

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 610**

51 Int. Cl.:

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012 PCT/IB2012/052456**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156927**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12738183 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2709727**

54 Título: **Procedimiento para modular proceso de pigmentación en los melanocitos de la piel**

30 Prioridad:

16.05.2011 IN 1420DE2011

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

20.04.2018

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (100.0%)
Anusandhan Bhawan, 2
Rafi Marg New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**GOKHALE, RAJESH SUDHIR;
NATARAJAN, VIVEK TIRUNELVELI y
GANJU, PARUL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 664 610 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para modular proceso de pigmentación en los melanocitos de la piel.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención implica modular la pigmentación visible de la piel. La presente invención trata sobre el papel del IFN- γ en el bloqueo de la maduración de melanosomas en etapas I y II conduciendo a hipopigmentación y restaurando el proceso cuando se retira. El proceso general de pigmentación consiste en la formación de melanosomas en etapas tempranas I y II, síntesis de melanina, maduración de melanosomas y posterior transferencia de melanosomas a queratinocitos. El proceso de maduración de melanosomas puede modularse de manera predecible controlando las concentraciones de IFN- γ . La presente invención se refiere al uso de IFN- γ para modular pigmentación en seres humanos con fines clínicos o cosmeceúticos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La pigmentación es un proceso único que implica dos tipos celulares de la epidermis humana: melanocitos y queratinocitos. Los melanocitos producen polímeros de melamina dentro de un orgánulo, melanosoma, mediante una serie de pasos concertados claramente definidos y programados y a continuación transfieren melanosomas pigmentados a queratinocitos (Hu *et al.*, 2007). El pigmento observado en la piel se debe a la presencia de melanosomas en queratinocitos. El proceso completo de pigmentación se puede dividir, a grandes rasgos, en cuatro procesos biológicos diferentes: 1) iniciación de formación de melanosomas, 2) maduración de melanosomas en etapas I, II, III y IV que implica tráfico de varias proteínas, 3) biosíntesis de melanina en etapas III y IV de maduración de melanosomas, 4) transferencia de melanosomas de etapas III y IV a queratinocitos. El trastorno en cualquiera de estos pasos puede producir niveles alterados de pigmentación cutánea. La maduración de los orgánulos es un componente muy importante de programación celular en el cuerpo humano. En la presente invención, se muestra que el interferón- γ (IFN- γ) regula directamente el proceso de maduración de melanosomas y transferencia de melanocitos, de este modo afectando el proceso completo de pigmentación cutánea. La hipopigmentación así como la hiperpigmentación son manifestaciones clínicas de diversas condiciones patológicas y también son importantes en el campo de la cosmética. La inducción de la pigmentación se considera un programa de diferenciación regulada de melanocitos. Los estudios realizados en el pasado identificaron varios genes implicados en este proceso. Muchas de estas observaciones se han originado en genética de ratones y actualmente se sabe que cerca de 120 loci están implicados en la pigmentación reguladora (Bennett y Lamoreux, 2003). De estos, la Tirosinasa (TYR), la proteína relacionada con tirosinasa-1 (TYRP1/TRP-1) y la dopacromo tautomerasa (DCT/TYRP2) son las enzimas que catalizan la síntesis de la melanina. Se sabe que el factor de transcripción clave MITF orquesta los eventos durante la melanogénesis mediante estas tres enzimas esenciales. También son conocidas algunas de las señales que dan pie a que las células inicien y mantengan la síntesis de melanina. Los queratinocitos y fibroblastos vecinos segregan factores melanotrópicos tales como HGF, SCF, ET (Yamaguchi *et al.*, 2007; Yamaguchi y Hearing, 2009). Estos factores regulan la melanogénesis y la proliferación de células. Al parecer, la señalización de α -MSH es esencial en base a múltiples líneas de evidencia provenientes de estudios de modelos genéticos a animales. Recientemente, ha salido a la luz que una secreción de α -MSH por parte de queratinocitos es mediada por p53 y de este modo el control de pigmentación sucede de manera paracrina (Cui *et al.*, 2007). Las interconexiones entre vías de señalización que regulan positivamente la melanogénesis son complejas y recién se están empezando a comprender. La condición de hiperpigmentación ampliamente estudiada es la exposición de la piel a rayos UV, lo cual desencadena una serie de efectos a corto y largo plazo que resultan en pigmentación aumentada (Choi *et al.*, 2010). Esta respuesta incluye secreción de factores melanogénicos e incremento de dendricidad de melanocitos en previsión de transferencia de melanosomas (Scott *et al.*, 2006). Es sorprendente que se conozcan tantas vías y efectores que aumentan la pigmentación, y que se sepa tan poco sobre la inversión activa de este proceso.

Múltiples líneas de evidencia indican la presencia de melanocitos con menor pigmento en condiciones fisiológicas y pato-fisiológicas. A nivel de desarrollo, los melanocitos crecen a partir de la cresta neural como células precursoras no pigmentadas. Estas células migran hacia la piel y se transforman en melanocitos pigmentados. Una manifestación rara de melanoma maligno en forma de lesiones amelanóticas se observa y suele asociarse a un pronóstico pobre. De manera similar las células que tienen menores cantidades de melanina se detectan cuando los melanocitos se cultivan en condiciones definidas *in vitro* y estas células se denominan melanoblastos. Asimismo, se conocen condiciones clínicas como hipopigmentación posinflamatoria donde la melanina se pierde de forma temporal en la piel. Todavía se están investigando las vías mediante las cuales la pigmentación se suprime de manera activa en estas condiciones. Tampoco queda claro si la síntesis de la melanina es el único paso en el cual se regula la pigmentación; diversos estudios indican que la regulación de la pigmentación podría producirse en el

nivel 1) maduración de melanosomas 2) dispersión de melanosomas dentro de células (Richardson *et al.*, 2008) 3) transferencia de melanosomas desde melanocitos a queratinocitos (Seiberg *et al.*, 2000) 4) degradación/eliminación de melanina de las células.

5 Disminuir el contenido de melanina es importante desde una perspectiva cosmeceútica. A pesar de ello, los agentes que podrían suprimir o revertir el estado pigmentado son limitados. No queda claro si suprimir la melanogénesis mediante únicamente el factor MITF es suficiente para revertir el estado pigmentado por defecto. De forma alternativa, podría haber vías independientes del factor MITF suprimiendo el programa de melanogénesis de manera activa. Mediante el uso de sistemas de modelos apropiados y gracias a la riqueza de información disponible a partir de la biología de las células de pigmento, en la actualidad es posible recrear cambios celulares y comprenderlos utilizando enfoques holísticos. Existen varios compuestos conocidos que interfieren con el proceso de pigmentación. Entre ellos la clase principal de moléculas pertenece a la categoría de inhibidores de melanogénesis. Estos compuestos inhiben de forma reversible la enzima TYR y producen como resultado una disminución en el contenido de melanina. Las moléculas como el ácido kójico pertenecen a esta categoría. La otra clase de compuestos podría clasificarse como sustratos suicidas; inhibidores que en realidad son sustratos para TYR pero no participan en síntesis de melanina adicional o son inhibidores irreversibles. Las moléculas como las hidroquinonas y sus derivados que representan esta categoría de inhibidores se utilizan ampliamente, pero presentan efectos secundarios no deseados puesto que también interfieren con otros procesos celulares. Otra clase de compuestos actúa eligiendo el nivel de proteína de TYR como diana. Estos compuestos producen mal plegamiento de la proteína, de este modo reduciendo su actividad. Muchos otros inhibidores de moléculas pequeñas son conocidos por disminuir la melanogénesis y algunas de sus funciones están bien caracterizadas. Uno de los principales efectos secundarios de inhibir la melanogénesis es la pérdida de intermedios, provocando citotoxicidad celular, lo cual podría desencadenar autoinmunidad. Por lo tanto, existe una gran demanda de una forma más biológica de controlar la melanogénesis en la industria cosmética.

