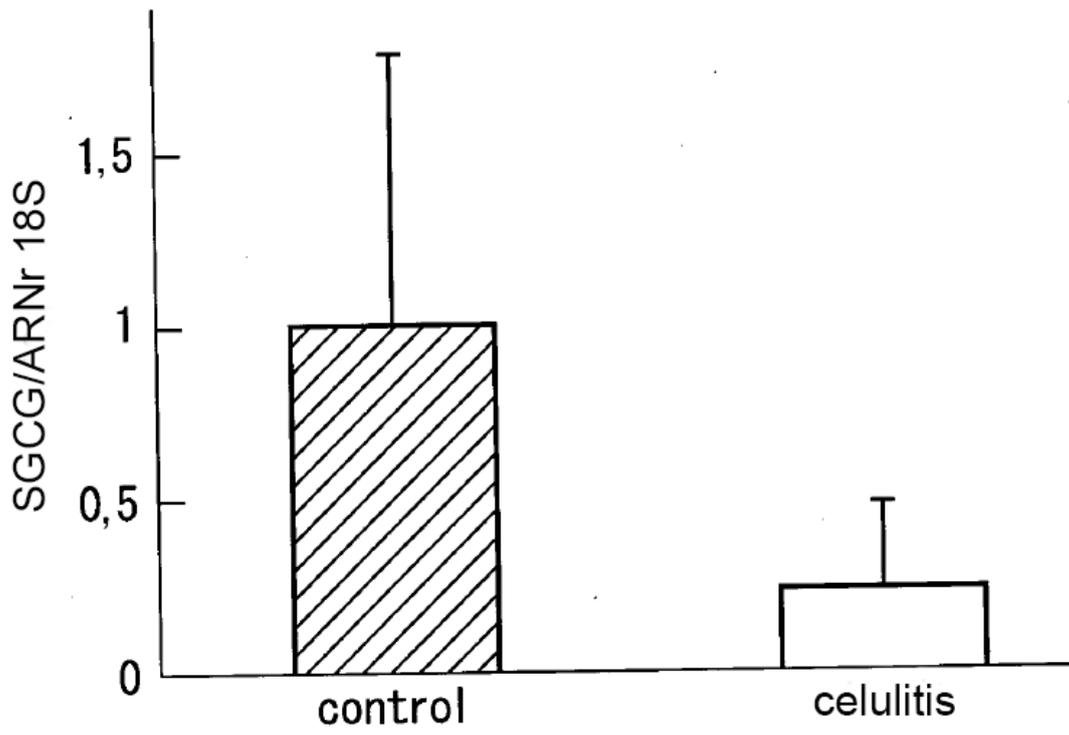


Fig.7

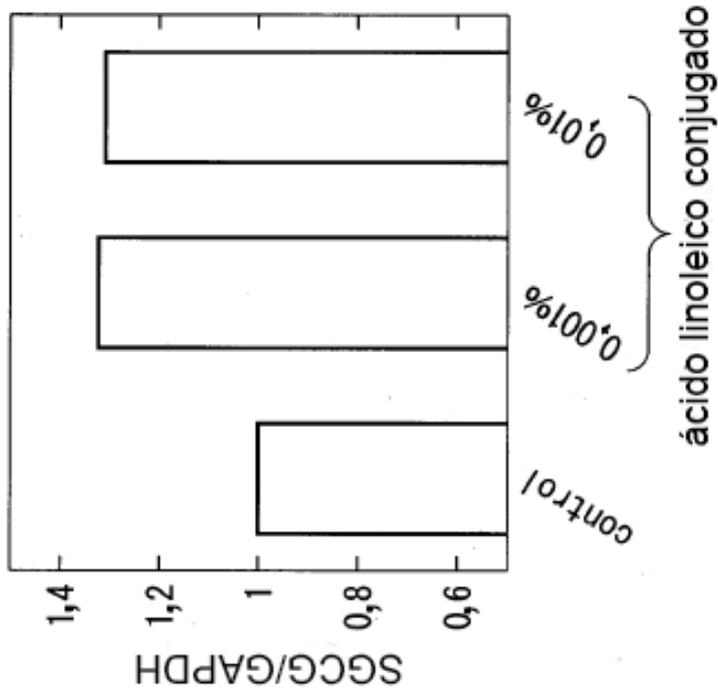
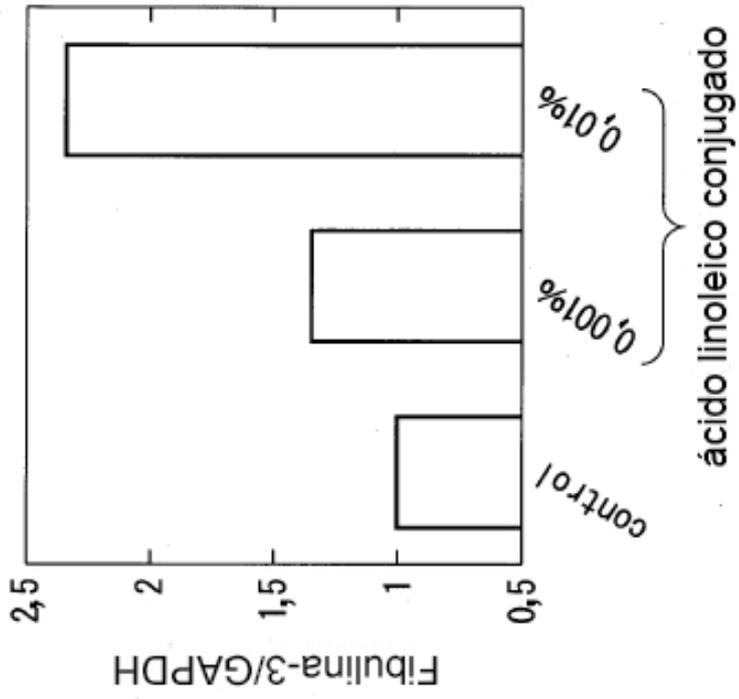


