

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 733**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/JP2012/079015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13069741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12848401 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2778174**

54 Título: **Anticuerpo específico para el dominio C-terminal de la profilagrina y su uso**

30 Prioridad:

09.11.2011 JP 2011245483

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

22.01.2018

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 Ginza 7-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0061, JP**

72 Inventor/es:

**HIBINO, TOSHIHIKO;
YAMAMOTO, MAMI;
TAKAGI, MASAYA;
SAKABE, JUNICHI y
TOKURA, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 650 733 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

Anticuerpo específico para el dominio C-terminal de la profilagrina y su uso

Campo técnico

5 La presente invención proporciona un método para detectar una mutación en un gen de filagrina utilizando un anticuerpo específico para un dominio C-terminal de profilagrina.

Técnica anterior

10 Fibras de queratina de la capa granular de la piel se unen a una proteína denominada filagrina y se agregan durante la queratinización formando un patrón único denominado "patrón de queratina". Una sustancia precursora de filagrina se denomina profilagrina y se almacena en gránulos de queratohialina dentro de las células granulares. La profilagrina tiene una estructura que comprende unidades repetitivas de filagrina que consisten en 10 a 12 moléculas continuas de filagrina interpuestas entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal (FIG. 1). En la queratinización, son extraídos estos dominios, etc., y se producen moléculas individuales de filagrina. Cuando finalmente se degrada la filagrina, se forma un factor hidratante natural (FHN). Los componentes constituyentes del FHN son aminoácidos y sus derivados, que se sabe que desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la hidratación de la piel (Horii I, Kawasaki K, Koyama J, et al., *J. Dermatol.* 1983; 10:25-33).

15 Las mutaciones en la filagrina provocan una reducción del FHN, y como resultado una disminución en la capacidad de retención de agua de la capa córnea. Sin embargo, investigaciones recientes han indicado que una mutación genética de la filagrina es la causa de ictiosis y algunas dermatitis atópicas (Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, et al., *Nat Genet* 2007; 39: 650 a 654), revelando sorprendentemente que las mutaciones en la filagrina no sólo reducen la capacidad de retención de agua de la capa córnea dando como resultado la disminución del FHN, sino que también influyen directamente sobre la función barrera.

20 La enfermedad antes mencionada resulta de las anomalías en la función barrera de la capa córnea, como está descrito en las directrices para el tratamiento de la dermatitis atópica recogidas en The Journal of the Japan Dermatological Association de 2010 (Norito Kato, "Treatment Guidelines and New Treatments for Atopic Dermatitis", *Journal of the Japanese Dermatological Association* 2010, 120(13), 2564-2565), que establecen que "los estados patológicos de la dermatitis atópica acompañan a una anomalía fisiológica de la piel, tal como piel seca, y a una anomalía en la función barrera que resulta de las anomalías en la epidermis, específicamente en la capa córnea".

25 Investigaciones posteriores han estimado que aproximadamente la mitad de las dermatitis atópicas en Europa y aproximadamente el 30% de las dermatitis atópicas en Japón resultan de las mutaciones genéticas de la filagrina. Desde este punto de vista, se entiende suficientemente que la dermatitis atópica sea una enfermedad multifactorial. Sin embargo, es importante decidir de manera crítica la presencia o ausencia de una mutación en el gen de filagrina para tomar las decisiones sobre los tratamientos futuros. Además, con relación a un sujeto de ensayo libre de dermatitis atópica, será posible predecir que será altamente probable que dicho sujeto padezca dermatitis atópica en el futuro si se detecta una mutación en un gen de filagrina.

30 Sin embargo, han sido descritas numerosas mutaciones en el gen de filagrina. Específicamente, dichas mutaciones no existen en una región específica, sino que existen casi en su totalidad (FIG. 1). Además, se ha descrito que no es probable que se produzcan unidades repetitivas de filagrina si existe una mutación en el gen de filagrina propiamente dicho o en una parte de la región en el extremo C de un gen que codifica la profilagrina, que es un precursor de la filagrina (Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, et al., *Nat Genet* 2007; 39: 650-654). Por tanto, con el fin de especificar si existe o no mutación en la filagrina, es necesario secuenciar el gen completo de profilagrina. Sin embargo, incluso la tecnología de análisis genético actual no puede analizar fácilmente el gen de profilagrina. Ludovic, C., et al., 2010 *Exp. Derm.* 19:e343-e346 enseñan el uso de anticuerpos comerciales dirigidos contra el dominio C-terminal de profilagrina de perro en la diagnosis inmunohistoquímica de la dermatitis atópica de la piel.