25 Existen muy pocas vías conocidas mediante las cuales las células que fabrican melanina puedan hacer que el nivel de pigmentación se reduzca. En esta invención hemos descrito cómo las células mantienen un estado hipopigmentado mediante el uso de la vía de interferón. La micromatriz indicó que muchos de estos genes implicados en la pigmentación, como TYRP1, TYRP2/DCT, capuchino (CNO), HPS4, receptor acoplado a proteínas G 143 (GPR143), OCA2, SLC7A11 y mucopilina-3 (MCO3LN3) son regulados negativamente por el IFN- γ y los efectores aguas abajo de IFN- γ tales como IFNGR1, IFNGR2, STAT-1, JAK 1, JAK2, IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9, PSMB8 y PSMB9 son inducidos. La investigación biológica celular indicó que las células hipopigmentadas tienen menos melanosomas maduros. El análisis de las proteínas de melanosomas indicó una disminución en los niveles de TYR y DCT/TYRP2. El IFN- γ también altera la transferencia de melanosomas maduros de melanocitos a queratinocitos. Por lo tanto elegir mediadores del IFN- γ como diana ya sea farmacológicamente utilizando inhibidores de moléculas pequeñas o la propia citocina produciría una respuesta de pigmentación controlada. La ventaja principal de este procedimiento sería el uso de la vía biológica existente que media en la hipopigmentación sin alterar los niveles de MITF. El IFN- γ funciona como un reóstato al calibrar la pigmentación cutánea. Por lo tanto, el sistema se ajustaría para adaptarse al cambio. Hemos demostrado que esta vía, bloqueando el proceso de maduración de melanosomas afecta todas las funciones aguas abajo, conduciendo a hipopigmentación. En consecuencia, elegir esta vía como diana produciría una reducción concertada de melanosomas y sería una forma más natural de conseguir la hipopigmentación.

Las otras vías conocidas por producir hipopigmentación incluyen la vía TGF- β (Martínez-Esparza *et al.*, 2001). Se demostró que si se utiliza TGF- β se consigue una hipopigmentación eficaz de las células B16 cultivadas. Esto se asoció a una disminución en el contenido de melanosomas maduros en la célula. Después de este estudio se hicieron experimentos con ratones recientemente (Nishimura *et al.*, 2010). No obstante, los estudios confirmaron que esta reducción se debía a una disminución en los niveles del factor de transcripción clave MITF y, como resultado, las células madre se mantenían. Un mecanismo de hipopigmentación específica del sitio se observa en la piel palmoplantar, donde la DKK1 derivada de la dermis suprime la señalización de WNT, alterando los niveles de MITF y el crecimiento de melanocitos (Yamaguchi *et al.*, 2009). Por otra parte, nuestros estudios demuestran que el IFN- γ altera la pigmentación sin alterar los niveles de MITF, indicando que el mecanismo mediante el cual el IFN- γ media en la hipopigmentación es distinto de TGF- β y DKK1. Por ende, el uso de la vía de interferón sería una forma mucho más predecible y efectiva de conseguir pigmentación alterada.

55 Informes previos que sustentan nuestro planteamiento incluyen la generación de una línea transgénica de ratones donde los ratones sobreexpresan el IFN- γ en la epidermis. Estos ratones además de tener otro fenotipo apreciable presentan hipopigmentación llamativa en el pelo (Carroll *et al.*, 1997). Los autores no habían investigado el mecanismo en este estudio y puesto que los ratones no tienen pigmentación epidérmica, la función de esta vía en melanocitos epidérmicos cutáneos no se conocía previamente. La mayor parte de los estudios previos sobre el

efecto del IFN- γ se han realizado sobre células de melanoma transformadas que han demostrado tener distintas propiedades en comparación con melanocitos epidérmicos humanos normales (Nihal *et al.*, 2005). El papel del IFN- γ de alterar la presentación de antígenos asociados a melanoma se ha propuesto para alterar respuestas inflamatorias y dificultar el reconocimiento efectivo de células de melanoma (Le Poole *et al.*, 2002). Un estudio previo sobre células de melanoma maligno humanas había indicado, según las estadísticas, un papel del IFN- γ no significativo en la disminución de síntesis de melanina en estas células transformadas (Garbe *et al.*, 1990). Si bien la síntesis de melanina es uno de los procesos implicados en la pigmentación, el color de piel visible es un fenómeno complejo que conlleva una cascada de eventos biológicos distintos. Nuestros estudios muestran un papel importante del IFN- γ en la regulación de la pigmentación bloqueando la maduración del orgánulo de melanocito clave, melanosomas en melanocitos humanos cultivados. En un sistema completamente diferente, el IFN- γ es un inductor potente de cambios de tipo catágenos en folículos capilares anágenos humanos cultivados (Ito *et al.*, 2005). Recientemente, se identificó que utilizar peces cebra como vía de receptores tipo Toll de sistema modelo daba como resultado la hipopigmentación de melanocitos (Jin y Kang, 2010). Si bien las observaciones son limitadas, se destaca cómo las vías de señalización regulan la pigmentación. Los interferones en sí mismos son conocidos por ejercer su efecto mediante la inducción de una familia de factores de transcripción, Factores Reguladores de Interferón (IRF, por su sigla en inglés). En un estudio reciente, se descubrió que IRF-4 estaba asociado a la pigmentación en la población europea (Sturm, 2009). Estas observaciones refuerzan aun más nuestro planteamiento sobre la implicación de cómo funcionan los miembros de vía de interferón para reducir la pigmentación cutánea. En consecuencia, proponemos patentar el proceso de conseguir pigmentación alterada de la piel y melanocitos derivados eligiendo como diana miembros pertenecientes a IFNG, IFNGR1, IFNGR2, STAT-1, JAK 1, JAK2, IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9, PSMB8 y PSMB9. En la presente invención, hemos desarrollado un proceso para conseguir pigmentación controlada mediante el péptido IFN- γ y sus proteínas aguas abajo.

OBJETOS DE LA INVENCION

El objeto principal de la invención es desarrollar una composición para ser utilizada en la modulación de la pigmentación visible de la piel.

Otro objeto de la invención es desarrollar una composición para ser utilizada en la modulación de la maduración de melanosomas en melanocitos.

Otro objeto de la invención es desarrollar una composición para ser utilizada en la modulación de la transferencia de melanosomas a queratinocitos.