Fig.8

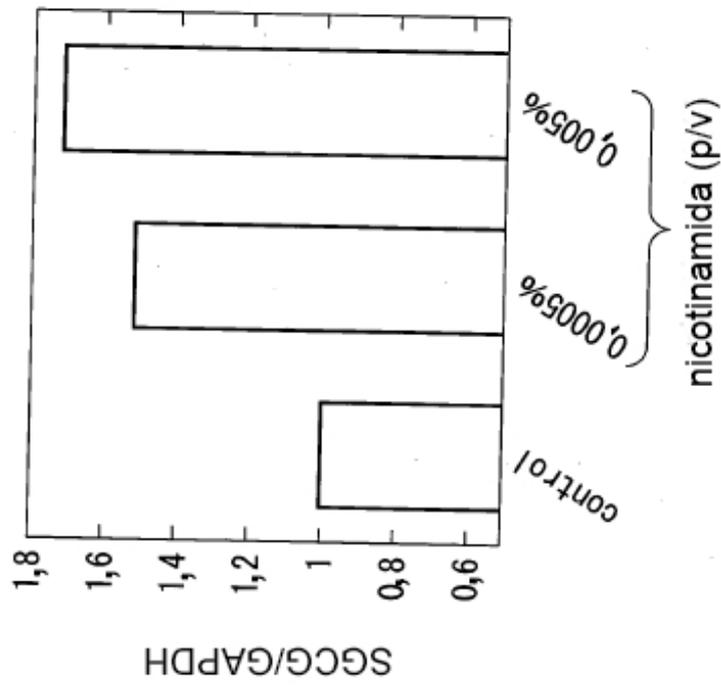
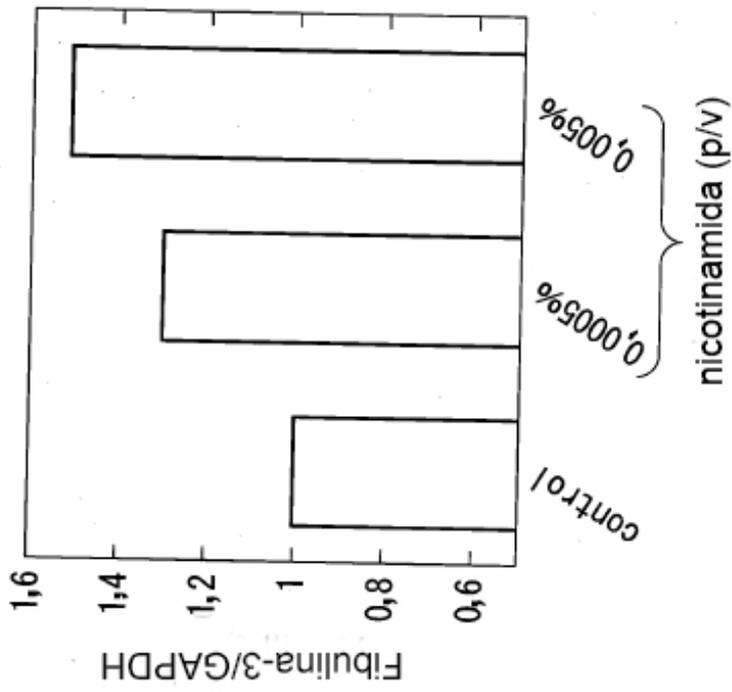


Fig.9