35 Por ejemplo, unidades repetitivas de filagrina, que son la región más importante en el gen de profilagrina, son ligeramente diferentes unas de otras, y todas las unidades repetitivas de filagrina deben ser secuenciadas con precisión. Además, las mutaciones en un gen de filagrina varían dependiendo del grupo étnico. Como resultado, es notablemente difícil determinar si una diferencia de una base es una mutación, debido a la variación en las diversas unidades repetitivas individuales en estas diversas regiones, y por otra parte, debido a la variación étnica. Por tanto, actualmente, las mutaciones en un gen de profilagrina solo se pueden analizar en equipos específicos del mundo.

Documentos de la técnica anterior**Bibliografía que no es patente**

Bibliografía que no es patente 1: Horri I, Kawasaki K, Koyama J, et al., *J Dermatol.* 1983; 10: 25-33

Bibliografía que no es patente 2: Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, et al., *Nat Genet* 2007; 39: 650-654

Bibliografía que no es patente 3: Kato, Norito "Treatment Guidelines and New Treatments for Atopic Dermatitis",

Journal of the Japanese Dermatological Association 2010, 120(13), 2564-2565.

Sumario de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

5 El objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para detectar una mutación en un gen de filagrina utilizando un anticuerpo específico para un dominio C-terminal de profilagrina.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han descubierto que una mutación del gen de filagrina puede ser detectada de forma no invasiva y sencilla, usando un anticuerpo específico para el dominio C-terminal, y han completado la presente invención.

10 Por tanto, la presente solicitud incluye la siguiente invención: Un método para detectar una mutación en un gen de filagrina, que comprende las etapas de:

detectar la presencia o ausencia de un dominio C-terminal de una proteína profilagrina humana en una muestra de piel de un sujeto con un anticuerpo específico para dicho dominio C-terminal, donde el dominio C-terminal es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1, y

15 decidir que la mutación en un gen de filagrina está presente en el sujeto, en caso de que no se detecte dicho dominio C-terminal,

en donde dicha muestra de piel es una muestra de capa córnea obtenida por extracción con cinta adhesiva.

Efecto de la invención

20 Si se genera una mutación en un gen de profilagrina, no se pueden crear unidades repetitivas de filagrina después de la mutación y, finalmente, en el dominio C-terminal de la profilagrina. De acuerdo con la presente invención, la presencia o ausencia del dominio C-terminal dentro de la muestra de piel se puede detectar usando un anticuerpo específico para el dominio detectando simplemente la presencia o ausencia de una mutación del gen de filagrina. Además, una mutación del gen de profilagrina puede ser causa de dermatitis atópica y, por tanto, el diagnóstico o la predicción de la dermatitis atópica usando el anticuerpo de la presente invención se puede realizar de forma no invasiva y sencilla.

25

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una ilustración esquemática que muestra una estructura del gen de profilagrina (Chr1q21.3/Humano) que tiene 12 unidades repetitivas de filagrina y sitios de mutación del gen.

30 La FIG. 2 es un diagrama de inmunotinción de piel normal (normal (+/+)) sin ninguna mutación del gen de profilagrina y de piel con dermatitis atópica (AD (+/+)). Los dibujos del lado izquierdo muestran los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina (tinción con HE) y los dibujos del lado derecho muestran los resultados de la tinción con un anticuerpo específico para el dominio C-terminal de profilagrina y un sustrato cromogénico DAB (3,3'-diaminobencidina) (FLG-C).

35 La FIG. 3 es un diagrama de inmunotinción de piel con dermatitis atópica con mutaciones del gen de profilagrina (S2889X; K4022X). Los dibujos del lado izquierdo muestran los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina (tinción con HE) y los dibujos del lado derecho muestran los resultados de la tinción con el anticuerpo específico para el dominio C-terminal de profilagrina y un sustrato cromogénico DAB (3,3'-diaminobencidina) (FLG-C).

