

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 177**

51 Int. Cl.:

A61K 36/73	(2006.01) A61P 37/08	(2006.01)
A61K 8/34	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61K 8/46	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 8/97	(2007.01)	
A61K 31/047	(2006.01)	
A61K 31/197	(2006.01)	
A61K 36/23	(2006.01)	
A61K 36/53	(2006.01)	
A61K 36/75	(2006.01)	
A61P 17/16	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012 PCT/JP2012/056581**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12124738**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012 E 12757563 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2687222**

54 Título: **Promotor de la producción de bleomicina hidrolasa**

30 Prioridad:

15.03.2011 JP 2011057126

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

22.08.2019

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 Ginza 7-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**HIBINO, TOSHIHIKO;
YAMADA, SHOKO y
FUKUSHIMA, HIDEKAZU**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 723 177 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

Promotor de la producción de bleomicina hidrolasa

Campo técnico

5 La presente invención proporciona un sustrato de un promotor de la producción de bleomicina hidrolasa para su uso en un método para mejorar o prevenir la piel seca provocada por una dermatitis atópica debida a la reducción de la expresión de bleomicina en la piel.

Técnica anterior

10 Las fibras de queratina de la capa granular epidérmica se agregan por unión a una proteína denominada filagrina durante la queratinización, creando una forma específica denominada "patrón de queratina". Aunque está presente en grandes cantidades un precursor de filagrina, la profilagrina (formada por 10 a 12 unidades de filagrina repetidas en tándem) en los gránulos queratohialinos de las células granulosas, durante la queratinización las fibras de queratina se agregan mediante una desfosforilación, junto con la formación de monómeros de filagrina. Posteriormente, después de que las fibras agregadas hayan sido desiminadas mediante acción de una enzima denominada peptidil arginina desiminasa (PAD) y liberada de la queratina, se degradan en aminoácidos y similares en la capa córnea superior. Estos aminoácidos se denominan factores hidratantes naturales (NMF, por sus siglas en inglés), y se sabe que desempeñan un papel importante en la conservación de la hidratación en la capa córnea y en la absorción de los rayos ultravioleta (Blank, I. H., J. I. Dermatol., 18, 433 (1952); Blank, I. H., J. I. Dermatol., 21, 259 (1953)).

20 Desde que se ha demostrado claramente que los aminoácidos que son el componente principal de los NMF se originan a partir de la filagrina, se han puesto en marcha investigaciones sobre la correlación entre estados patológicos que presentan una piel seca y la filagrina. En fechas recientes, se ha determinado claramente que la cantidad de aminoácidos disminuye en la piel seca asociada con la xerosis senil, enfermedades atópicas y similares (Horii, I., *et al.*, Br. J. Dermatol., 121, 587-592 (1989); Tanaka, M., *et al.*, Br. J. Dermatol., 139, 618-621 (1989)).

25 La PAD induce la desiminación de la filagrina actuando sobre su resto arginina y convirtiéndolo en un resto citrulina. Se considera que, como resultado de que la filagrina se desimina de esta manera, se debilita la afinidad entre la filagrina y las fibras de queratina y se liberan las fibras de queratina, provocando con ello que la filagrina sea más susceptible a la acción de proteasas que, en último término, la degradan para producir NMF.

30 Los autores de la presente invención han identificado a la calpaína-1 como una enzima que degrada la filagrina tras su desiminación por PAD, y determinaron que sus productos de degradación, en forma de fragmentos peptídicos pequeños, son degradados en unidades de aminoácidos, concretamente NMF, por la bleomicina hidrolasa (BH) (Journal of Investigative Dermatology (2008), volumen 128, resúmenes, 390, 539; Joint Conference of the 30th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and the 80th Conference of the Japanese Biochemical Society, colección de resúmenes de presentación, p. 583; Journal of Biological Chemistry, 284, n.º 19, pp. 12829-12836, 2009, 30P-0251; y publicación de patente japonesa pendiente de examen n.º 2008-135944 (denominada solicitud n.º 944).

35 Según investigaciones más recientes, se sabe que ciertas dermatitis atópicas aparecen debido a una anomalía en el gen de profilagrina, y se observan anomalías en este gen en aproximadamente 5% al 50% de pacientes con dermatitis atópica (Smith, F. J. D., *et al.*, Nat. Genet., 38:337-342 (2006); Aileen Sandilands, *et al.*, J. I. Dermatol., 127, 1282-1284 (2007); y Nomura, T., *et al.*, J. I. Dermatol., 128(6):1436-1441 (2008)). Sin embargo, esto no significa necesariamente que la expresión de la filagrina disminuye mucho en la piel de pacientes con dermatitis atópica.