Otro objeto de la invención es desarrollar una composición para ser utilizada en la modulación de la maduración de melanosomas en los melanocitos cutáneos epidérmicos identificando dianas aguas abajo del agente que afecta la maduración de melanosomas.

RESUMEN DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención se refiere al IFN- γ utilizado para modular la pigmentación visible de la piel. La presente invención es el resultado de estudios que demuestran que el péptido IFN- γ puede inhibir la maduración de melanosomas y transferirse desde melanocitos y, por ende, reduce el nivel de pigmentación. Los niveles aumentados de IFN- γ suministrado como péptido recombinante reduce los niveles de TYR, TYRP1 y TYRP2/DCT junto con varias otras proteínas de melanosomas, CNO, HPS4, GPR143, OCA2, SLC7A11 y MCOLN3, de este modo alterando el proceso de maduración de melanosomas. La aplicación de IFN- γ en melanocitos normales *in vitro* da como resultado una disminución marcada en la maduración de melanosomas e hipopigmentación resultante en estas células. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con el IFN- γ para ser utilizado en la alteración del proceso de maduración de melanosomas que conduce a alteración en la pigmentación. El presente compuesto es útil en situaciones clínicas de hiperpigmentación debido a, por ejemplo, exposición solar, inflamación o cicatrización o debido a trastornos con proliferaciones congénitas o adquiridas de melanocitos. El IFN- γ se produce en la epidermis en determinadas condiciones, por lo tanto, se puede aplicar localmente en la epidermis y también se puede administrar sistémicamente. Los problemas de pigmentación cutánea aumentada o aberrante son comunes y generalizados. Dichos cambios pueden incluso ser causa de malestar considerable aunque se localicen en una zona pequeña de la piel, especialmente cuando la pigmentación aberrante afecta el rostro y/o manos. En la presente invención revelamos un proceso de hipopigmentación producido por el uso de un péptido IFN- γ y sus proteínas diana aguas abajo tales como IFNGR1, IFNGR2, STAT-1, JAK 1, JAK2, IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9, PSMB8 y PSMB9, etc. Además, describimos que este factor es suficiente para replicar la supresión de respuesta de pigmentación en estas células. La evaluación microscópica sugiere la presencia de melanosomas inmaduros cuando las células se tratan con IFN- γ . Por lo tanto, el IFN- γ induce un estado hipopigmentado suprimiendo de forma activa

la maduración de melanosomas mediante un efecto concertado sobre dianas clave implicadas en la pigmentación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS Y TABLAS

5 Leyenda de figura 1

Micrografías electrónicas de melanocitos humanos normales se trataron con 100 U/ml de IFN- γ utilizando un microscopio electrónico de transmisión. (a) Melanocito (no tratado) de control (b) tratado con 100 U/ml de IFN- γ . Los melanocitos se fijaron, permeabilizaron y los melanosomas se sondaron utilizando un anticuerpo HMB45 para matriz de melanosomas (verde) y melanina (rojo) (c) control (d) melanocitos tratados con 100 U/ml de IFN- γ . Imagen
10 cuantificada intensidad de fluorescencia normalizada de (e) HMB45 y (f) tinción de melanina de melanocitos.

Leyenda de figura 2

(a) Melanocitos humanos primarios tratados con 100 U/ml de IFN- γ seguido de análisis de micromatriz de genes regulados representados como mapa de calor. Algunos de los genes regulados negativamente de manera llamativa
15 incluyen DCT, Mlan A y Trp1. En particular, muchos genes implicados en funciones inmunes fueron regulados positivamente mediante el tratamiento. (b) Análisis de PCR en tiempo real de genes regulados en dos concentraciones diferentes de IFN- γ (100 U/ml y 200 U/ml). (c) Análisis por Western blot de DCT, STAT-1 fosforilado, GSK-3 β fosforilado a partir de melanocitos de control, tratados con MSH (6 nM) o con IFN- γ (100 U/ml).

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El IFN- γ bloquea la maduración de melanosomas alterando los niveles de proteínas clave implicadas en la formación y maduración de melanosomas, como TYR, TYRP1, y DCT/TYRP2, CNO, HPS4, GPR143, OCA2, SLC7A11 y MCOLN3, de este modo reduciendo la pigmentación en melanocitos humanos normales. La modulación de niveles
25 de proteína de pigmentación por parte del IFN- γ puede resultar útil para conseguir estados hipopigmentados.

Otro determinante de la pigmentación cutánea es la transferencia de melanosomas maduros (Etapas III y IV) de melanocitos a queratinocitos. Nuestros estudios *in vitro* con modelos de cocultivo melanocito-queratinocito demuestran que el IFN- γ disminuye este proceso de transferencia, alterando la cantidad de melanosomas en
30 queratinocitos, lo cual produce una pigmentación en apariencia disminuida.

Como se detalla en el Ejemplo 5 más adelante, este mecanismo de hipopigmentación mediada por IFN- γ puede ser evidente en varias condiciones de hipopigmentación cutánea, como la lepra tuberculoide, donde concentraciones localizadas de IFN- γ pueden inhibir la maduración y transferencia de melanosomas en los melanocitos de las
35 lesiones cutáneas. Por ende, elegir esta vía como diana sería importante desde la perspectiva terapéutica para el tratamiento de condiciones de hipopigmentación cutánea.

El IFN- γ puede formularse como una composición utilizando una variedad de vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. La composición puede estar, por ejemplo, en una crema, gel o loción para uso tópico o
40 puede estar presente como líquido. La composición también puede estar presente en forma de dosis unitaria que puede administrarse mediante infusión subcutánea si es preciso.

Puesto que previamente se ha mostrado que el TGF- β inhibe la síntesis de melanina en células de melanoma B16 así como melanocitos primarios humanos (Martínez-Esparza *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*,; Nishimura *et al.*, 2010),
45 en consecuencia, era importante determinar si el IFN- γ actuaba mediante un mecanismo que implicaba TGF- β . Se informó que el TGF- β produce reducción en la pigmentación disminuyendo el nivel de factor de transcripción MITF. No obstante, el IFN- γ y sus proteínas efectoras aguas abajo consiguen la hipopigmentación a pesar de tener niveles alterados de MITF. Estos hallazgos indican que el proceso de hipopigmentación mediado por IFN- γ es distinto del que produce el TGF- β .

50

La generalizabilidad de las funciones de hipopigmentación del IFN- γ se demuestra mediante su efecto inhibitorio en procesos de pigmentación generales implicados en melanocitos humanos normales. El IFN- γ se produce localmente en la epidermis en varias condiciones (Sarra *et al.*, 2011). Otros han demostrado anteriormente que los factores derivados de queratinocitos, que también se producen de forma local, influyen en el comportamiento de los
55 melanocitos, como la proliferación de melanocitos, densidad y la cantidad de melanina producida (Gordon *et al.*, 1989). En consecuencia, en su conjunto, los datos proporcionados en la presente indican que la administración local de IFN- γ podría utilizarse para alterar la pigmentación en células epidérmicas humanas de manera predecible.

La presente descripción ofrece detalles de cómo se puede utilizar el IFN- γ para modular de forma reversible la maduración de melanosomas que ocurre en las etapas I y II en melanocitos epidérmicos y donde el IFN- γ modula la
60

expresión de componentes de la vía de IFN- γ seleccionados de un grupo que comprende IFNGR1, JAK1 y STAT1.