Realización para llevar a cabo la invención

40 De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo específico para un dominio C-terminal de un gen de profilagrina humana, en el que el dominio C-terminal es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 o una de sus variantes. La filagrina se clasifica aproximadamente en Tipo I y Tipo II. Sin embargo, el término "profilagrina" como se usa en la presente memoria se refiere al Tipo I. La profilagrina tiene una estructura que comprende unidades repetitivas de filagrina consistentes en 10 a 12 moléculas continuas de filagrina interpuestas entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal (FIG. 1). La SEQ ID NO:2 indica la secuencia completa de un dominio C-terminal que consiste en 157 aminoácidos.

45

Con respecto al dominio C-terminal, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 no es homóloga a la profilagrina Tipo II ni a la hornerina, que es una molécula análoga a la profilagrina, y es una secuencia específica de Tipo I. Por tanto, un anticuerpo específico para la secuencia de aminoácidos no reacciona de forma cruzada con estas proteínas análogas.

50 La variante puede ser cualquier variante siempre que un anticuerpo obtenido usando la variante como antígeno no

reconozca un péptido que tenga una secuencia análoga a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 en la piel y sea específica para el dominio C-terminal de un gen de profilagrina humana. Por ejemplo, la variante puede ser un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 por delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos.

- 5 Aunque no se limita a esto, el péptido se puede obtener por síntesis química de acuerdo con un método convencional. El anticuerpo de la presente descripción se puede obtener administrando el péptido como antígeno, preferiblemente un complejo antigénico que comprenda el péptido unido a un vehículo adecuado, a mamíferos, por ejemplo, ratas, ratones, conejos, etc. Aunque no se limita a esto, la cantidad de dosificación del antígeno o complejo antigénico por animal es de 0,1 a 100 mg cuando no se usa adyuvante, y es de 10 a 1000 µg cuando se usa un adyuvante. Ejemplos del adyuvante incluyen adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA), adyuvante de hidróxido de aluminio, etc.

- 10 La inmunización se realiza principalmente por inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Además, el intervalo de inmunización no está limitado específicamente. Sin embargo, la inmunización se realiza de 1 a 10 veces, preferiblemente de 2 a 5 veces, en un intervalo de varios días a varias semanas, preferiblemente, un intervalo de 2 a 5 semanas. Además, el título del anticuerpo se mide por transferencia de Western, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA o EIA), radioinmunoensayo (RIA), etc., de 6 a 60 días después del día de la inmunización final. Preferiblemente, se extrae sangre y se obtiene antisuero el día en el que se muestra el título máximo de anticuerpos.

- 15 El anticuerpo policlonal se puede purificar por cromatografía de afinidad utilizando una columna a la que están unidos los péptidos antigénicos, y otros métodos de purificación conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta resolución, etc. Además, el anticuerpo de la presente descripción puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal se puede preparar de acuerdo con un método ya conocido que usa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 o una de sus variantes.

- 20 La presente invención proporciona un método para detectar una mutación en un gen de filagrina, comprendiendo dicho método las etapas de: detectar la presencia o ausencia de un dominio C-terminal de una proteína profilagrina humana en una muestra de piel de un sujeto con un anticuerpo específico para dicho dominio C-terminal, en donde el dominio C-terminal es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1, y decidir que en el sujeto está presente la mutación en un gen de filagrina, en el caso en el que no se detecte dicho dominio C-terminal, en donde dicha muestra de piel es una muestra de capa córnea obtenida por extracción con cinta aislante. El término "una mutación en un gen de filagrina" como se usa en la presente memoria se refiere a una o más mutaciones de un gen de filagrina, que inhiben la formación del dominio C-terminal de profilagrina. Ejemplos de las mutaciones incluyen la mutación S2889X en la que la terminación ocurre en la serina en la posición 2889, la mutación K4022X en la que la terminación ocurre en la lisina en la posición 4022, etc. (FIG. 1).

- 25 Una mutación en el gen de profilagrina conduce a una dermatitis atópica. Por tanto, de acuerdo con el método de la presente invención, cuando no se detecta el dominio C-terminal, se decide que el sujeto padece o es muy probable que padezca dermatitis atópica.