45 La solicitud de patente japonesa JP2006-111560 A describe una sustancia que comprende uno o más tipos seleccionados de extractos *Oryza sativa* L., *Pueraria lobata* Ohwii, *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maximowicz, *Lonicera japonica* Thunberg, *Saxifraga stolonifera*, *Rubus suavissimus* Shugan Lee, *Apocynum venetum* L., *Crataegus cuneata*, *Rosa roxburghii* Traff. f. *normalis* Rehd. et Wils, *Acanthopanax senticosus* Harms, *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehd, *Perilla frutescens crispata*, *Coptis japonica*, *Asarum sieboldii*, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Phellodendron amurense*, *Morus alba*, *Paeonia suffruticosa* Andrews, *Paeonia lactiflora* Pallas, *Citrus unshiu* Mercov, *Sapindus mukorossi* Gaertn, *Syzygium aromaticum*, *Lilium candidum*, *Glycine max* Merrill, y *Tremella fuciformis* B.

Documentos de la técnica anterior

50 *Documentos que no son patentes*

- Documento que no es patente 1: Blank, I. H., J. I. Dermatol., 18, 433 (1952).

- Documento que no es patente 2: Blank, I. H., J. I. Dermatol., 21, 259 (1953).

- Documento que no es patente 3: Horii, I., *et al.*, Br. J. Dermatol., 121, 587-592 (1989).

- Documento que no es patente 4: Tanaka, M., *et al.*, Br. J. Dermatol., 139, 618-621 (1989).
- Documento que no es patente 5: Kamata, at al., J. Biochem., 141, 69-76, 2007.
- Documento que no es patente 6: Journal of Investigative Dermatology (2008), volumen 128, resúmenes, S90, 539.
- 5 - Documento que no es patente 7: Joint Conference of the 30th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and the 80th Conference of the Japanese Biochemical Society, colección de resúmenes de presentación, p. 583 3P-0251.
- Documento que no es patente 8: Journal of Biological Chemistry, 284, n.º 19, pp. 12829-12836, 2009.
- Documento que no es patente 9: Smith, F. J. D., *et al.*, Nat. Genet., 38:337-342 (2006).
- Documento que no es patente 10: Aileen Sandilands, *et al.*, J. I. Dermatol., 127, 1282-1284.
- 10 - Documento de patente JP2006-111560 A.

Descripción de la invención

Problemas que se van a solucionar mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un promotor de la producción de bleomicina hidrolasa.

15 En la solicitud n.º 944 mencionada anteriormente, el autor de la presente invención claramente determina que la estimulación de la actividad de la bleomicina hidrolasa mejora la función de barrera de la piel a través de la producción de NMF. De esta manera, se cree que la bleomicina hidrolasa actúa en la etapa final de la producción de NMF. Sin embargo, resulta interesante advertir que, puesto que se sigue observando la expresión de filagrina en numerosos pacientes con dermatitis atópica con respecto a la piel seca provocada por la dermatitis atópica, se cree que esta acción es provocada por un factor diferente a la anomalía en el gen de filagrina.

20 Los inventores de la presente invención han examinado las fluctuaciones en la expresión de la bleomicina hidrolasa según un ensayo de piel seca en sujetos humanos y han analizado el mecanismo para controlar esta expresión basándose en la hipótesis de que una menor expresión de bleomicina hidrolasa en la piel humana no solo está relacionada con una disminución en la función de barrera de la piel provocada por una anomalía en el mecanismo de producción de NMF, sino que también está relacionada con la dermatitis atópica causada principalmente por trastornos inmunológicos y la piel seca y similar provocada por esta dermatitis. Como resultado, los inventores de la presente invención han descubierto que una menor expresión de bleomicina hidrolasa está relacionada con la piel seca provocada por la dermatitis atópica, y que está presente una región de control que induce, de modo destacado, la expresión de esa enzima en la región flanqueante-5' del gen que codifica esa enzima. De modo más específico, los inventores de la presente invención han clonado la región flanqueante-5' de la bleomicina hidrolasa (BH). En un análisis de delección de esta, se identificó una región importante para la actividad del promotor de BH, -216 pb cadena abajo de este. Un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética demostró que MZF-1, Sp-1 y los factores reguladores de interferón (IRF, por sus siglas en inglés) IRF-1/2 son capaces de unirse a esta región *in vitro*. Además, la actividad del promotor de BH disminuyó considerablemente mediante una mutagénesis específica de sitio de los motivos MZF-1 y Sp-1. Estos datos sugieren que la expresión de BH se sobrerregula a través de MZF-1 y Sp-1. Resulta interesante advertir que una citoquina Th1, el interferón (IFN)- γ , disminuye significativamente la expresión de BH. Los efectos inhibidores de IFN- γ sobre la expresión de BH se verificaron en un análisis empleando mutagénesis específica de sitio y ARN de interferencia pequeño. Por otra parte, una citoquina Th2, IL-4, no produjo ninguna acción directa sobre la expresión de BH. Sin embargo, la IL-4 infrarreguló a MZF-1 y Sp-1 en queratinocitos cultivados y, por tanto, esto sugiere que actúa como supresor de la regulación de BH. Por último, se investigó la expresión de BH en la piel de pacientes que padecen dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés). Puesto que la actividad y la expresión de BH disminuyen considerablemente en piel con lesiones de AD, se sugirió que estaba presente un defecto en la vía de degradación de la filagrina en la AD. Tal como se ha indicado anteriormente, los inventores de la presente invención han descubierto que es muy probable que la transcripción de BH se regule durante la diferenciación y la inflamación. Así, como resultado de investigar la actividad estimulante de la producción de bleomicina hidrolasa de diversos agentes farmacéuticos y medicamentos a base de plantas, los inventores de la presente invención han descubierto que ciertos fármacos y medicamentos a base de plantas tienen esta actividad, lo cual ha conducido a completar la presente invención.