En un aspecto adicional de la invención la transferencia de melanosoma a queratinocitos se altera eligiendo como diana componentes de vía de IFN- γ seleccionados del grupo que comprende IFNG, IFNGR1, JAK1 y STAT1.

5

En un aspecto adicional de la invención el uso de IFN- γ está destinado a modular la pigmentación en seres humanos con fines clínicos o cosmeceúticos.

Incluso otro aspecto de la invención ofrece el uso de IFN- γ para alterar de manera reversible la maduración de melanosomas que ocurre en las etapas I y II en melanocitos epidérmicos de un sujeto y/o alterar la transferencia de melanosoma a queratinocitos.

10

Incluso otro aspecto de la invención ofrece el uso de IFN- γ para modular la expresión de componentes de vía de IFN- γ seleccionados de un grupo que comprende IFNGR1, JAK1 y STAT1.

15

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en el tratamiento de un trastorno de pigmentación cutánea.

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en la alteración reversible de la maduración de melanosomas que ocurre en las etapas I y II en melanocitos epidérmicos de un sujeto donde IFN- γ se pone en contacto con melanocitos en el intervalo 100 - 500 U/ml durante un periodo que varía entre 1 y 10 días.

20

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en la alteración reversible de la maduración de melanosomas que ocurre en las etapas I y II en melanocitos epidérmicos de un sujeto donde el IFN- γ altera de manera reversible los niveles de TYR y TYRP2/DCT, CNO, HPS4, GPR143, OCA2, SLC7A11 y MCOLN3.

25

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en la alteración reversible de la maduración de melanosomas que ocurre en las etapas I y II en melanocitos epidérmicos de un sujeto donde la transferencia de melanosoma a queratinocitos se altera eligiendo como diana componentes de vía de IFN- γ seleccionados del grupo que comprende IFNG, IFNGR1, JAK1 y STAT1.

30

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en el tratamiento de pigmentación cutánea, donde dicho IFN- γ se ha de administrar a un sujeto.

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso donde IFN- γ se ha de administrar al sujeto mediante administración tópica o subcutánea.

35

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso donde la administración tópica o subcutánea es en una forma de dosificación seleccionada de un grupo que comprende un polvo, una disolución, una emulsión, una emulsión fluida, una suspensión, una suspensión fluida, un semisólido, una pomada, una pasta, una crema, un gel, una jalea, una espuma, un implante, una inyección, un parche y un pulverizador.

40

Incluso otro aspecto de la invención ofrece IFN- γ para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos seleccionados del grupo que comprende hiperpigmentación, hipopigmentación, pigmentación despigmentada, pigmentación posinflamatoria, piel dañada por el sol, acantosis nigricans y lentigo solar, lepra intermedia, lepra tuberculoide, lepra dimorfa, lepra lepromatosa.

45

Incluso otro aspecto de la invención ofrece el uso de IFN- γ para tratar un trastorno cutáneo para aplicación cosmética y donde dicho trastorno cutáneo es una marca de nacimiento pigmentada o cambios de pigmentación asociados a la edad.

50

EJEMPLO 1

Los cultivos de melanocitos epidérmicos humanos normales (NHEM) (obtenidos de Lonza, o establecidos a partir de epidermis) se mantuvieron en un medio de M254 con suplementos libres de PMA (Invitrogen) a 37 °C, en CO₂ al 5%. Para estudiar el efecto del IFN- γ en melanocitos, se desarrollaron cultivos con pases tempranos de melanocitos en presencia o ausencia de IFN- γ humano recombinante (Peptotech) a una dosis de 100 U/ml y las células se observaron después de 8 días de tratamiento. Se pudo observar pigmentación disminuida en los sedimentos celulares tratados con IFN- γ , confirmando la presencia de un mecanismo para la inducción de hipopigmentación (Fig. 1). Para comprender las dianas moleculares de IFN- γ humano (de aquí en adelante referido simplemente como

55

60

IFN- γ) en melanocitos y el mecanismo mediante el cual las células son hipopigmentadas, se llevaron a cabo estudios adicionales.

El estado de maduración de melanosomas en las células y la pigmentación visible están íntimamente relacionados.

- 5 El proceso de síntesis de melanina se aísla en las etapas tardías de maduración de melanosomas y requiere direccionar adecuadamente proteínas múltiples a etapas tempranas de melanosomas para su iniciación. Por lo tanto, el estado de receptividad de melanosomas para la síntesis de melanina y el contenido de melanina dentro de cada melanosoma podría considerarse un criterio de valoración celular de un programa de pigmentación. Puesto que la melanina es una sustancia electrón-densa, la visualización de melanosomas por lo general se lleva a cabo
- 10 mediante microscopía electrónica. La técnica permite identificar distintas etapas de melanosomas de I a IV basadas en la arquitectura de orgánulos y contenido de melanina. Las células tratadas con IFN- γ (como se menciona más arriba) se sometieron a microscopía electrónica e imagenología confocal utilizando HMB45 y anticuerpo de melanina. La evaluación mediante microscopía electrónica se llevó a cabo en células de control y células tratadas con IFN- γ . El análisis de las micrografías indicó que se detectaron menos melanosomas de etapa III y IV en células
- 15 tratadas con IFN- γ , mientras que se identificaron varios diferentes en las células de control. Para un análisis cuantitativo y más preciso del estado de los melanosomas se adoptó un enfoque inmuno-citoquímico. Los melanocitos de control y tratados con IFN- γ primarios se tiñeron con el anticuerpo HMB45 (Human Melanoma Black 45) de (Dako Cytomation) y anticuerpo anti-melanina (policlonal de conejo creado contra melanina sintética, creado en laboratorio). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen) y las células se
- 20 observaron con microscopio confocal. Las observaciones recurrentes indicaron que se obtuvieron menos señales de fluorescencia de las células tratadas con IFN- γ . Para una cuantificación comparativa, el procesamiento e imagenología de células de control y células tratadas con IFN- γ se llevó a cabo en condiciones idénticas. Los parámetros utilizados para imagenología como corrección de fondo, proporción señal/ruido, etc. son arbitrarios y se mantuvieron constantes. Se sustrajo la intensidad de fluorescencia media de DAPI de HMB45 o de señales de
- 25 melanina de cada célula para normalización. La comparación de las intensidades normalizadas indicó que las células tratadas con IFN- γ tenían significativamente menor contenido de melanina así como matriz de melanosomas según se detectó mediante el anticuerpo HMB45.