- 30 La detección de la presencia o ausencia del dominio C-terminal se realiza por un método inmunológico bien conocido por una persona experta en la técnica, por ejemplo, inmunoensayo (ELISA, RIA, etc.). Se extraen muestras de piel por cualquier método de brazos, piernas, cabeza, etc., de los sujetos. Los sujetos son mamíferos, preferiblemente seres humanos de los que se sospecha que tienen enfermedades cutáneas causadas por mutaciones del gen de filagrina, específicamente, dermatitis atópica. Un método de extracción con cinta adhesiva es sencillo y no invasivo. La extracción con cinta adhesiva es un método para extraer una muestra de capa córnea, que comprende pegar un trozo de cinta adhesiva a la capa superficial de la piel y despegar el trozo de modo que la capa córnea de la piel se adhiera a la cinta adhesiva retirada. De acuerdo con el método de extracción con cinta adhesiva, se puede obtener de forma sencilla una muestra de piel que contenga un gen de profilagrina y se puede detectar de forma no invasiva una mutación del gen de filagrina.

- 35 Un método preferible de extracción con cinta adhesiva es el siguiente: en primer lugar, se limpia una capa superficial de piel con, por ejemplo, etanol, etc., para eliminar el sebo, la suciedad y similares. Un trozo de cinta adhesiva cortada con un tamaño adecuado (por ejemplo, 5 x 5 cm) se coloca suavemente sobre la superficie de la piel. Todo el trozo de cinta se presiona sobre la superficie de la piel aplicando una presión uniforme y posteriormente se despegar la cinta adhesiva aplicando una fuerza uniforme. La cinta adhesiva puede ser una cinta de celofán comercialmente disponible, por ejemplo, Scotch Superstrength Mailing Tape (fabricada por 3M), Cellophane Tape (CelloTape (R), Nichiban), etc.

- 40 Para extraer un componente soluble de la capa córnea extraída por la cinta se puede usar un tampón de neutro a débilmente alcalino que incluya un tensioactivo no iónico, y que incluya, aunque sin limitación, el siguiente tampón: Tris HCl 100 mM + NaCl 0,14 M + Triton al 0,1% × 100. La cinta que tiene una capa córnea adherida se corta en una tira con tijeras, etc., se transfiere a un recipiente, tal como un tubo Eppendorf, se sumerge en una pequeña cantidad del tampón antes mencionado, se agita por inversión, para extraer eficazmente los componentes solubles. Los com-

ponentes solubles extraídos se someten a un inmunoensayo, etc., usando el anticuerpo de la presente descripción, para evaluar la presencia o ausencia de una mutación del gen de profilagrina.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un kit para detectar una mutación en un gen de filagrina, que comprende el anticuerpo. El kit puede comprender el anticuerpo de la presente descripción en un recipiente. El kit puede comprender además reactivos requeridos para el método de detección antes mencionado, por ejemplo, en el caso de la detección de una mutación por el método ELISA, un conjugado enzimático, solución de sustrato, solución de desactivación, solución de lavado, diluyente del conjugado enzimático, tampón de ensayo, control, diluyente de la muestra, conjugado, etc., e instrucciones de operación que expliquen los procedimientos del método.

La presente invención se explicará específicamente a continuación con más detalle con referencia a ejemplos específicos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a ellos.

Ejemplos

Tinción inmunohistoquímica

Se prepararon muestras de cortes de piel a partir de piel normal y piel con dermatitis atópica, que estaban libres de una mutación del gen de profilagrina, y piel con dermatitis atópica con una mutación del gen de profilagrina (S2889X o K422X). La tinción inmunohistoquímica del fragmento de piel se realizó por el método descrito por Kamata et al. (*J. Biol. Chem.*, Vol. 284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009). El anticuerpo específico para el dominio C-terminal de profilagrina se obtuvo inmunizando un conejo con un péptido sintético que tenía la secuencia de aminoácidos CKASAFGKDHPYYATYINKDP como inmunógeno (fabricado por Sigma Inc.)

La piel normal y la piel con dermatitis atópica, que estaban libres de una mutación del gen de profilagrina, se tiñeron con hematoxilina-eosina, o con el anticuerpo específico para un dominio C-terminal de profilagrina y un sustrato cromogénico DAB (3,3'-diaminobencidina). Los resultados se muestran en la FIG. 2. La profilagrina fue localizada en la capa granular. El desarrollo del color de la tinción con DAB en la capa granular se redujo en la piel con dermatitis atópica libre de una mutación del gen de profilagrina en comparación con la piel normal (con referencia al diagrama de inmunotinción de FLG-C). A saber, los resultados de la FIG. 2 revelan que la expresión de la filagrina está reducida en la piel con dermatitis atópica incluso libre de una mutación del gen de profilagrina.