El contenido de la presente invención se define en la reivindicación.

Efectos de la invención

50 La presente invención permite proporcionar un nuevo promotor de la producción de NMF y un remedio para la piel seca.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de una transferencia Western que indica la relación entre las cantidades de bleomicina

- hidrolasa en extractos de piel humana obtenidos mediante pelado con cinta adhesiva y el número de veces que se realiza el pelado con cinta adhesiva.
- La figura 2 es un diagrama de una transferencia Western que indica la relación entre las cantidades de bleomicina hidrolasa en extractos de piel humana y la piel seca, en la que T y A indican las muestras procedentes de sujetos que no presentan piel seca, N indica una muestra procedente de un sujeto que tiene la piel algo seca, y M indica una muestra procedente de un sujeto con piel seca.
- La figura 3 es una gráfica que indica la relación entre las cantidades de bleomicina hidrolasa presentes en un extracto de capa córnea obtenido del brazo de sujetos humanos y su actividad enzimática, en la que los números indicados en el eje horizontal representan los números de identificación de los sujetos.
- La figura 4 indica los valores obtenidos mediante una aproximación de primer orden usando el método de mínimos cuadrados para la relación entre las cantidades de bleomicina hidrolasa obtenidas en la figura 3 y su actividad.
- La figura 5 indica los resultados de análisis estadísticos relacionados con la bleomicina hidrolasa presente en un extracto de capa córnea obtenido del brazo de un sujeto humano y los parámetros de la piel (A: aminoácidos libres, B: actividad, C: pérdida de agua transepidermica (TEWL, por sus siglas en inglés)), en la que "BH baja" indica una cantidad de bleomicina hidrolasa menor que 10 y una actividad menor que 1,5 (nmol/min/ml), y "BH alta" indica una cantidad de bleomicina hidrolasa igual o mayor que 10 y una actividad igual o mayor que 1,5 (nmol/min/ml).
- La figura 6 es un diagrama de flujo de un cuestionario para clasificar la piel.
- La figura 7 indica los resultados de medir parámetros de la piel de la capa córnea de sujetos clasificados según el diagrama de flujo de la figura 6.
- La figura 8 muestra diagramas de tinción de tejidos que muestran la localización de la bleomicina hidrolasa y la filagrina en piel normal.
- La figura 9 muestra diagramas de tinción de tejidos que muestran la localización de la bleomicina hidrolasa y la filagrina en la piel de pacientes con dermatitis atópica.
- La figura 10 es una gráfica que indica la relación entre la diferenciación de los queratinocitos y los niveles de expresión de la bleomicina hidrolasa usando una PCR cuantitativa, en la que los valores en el eje vertical representan cantidades relativas en el caso de asignar un valor de 1 al nivel de expresión después de alcanzar una confluencia del 80%.
- La figura 11 es un diagrama esquemático que muestra la región flanqueante-5' del gen que codifica la bleomicina hidrolasa.
- La figura 12 es una gráfica que indica los resultados de un ensayo de luciferasa del promotor de BH usando queratinocitos epidérmicos humanos.
- La figura 13 es una gráfica que indica la relación entre la expresión de los factores de transcripción Sp-1, MZF-1 y GATA-1 y la irradiación UV.
- La figura 14 es una gráfica que indica la relación entre los niveles de bleomicina hidrolasa en queratinocitos epidérmicos humanos normales y la expresión de proteasas.
- La figura 15 indica los cebadores utilizados para producir mutantes que tienen defectos 5' consecutivos en la región flanqueante-5' de BH mediante PCR.
- La figura 16 indica los cebadores utilizados para analizar los niveles de transcripción de BH y factores relacionados mediante una RT-PCR a tiempo real cuantitativa.
- La figura 17 indica las sondas usadas para analizar el desplazamiento en la movilidad electroforética.
- La figura 18(A) muestra un dibujo esquemático de la región flanqueante-5' de la BH humana, en la que se determinó el supuesto sitio de unión al factor de transcripción en la región flanqueante-5' mediante una selección usando el programa Genome Net Motif Program. La figura 18(B) muestra la región del promotor de BH determinada mediante un análisis de delección. La figura 18(C) muestra la secuencia de nucleótidos de la región -216/-1 que contiene la secuencia de promotor mínima de BH y los supuestos sitios de unión del factor de transcripción, en la que los supuestos sitios de unión del factor de transcripción están subrayados.
- La figura 19(A) indica los resultados de determinar las propiedades de los sitios de unión del factor de transcripción en el promotor de BH mediante mutagénesis específica de sitio, que consisten en un diagrama esquemático de una construcción de delección del supuesto sitio de unión del factor de transcripción que indica su actividad luciferasa en queratinocitos cultivados, en la que se realizó una mutagénesis específica de sitio usando una construcción de abarca la secuencia de nucleótidos de la región -616/+1. La figura 19(B) muestra la unión de MZF-1, Sp-1, GATA-1