EJEMPLO 2

- 30 Para comprender los cambios moleculares inducidos por IFN- γ en melanocitos, se llevó a cabo un estudio basado en micromatriz en dos cultivos de melanocitos primarios independientes. Las células fueron tratadas con 100 U/ml de IFN- γ durante 8 días (como se menciona en el ejemplo 1) y el ARN total se aisló y se sometió a micromatriz. Se llevó a cabo la micromatriz utilizando un chip de genoma completo de Illumina humano WG-6. El etiquetado de ARN se
- 35 realizó utilizando un kit de etiquetado de ARN Illumina TotalPrep (Ambion). Se llevaron a cabo los pasos de hibridación y lavado posteriores según las instrucciones del fabricante. Los datos fueron normalizados a la media; se sustrajo el fondo y se analizaron utilizando el software Bead-studio (Illumina). Como es propio de una citocina inmune el IFN- γ desencadenó un perfil de expresión génica que sugería una respuesta inmune en melanocitos. No obstante, el patrón de expresión génica también incluyó supresión de ciertos genes de pigmentación (Figura 2). Esto
- 40 confirmó que el papel de hipopigmentación del IFN- γ se debe a la supresión de genes de pigmentación afectando la maduración de melanosomas. La regulación de los genes escogidos fue confirmada mediante PCR en tiempo real. En melanocitos humanos primarios la regulación de genes múltiples de IFN- γ aguas abajo se observó y se presentó en la tabla 1.

- 45 **Tabla 1** Listado de genes regulados por IFN- γ en melanocitos humanos primarios regulados significativamente en melanocitos primarios en base a micromatriz.

DCT, TSPAN10, TSPAN9, SERPINF1, KIF1B, SOX10, MYO18A, MLANA, CREB1, MC1R, DCTNI, CNO, TYRP1, HPS4, GPR143, ID2, JARID2, OCA2, CHMP2A, JARID1B, SLC7A11, MCOLN3, IFT2, IFTM1, IRF1, IRF3, IRF4, IRF7, IRF9, OAS1, PSMB8, PSMB9, STAT1, STAT6, TNFRSF19, TNFSF12, IFNGR1, IFNGR2, MAPKAP1, LOC402221, PDK4, C19ORF28, FARSA, TSPAN4, TYSND1, DEAF1, PKN1, WHSC1L1, ACP1, RASSF1, FAM76B, XL, PGAM4, WDR26, PIK3CD, FEN1, HS.31532, NR1H2, DNAJB12, FEZ1, PWWP2B, TNFAIP1, SH3BGR1, TCIRG1, PCMTD2, LOC643357, MYO1B, HS.374257, LOC648249, BIN1, HS.12876, PRMT1, JAK 1, JAK 2, HS.231861, BRD8, LOC347544, BANF1, GYPC, AGXT2L2, MORF4L1, MRRF, ACTB, OAS3, H1FX, UBE2G1, FAM10A4, C22ORF29, HLA, DRB4, TMEM69, C8ORF33, RCE1, HLAH, ARL6IP6, LOC402251, CYBA, HLAB, 55 AHSA1, ERP29, ADAT3, PPT2, SCAND1, TNC, RPL32, IFIT3, GRN, CTTN, LOC648210, ARPC4, TBCC, CTH, HLA, RIPK5, TAP2, GMPR, APRT, ACLY, TMED10, TUBA1A, AGPAT1, LOC407835, KIAA0460, PDIA6, PHF20L1, MRPL12, VAMP5, UBB, ARMCX1, BEX4, LOC441775, FAM152B, NAT5, OBFC2B, RAB4A, LOC440589, PHF5A, LRP11, TNPO1, STEAP1, LOC649150, CXORF40B, PTTG1IP, LOC284821, HP1BP3, CAPNS1, RNH1, HCG4, HS.406790, EEF1A1, HLA.DPA1, POLRMT, LOC388654, CPEB2, IFI27, GAA, ARFGF1, RAB7L1.

60

EJEMPLO 3

Para verificar la vía y esclarecer los componentes de la vía que median en el efecto de hipopigmentación del IFN- γ , recurrimos a una prueba basada en ARNip de las funciones de las proteínas. Se cultivaron melanocitos humanos primarios en un medio exento de suero tal y como se describió anteriormente (en el ejemplo 1) y se transfectaron con 100 nM de ARNip (una mezcla de 4 ARNip de direccionamiento de Dharmacon) que elegiría como diana el componente ARNm de interés utilizando reactivo de transfección basado en lípidos (Cellfectin II de Invitrogen). Después de la transfección, las células se tripsinizaron y se colocaron en placas dentro de pocillos y se trataron o bien con IFN- γ o se dejaron sin tratar como control. Después de 48 horas de tratamiento, las células se lisaron y se preparó ARN total a partir de las células y se midieron los niveles del transcrito génico de direccionamiento así como de DCT mediante PCR en tiempo real. Direccionar ARNip a JAK-1, STAT-1 y IFNGR-1 sustancialmente disminuyó el nivel de ARNm de los genes afines y anuló de forma concomitante la supresión mediada por IFN- γ del transcrito de DCT. Esta serie de experimentos validó de manera adicional el hecho de que los componentes de la vía son dianas potencialmente excelentes para conseguir pigmentación alterada.

15

EJEMPLO 4

El IFN- γ es conocido por funcionar de una manera específica según la especie. Para verificar si la hipopigmentación observada en los melanocitos se produce específicamente por el IFN- γ , los melanocitos se trataron con IFN- γ de ratón (100 U/ml) e IFN- γ humano (100 U/ml) durante 8 días. El IFN- γ de ratón no produjo hipopigmentación en melanocitos humanos confirmando que el efecto era específico y no un efecto genérico de adición de péptido. Cuando los melanocitos hipopigmentados tratados con IFN- γ humano se cultivaron en ausencia del IFN- γ solo en M254, se descubrió que las células recuperaron sus niveles de pigmentación después de 5 días, indicando reversibilidad de la hipopigmentación mediada por IFN- γ en melanocitos. Esto confirma que el IFN- γ es un componente importante en la mediación de cambios de pigmentación reversible fisiológicos.

25

EJEMPLO 5

Para investigar el papel causante del IFN- γ en condiciones de hipopigmentación cutánea, se aisló ARN de las epidermis con lesiones hipopigmentadas y no lesionadas de sujetos con lepra lepromatosa. Se sintetizó ADNc y se realizó un análisis PCR en tiempo real para comparar cambios de expresión génica entre genes de pigmentación (TYR, TYRP1, TYRP2, MITF) y genes conocidos por regularse positivamente mediante IFN- γ (PSMB8, PSMB9, HLA-DRB1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, IFNGR1, IRF1). Se descubrió que los niveles de expresión de genes de pigmentación incluyendo DCT (excepto MITF) eran menores en la piel lesionada de sujetos con lepra, coincidente con la hipopigmentación visible. También se observó un incremento concordante en firmas de genes de IFN- γ . El análisis mediante microscopía electrónica de la piel no lesionada versus la piel lesionada también indicó una disminución en la cantidad de melanosomas maduros (Etapas III y IV) en la piel lesionada en comparación con la piel no lesionada. Estos resultados coinciden con nuestras observaciones *in vitro* de que el IFN- γ bloquea los melanosomas en una etapa temprana de maduración, de este modo conduciendo a una hipopigmentación visible. Este estudio demuestra que en estados afectados esta vía podría funcionar para producir cambios visibles en pigmentación de la piel humana.