A continuación, se realizó la inmunotinción de la piel con dermatitis atópica con la mutación del gen de profilagrina S2889X o K422X. De la misma manera que los resultados de la FIG. 2, cada piel se tiñó con hematoxilina-eosina (lado izquierdo: tinción con HE), o con el anticuerpo específico para un dominio C-terminal de profilagrina y un sustrato cromogénico DAB (3,3'-diaminobencidina) (lado derecho: FLG-C), y los resultados se muestran en la FIG. 3. La capa granular no se tiñó con DAB a diferencia de los resultados de la FIG. 2. A saber, se reveló que el dominio C-terminal de profilagrina no estaba formado por la mutación en la piel con dermatitis atópica con mutación.

Los resultados antes mencionados han revelado que el anticuerpo específico para el dominio C-terminal del gen de profilagrina se podría usar para detectar de modo sencillo la presencia o ausencia de mutaciones del gen de filagrina que se sabe que son muchas, sin verificar cada mutación por secuenciación y, por tanto, decidir que la piel de un sujeto padece o es muy probable que padezca dermatitis atópica.

Lista de secuencias

<110> Shiseido Ltd
 <120> Anticuerpo específico para el dominio C-terminal de profilagrina y su uso
 <130> AA637-PCT
 <150> JP2011-245483
 <151> 2011-11-09
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 650 733 T3

Cys Lys Ala Ser Ala Phe Gly Lys Asp His Pro Arg Tyr Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

Tyr Ile Asn Lys Asp Pro
 20

<210> 2

<211> 157

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser His Arg Asp Thr Ala Ser His Val Gln Ser Ser Pro Val Gln Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Ser Thr Ala Lys Glu His Gly His Phe Ser Ser Leu Ser Gln
 20 25 30

Asp Ser Ala Tyr His Ser Gly Ile Gln Ser Arg Gly Ser Pro His Ser
 35 40 45

Ser Ser Ser Tyr His Tyr Gln Ser Glu Gly Thr Glu Arg Gln Lys Gly
 50 55 60

Gln Ser Gly Leu Val Trp Arg His Gly Ser Tyr Gly Ser Ala Asp Tyr
 65 70 75 80

Asp Tyr Gly Glu Ser Gly Phe Arg His Ser Gln His Gly Ser Val Ser
 85 90 95

10 Tyr Asn Ser Asn Pro Val Val Phe Lys Glu Arg Ser Asp Ile Cys Lys
 100 105 110

Ala Ser Ala Phe Gly Lys Asp His Pro Arg Tyr Tyr Ala Thr Tyr Ile
 115 120 125

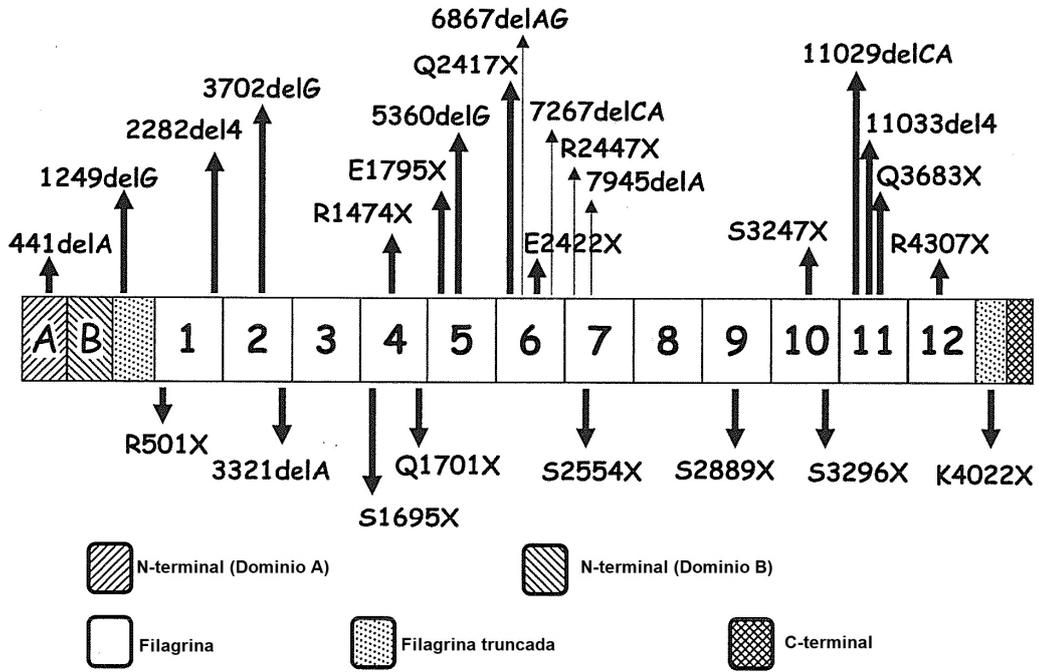
Asn Lys Asp Pro Gly Leu Cys Gly His Ser Ser Asp Ile Ser Lys Gln
 130 135 140