35

40

EJEMPLO 6

Para comprender el efecto del IFN- γ en la transferencia de melanosomas de melanocitos a queratinocitos, se establecieron cocultivos de melanocitos y queratinocitos epidérmicos humanos normales (de Lonza o establecidos a partir de epidermis derivada de prepucio) en una proporción de 1:2. Los cultivos se mantuvieron en 1:2 M254 y K562 (Invitrogen) respectivamente en presencia o ausencia de IFN- γ (100 U/ml) durante 8 días. Al cabo de los 8 días, los queratinocitos se separaron de los melanocitos por el procedimiento de tripsinización diferencial y se procesaron para ser analizados mediante microscopía electrónica. Se obtuvieron múltiples micrografías de queratinocitos con melanosomas y se analizaron para obtener la cantidad de melanosomas por micrografía. La zona citoplasmática de queratinocitos se calculó con software de análisis de imágenes. Se observó que la cantidad de melanosomas/zona de queratinocitos disminuyó en queratinocitos que se cultivaron en presencia de IFN- γ , indicando que el IFN- γ inhibe el proceso de transferencia de melanosomas a queratinocitos además de producir un efecto en la maduración de melanosomas.

55

Tabla 2 Técnica anterior en relación con las reivindicaciones actuales

Nº de Estudio	Título	Referencia	Resultado principal de su estudio	Resultados pertinentes	Novedad en nuestra patente
1	<i>Upregulation of the IFN-gamma-stimulated genes in the development of delayed pigmented spots on the dorsal skin of F1 mice of HR-1 x HR/De</i> (Regulación positiva de los genes estimulados por IFN-gamma en el desarrollo de manchas pigmentadas retardadas en la piel dorsal de ratones F1 de HR-1 x HR/De).	J Invest Dermatol. 2005 May; 124 (5):1053-61.	Se detectó aumento en la expresión de genes estimulados por interferón (IFN) gamma en lesiones pigmentadas retardadas. Los autores afirman que el IFN-gamma puede desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de manchas pigmentadas retardadas en el modelo de ratón de lentigo solar.	El estudio correlaciona las firmas del interferón gamma con la pigmentación, no obstante la implicación está en el desarrollo de manchas pigmentadas retardadas.	Estos estudios se realizan con ratones que no tienen pigmentación epidérmica y aparentemente contradicen nuestro estudio.
2	<i>Interferon-gamma reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells</i> (El interferón gamma reduce la expresión de antígenos de melanosomas y el reconocimiento de células de melanoma por parte de linfocitos T citotóxicos).	Am J Pathol. 2002 Feb;160 (2):521-8.	El IFN-gamma puede potenciar las respuestas inflamatorias pero dificultar el reconocimiento efectivo de células de melanoma por parte del sistema inmune.	El IFN-γ disminuye la expresión de los antígenos MART1 y GP100 en células de melanoma.	Este estudio no revela ningún hallazgo nuevo relacionado con la pigmentación en las células de melanoma estudiadas. Mientras que nuestro estudio describe información sobre regulación de pigmentación por parte del interferón gamma en melanocitos a través de regulación de maduración de melanosomas.
3	<i>Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles</i> (El interferón gamma es un inductor potente de cambios de tipo catágenos en folículos capilares anágenos humanos cultivados).	Br J Dermatol. 2005 Abril;152(4):623-31.	El interferón gamma produce cambios de tipo catágenos en células foliculares del cuero cabelludo humano.	La melanogénesis folicular finaliza en células tratadas con interferón gamma.	Este estudio se centra en células foliculares que son distintas de los melanocitos. Asimismo, el efecto del interferón gamma en la presente requiere cambios de ciclo celular y

					la pigmentación es una consecuencia. No se observa evidencia de alteraciones de maduración de melanosomas.
4	<i>Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype</i> (Actividad antitumoral de interferón alfa, beta y gamma y sus combinaciones en células de melanoma humanas <i>in vitro</i> : cambios de proliferación, síntesis de melanina, e inmunofenotipo).	J Invest Dermatol. 1990 Dic.;95 (6Supl):231S-237S.	El interferón beta produce un efecto antiproliferativo potente en células de melanoma humanas. Los antígenos de superficie celular (HLA-DR y DQ) se alteran con el tratamiento con interferón gamma.	El interferón alfa aumenta la síntesis de melanina y el interferón beta disminuye la síntesis de melanina de forma significativa. Se observó que la síntesis de melanina disminuyó con interferón gamma pero los datos no fueron estadísticamente significativos.	No hubo información sobre la maduración de melanosomas y el proceso de pigmentación, que es un efecto concertado de varias vías diferentes. Nuestro estudio demuestra el efecto del interferón gamma en muchas de estas vías bioquímicas independientes.

VENTAJAS DE LA INVENCIÓN

- 1) El potencial de aplicación de esta invención es inmenso en su habilidad para conseguir hipopigmentación controlada de la piel puesto que se centra en el proceso entero de maduración de melanosomas.
- 2) Los inhibidores de moléculas pequeñas o la neutralización basada en anticuerpos de esta vía serían útiles para el tratamiento de trastornos de pigmentación como melasma, hiperpigmentación posinflamatoria, quemaduras solares, hiperpigmentación inducida por rayos UV, nevus, acantosis nigricans, etc.
- 3) La aplicación cosmética no clínica de la vía también podría resultar útil para modular el tono de piel en individuos.
- 4) Puesto que el interferón funciona sin afectar los niveles de pigmentación de MITF esta estrategia sería útil en condiciones que aumentan la pigmentación a través de MITF.
- 5) El IFN- γ o su derivado puede formularse como una composición, por ejemplo, en una crema, gel o loción para uso tópico o puede estar presente como líquido. La composición también puede estar presente en forma de dosis unitaria que puede administrarse mediante infusión subcutánea si es preciso.

REFERENCIAS

1. Bennett, D. C., y Lamoreux, M. L. (2003). The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16, 333-344.
2. Carroll, J. M., Crompton, T., Seery, J. P., y Watt, F. M. (1997). Transgenic mice expressing IFN-gamma in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation, and hair loss. *J Invest Dermatol* 108, 412-422.
3. Choi, W., Miyamura, Y., Wolber, R., Smuda, C., Reinhold, W., Liu, H., Kolbe, L., y Hearing, V. J. (2010). Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. *J Invest Dermatol* 130, 1685-1696.
4. Cui, R., Widlund, H. R., Feige, E., Lin, J. Y., Wilensky, D. L., Igras, V. E., D'Orazio, J., Fung, C. Y., Schanbacher, C. F., Granter, S. R., y Fisher, D. E. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853-864.
5. Garbe, C., Krasagakis, K., Zouboulis, C. C., Schroder, K., Kruger, S., Stadler, R., y Orfanos, C. E. (1990). Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype. *J Invest Dermatol* 95, 231S-237S.
6. Gordon, P. R., Mansur, C. P., y Gilchrist, B. A. (1989). Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol* 92, 565-572.

- 7.Hu, Z. Z., Valencia, J. C., Huang, H., Chi, A., Shabanowitz, J., Hearing, V. J., Appella, E., y Wu, C. (2007). Comparative Bioinformatics Analyses and Profiling of Lysosome-Related Organelle Proteomes. *Int J Mass Spectrom* 259, 147-160.
- 8.Ito, T., Ito, N., Saathoff, M., Bettermann, A., Takigawa, M., y Paus, R. (2005). Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles. *Br J Dermatol* 152, 623-631.
- 9.Jin, S. H., and Kang, H. Y. Activation of Toll-like Receptors 1, 2, 4, 5, and 7 on Human Melanocytes Modulate Pigmentation. *Ann Dermatol* 22, 486-489.
- 10.Jin, S. H., y Kang, H. Y. (2010). Activation of Toll-like Receptors 1, 2, 4, 5, and 7 on Human Melanocytes Modulate Pigmentation. *Ann Dermatol* 22, 486-489.
- 11.Le Poole, I. C., Riker, A. I., Quevedo, M. E., Stennett, L. S., Wang, E., Marincola, F. M., Kast, W. M., Robinson, J. K., y Nickoloff, B. J. (2002). Interferon-gamma reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *Am J Pathol* 160, 521-528.
- 12.Martinez-Esparza, M., Ferrer, C., Castells, M. T., Garcia-Borron, J. C., y Zuasti, A. (2001). Transforming growth factor beta1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 971-983.
- 13.Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., y Wood, G. S. (2005). Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer* 114, 513-521.
- 14.Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., and Fisher, D. E. Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* 6, 130-140.
- 15.Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., y Fisher, D. E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* 6, 130-140.
- 16.Richardson, J., Lundegaard, P. R., Reynolds, N. L., Dorin, J. R., Porteous, D. J., Jackson, I. J., y Patton, E. E. (2008). mc1r Pathway regulation of zebrafish melanosome dispersion. *Zebrafish* 5, 289-295.
- 17.Sarra, M., Caruso, R., Cupi, M. L., Monteleone, I., Stolfi, C., Campione, E., Diluvio, L., Mazzotta, A., Botti, E., Chimenti, S., *et al.* (2011). IL-21 promotes skin recruitment of CD4(+) cells and drives IFN-gamma-dependent epidermal hyperplasia. *J Immunol* 186, 5435-5442.
- 18.Scott, G. A., Jacobs, S. E., and Pentland, A. P. (2006). sPLA2-X stimulates cutaneous melanocyte dendricity and pigmentation through a lysophosphatidylcholine-dependent mechanism. *J Invest Dermatol* 126, 855-861.
- 19.Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., y Shapiro, S. S. (2000). Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* 115, 162-167.
- 20.Sturm, R. A. (2009). Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 18, R9-17.
- 21.Yamaguchi, Y., Brenner, M., y Hearing, V. J. (2007). The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282, 27557-27561.
- 22.Yamaguchi, Y., y Hearing, V. J. (2009). Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35, 193-199.
- 23.Yamaguchi, Y., Morita, A., Maeda, A., y Hearing, V. J. (2009). Regulation of skin pigmentation and thickness by Dickkopf 1 (DKK1). *J Invest Dermatol Symp Proc* 14, 73-75.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> IPU, CSIR
- <120> PROCEDIMIENTO PARA MODULAR PIGMENTACIÓN TÓPICA DE LA PIEL
- 45 <130> 1420DEL2011
- <150> 1420DEL2011
- <151> 16/05/2005
- <160> 39
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 55 <223> Receptor de melanocortina tipo 1 de Homo sapiens (receptor de hormona estimulante de melanocitos alfa) (MC1R) Cebador directo
- <400> 1
- tgcaaaagga ggtgaaatcc 20
- 60

ES 2 664 610 T3

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> Receptor de melanocortina tipo 1 de Homo sapiens (receptor de hormona estimulante de melanocitos alfa) (MC1R) Cebador inverso

<400> 2
10 agtgcccagt ctgagcctta 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> Melan-A de Homo sapiens (MLANA), Cebador directo

<400> 3
20 gatcatcggg acagcaaagt 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> Melan-A de Homo sapiens (MLANA), Cebador inverso

<400> 4
30 aggtgtctcg ctggctcta 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Artificial
<220>
<223> Factor de transcripción asociado con microftalmia de Homo sapiens (MITF), variante de transcripción 5. Cebador directo

<400> 5
40 ccaggcata acacacattc 20

<210> 6
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Factor de transcripción asociado con microftalmia de Homo sapiens (MITF), variante de transcripción 5 Cebador inverso.

50
<400> 6
tccatcaagc ccaagattc 20

<210> 7
55 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Melanoflina de Homo sapiens (MLANA), Cebador directo

60

ES 2 664 610 T3

<400> 7
gacagcgacc agacagatga 20

<210> 8
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Melanofilina de Homo sapiens (MLANA), Cebador inverso

10
<400> 8
gaccttgagg ctgagtggag 20

<210> 9
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Dopacromotautomerasa de Homo sapiens (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con tirosina 2)

20 (DCT), Cebador directo

<400> 9
gaacactggt ggctttggt 20

25 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

30 <223> Dopacromotautomerasa de Homo sapiens (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con tirosina 2)
(DCT), Cebador inverso

<400> 10
35 ggtaaggcat gacacccta 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Proteína relacionada con tirosinasa 1 de Homo sapiens (TYRP1), Cebador directo

<400> 11
45 agcagtagtt ggcgctttgt 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Proteína relacionada con tirosinasa 1 de Homo sapiens (TYRP1), Cebador inverso

<400> 12
55 tcagtgagga gaggctggtt 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

ES 2 664 610 T3

<223> Tirosinasa de Homo sapiens (albinismo oculocutáneo 1A Cebador directo

<400> 13
ttgtactgcc tgctgtggag 20

5

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>

<223> Tirosinasa de Homo sapiens (albinismo oculocutáneo 1A Cebador inverso

<400> 14
caggaacctc tgctgaaag 20

15

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>

<223> STAT 1 HUMANO Cebador directo

<400> 15
ttcaggaaga cccaatccag 20

25

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>

<223> STAT1 HUMANO. Cebador inverso

<400> 16
tgaatattcc ccgactgagc 20

35

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>

<223> JAK1 HUMANO Cebador directo

<400> 17
tgctcctgag tgtgtgagg 20

45

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>

<223> JAK1 HUMANO Cebador inverso

<400> 18
aggtcagcca gctcctaca 20

55

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

<223> JAK2 HUMANO Cebador directo

<400> 19
gagcctatcg gcatggaata 20

5

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>

<223> JAK2 HUMANO Cebador inverso

<400> 20
actgccatcc caagacattc 20

15

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>

<223> FNFR1 humano Cebador directo

<400> 21
catcacgtca taccagccat tt 22

25

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>

<223> IFNFR1 humano Cebador inverso

<400> 22
ctggattgtc ttcggtatgc at 22

35

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>

<223> IFNFR2 humano Cebador directo

<400> 23
atcagcgatg tcaaagggag 20

45

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>

<223> IFNFR2 humano Cebador inverso

<400> 24
tgacaatgcc ttggttcaa 20

55

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

<223> IRF1 humano Cebador directo

<400> 25
aagtcagcc gagatgctaa 20

5 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> IRF1 humano Cebador inverso

<400> 26
tagctgctgt ggtcatcagg 20

15 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> IRF3 humano Cebador directo

<400> 27
tcagggcctt ggtagaaatg 20

25 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> IRF3 humano Cebador inverso

<400> 28
gcaggtaggc cttgtactgg 20

35 <210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> IRF4 humano Cebador directo