Leu Gly Phe Ser Gln Ser Gln Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Glu
 145 150 155

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una mutación en un gen de filagrina, que comprende las etapas de:
- 5 detectar la presencia o ausencia de un dominio C-terminal de una proteína profilagrina humana en una muestra de piel de un sujeto con un anticuerpo específico para dicho dominio C-terminal, donde el dominio C-terminal es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1, y
- decidir que las mutaciones en un gen de filagrina están presentes en el sujeto, en caso en el que no sea detectado dicho dominio C-terminal,
- en donde dicha muestra de piel es una muestra de capa córnea obtenida por extracción con cinta adhesiva.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende decidir que el sujeto padece o es muy probable que padezca dermatitis atópica, en caso en el que no se detecte dicho dominio C-terminal.

FIG.1



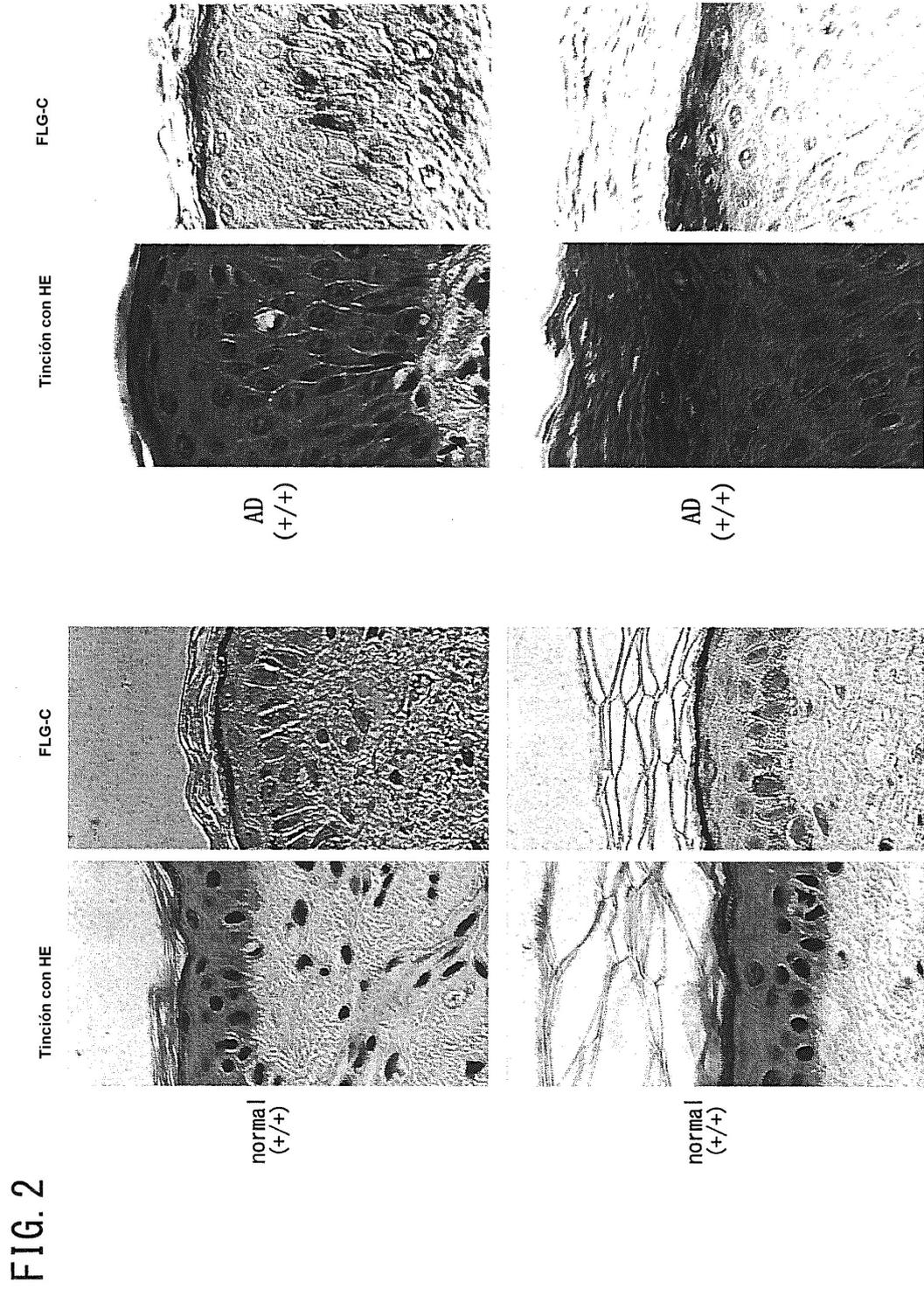
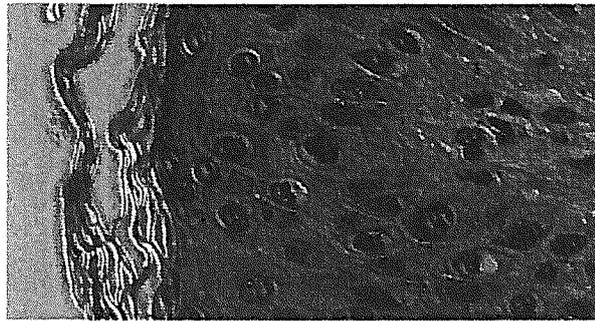
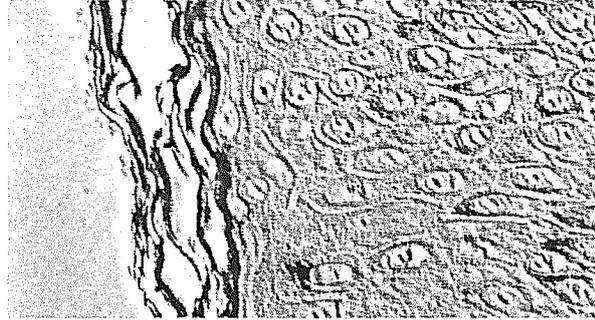
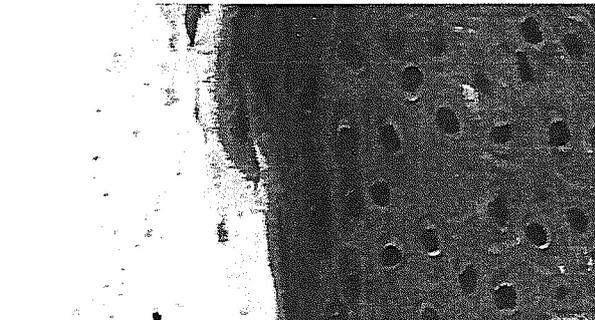
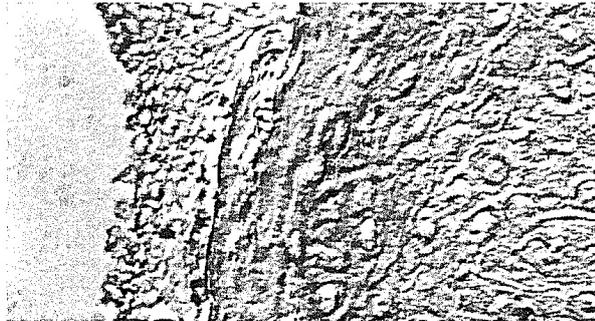


FIG. 3



AD
(K4022X)



AD
(S2889X)