<400> 29
ttaccaccaa gggcaggtag 20

45 <210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> IRF4 humano Cebador inverso

<400> 30
aaagccaaga ggtgcgagta 20

55 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

<223> IRF7 humano Cebador directo

<400> 31
taccatctac ctgggcttcg 20

5

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>

<223> IRF7 humano Cebador inverso

<400> 32
tgctgctatc caggaagac 20

15

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>

<223> IRF9 humano Cebador directo

<400> 33
gctgctccca atgtctgaat 20

25

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>

<223> IRF9 humano Cebador directo

<400> 34
gctgctccca atgtctgaat 20

35

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>

<223> IRF9 humano Cebador inverso

<400> 35
aggaaggagg aagaggatgc 20

45

<210> 36
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>

<223> PSMB8 humano Cebador directo

<400> 36
tcgcctcaa gttccagcat gg 22

55

<210> 37
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

<223> PSMB8 humano Cebador inverso

<400> 37
ccaacatct tcctcatgt gg 22

5

<210> 38
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> PSMB9 humano Cebador directo

<400> 38
ttgtgatggg ttctgattcc cg 22

15

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> PSMB9 humano Cebador inverso

<400> 39
cagagcaata gcgtctgtgg 20

REIVINDICACIONES

1. IFN- γ para su uso en el tratamiento de un trastorno de pigmentación cutánea.
- 5 2. IFN- γ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el IFN- γ altera de manera reversible la maduración de melanosomas y/o altera la transferencia de melanosoma a queratinocitos.
3. IFN- γ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el IFN- γ modula la expresión de componentes de vía de IFN- γ seleccionados del grupo que comprende IFNGR1, JAK1 y STAT1.
- 10 4. IFN- γ para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el IFN- γ se pone en contacto con melanocitos en el intervalo de 100 - 500 U/mL durante un periodo que oscila entre 1 y 10 días.
- 15 5. IFN- γ para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el IFN- γ altera el nivel de TYR, y TYRP2/DCT, CNO, HPS4, GPR143, OCA2, SLC7A11 y MCOLN3.
6. IFN- γ para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el IFN- γ se ha de administrar a un sujeto que lo necesite mediante administración tópica o subcutánea; preferiblemente, la administración tópica o subcutánea es en una forma de dosificación seleccionada de un grupo que comprende un polvo, una disolución, una emulsión, una emulsión fluida, una suspensión, una suspensión fluida, un semisólido, una pomada, una pasta, una crema, un gel, una jalea, una espuma, un implante, una inyección, un parche y un pulverizador.
- 20 7. IFN- γ para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho trastorno de pigmentación cutánea se selecciona del grupo que comprende hiperpigmentación, hipopigmentación, pigmentación despigmentada, pigmentación posinflamatoria, piel dañada por el sol, acantosis nigricans y lentigo solar, lepra intermedia, lepra tuberculoide, lepra dimorfa, lepra lepromatosa.
- 25 8. El uso del IFN- γ para tratar un trastorno de pigmentación cutánea para aplicación cosmética donde dicho trastorno de pigmentación cutánea es una marca de nacimiento pigmentada o cambios de pigmentación asociados a la edad.
9. El uso de IFN- γ para modular pigmentación cutánea para fines cosmeceúticos.
- 35 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde el IFN- γ altera de forma reversible la maduración de melanosomas que ocurre en etapas I y II y/o altera la transferencia de melanosoma a queratinocitos.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el IFN- γ modula la expresión de componentes de vía de IFN- γ seleccionados del grupo que comprende IFNGR1, JAK1 y STAT1.
- 40 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el IFN- γ se pone en contacto con melanocitos en el intervalo de 100 - 500 U/mL durante un periodo que oscila entre 1 y 10 días.
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde el IFN- γ altera el nivel de TYR, y TYRP2/DCT, CNO, HPS4, GPR143, OCA2, SLC7A11 y MCOLN3.
- 45 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde el IFN- γ se ha de administrar a un sujeto que lo necesite mediante administración tópica o subcutánea; preferiblemente, la administración tópica o subcutánea es en una forma de dosificación seleccionada de un grupo que comprende un polvo, una disolución, una emulsión, una emulsión fluida, una suspensión, una suspensión fluida, un semisólido, una pomada, una pasta, una crema, un gel, una jalea, una espuma, un implante, una inyección, un parche y un pulverizador.
- 50

Figura 1

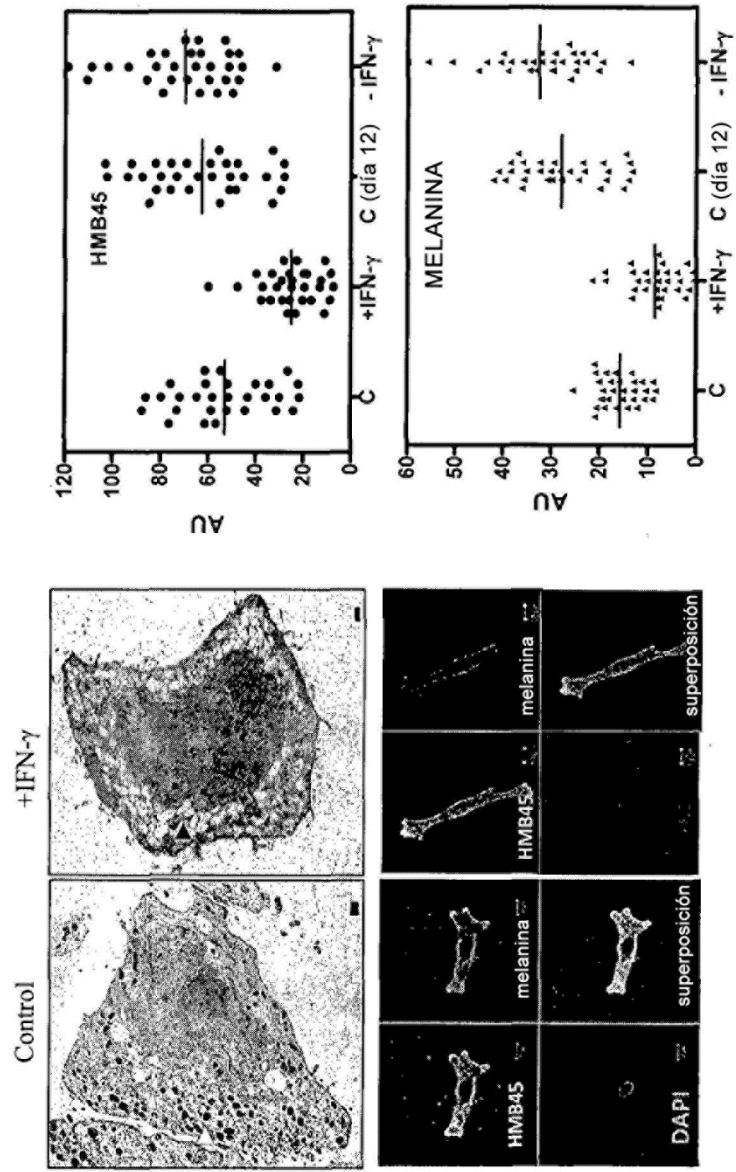


Figura 2