o IRF-1/2 a un elemento de acción en cis del promotor de BH, en la que se realizó un experimento en forma de un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) empleando extractos nucleares obtenidos a partir de queratinocitos cultivados y sondas oligonucleotídicas bicatenarias biotiniladas que contienen el supuesto sitio de unión del factor de transcripción MZF-1, Sp-1, GATA-1 o IRF-L/2, indicando el carril 1 el perfil de unión de la sonda biotinilada en el extracto nuclear, e indicando el carril 2 el perfil de unión de la sonda biotinilada tras una unión competitiva con una sonda no marcada presente en exceso en una cantidad al doble que la de la sonda biotinilada.

La figura 20(A) indica los resultados de un análisis de RT-PCR a tiempo real de la expresión de BH que muestra los efectos de citoquinas Th1, Th2 y Th17 sobre la expresión del gen de BH. La figura 20(B) indica los resultados de un análisis de mutación del sitio de unión a IRF-1/2 que muestra actividad del promotor de BH en queratinocitos cultivados en presencia de IFN- γ , según se determina transfectando queratinocitos con pGL3-216 que contiene los sitios de unión a IRF-1/2 intactos de la región del promotor de BH, seguido de un tratamiento con IFN- γ durante 24 horas (panel superior), y de la transfección de queratinocitos con Δ pGL3-616 (mutante de delección de IRF-1/2), seguido de un tratamiento durante 24 horas en presencia o en ausencia de IFN- γ o IL-4 a una concentración de 10 mg/ml (panel inferior). La figura 20(C) indica los resultados de medir la expresión de los genes de IRF-1 e IRF-2 usando ARN de interferencia pequeño (ARNip) para determinar si IRF-1/2 es o no es un mediador fundamental para la infraregulación inducida por IFN- γ , mediante la transfección de queratinocitos con ARNip de IRF-1 o IRF-2 (40 nM), seguido de un cultivo durante 24 horas, un tratamiento con IFN- γ 10 ng/ml y otro cultivo durante 24 horas, seguido del aislamiento del ARN, indicando el panel del lado derecho los efectos de silenciamiento de IRF-1 e IRF-2.

La figura 21(A) indica los resultados de un análisis de la expresión de BH, calpaína-1 y los supuestos factores de transcripción en células en proliferación o células diferenciadas mediante una PCR a tiempo real para investigar la regulación de la transcripción en la epidermis. La figura 21(B) indica los resultados de un análisis de los patrones de expresión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1, GATA-1, IRF-1 e IRF-2 en queratinocitos cultivados.

La figura 22(A) indica los efectos del IFN- γ sobre la expresión de los supuestos factores de transcripción IRF-1 e IRF-2. La figura 22(B) indica los efectos de IL-4 sobre la expresión de los supuestos factores de transcripción IRF-1, IRF-2, MZF-1 y Sp-1.

La figura 23(A) indica la localización simultánea de BH y filagrina en la capa granular, según se indica mediante una tinción doble con un anticuerpo anti-BH y un anticuerpo antifilagrina en epidermis normal. La figura 23(B) indica las actividades de BH de extractos procedentes de piel con lesiones y piel sin lesiones de un paciente con AD.

La figura 24 indica los efectos estimulantes de diversos medicamentos a base de plantas y fármacos sobre la producción de bleomicina hidrolasa.

Mejor modo de realizar la invención

La bleomicina hidrolasa es una enzima hidrolítica de cisteína de péptidos citoplásmica que tiene un peso molecular de 250 kDa a 280 kDa (hexámero) y, en un primer momento, se determinó que su función era la desactivación metabólica del glicopéptido bleomicina, que se emplea con frecuencia en la quimioterapia de combinación del cáncer. La bleomicina hidrolasa contiene los restos de sitio activo característicos de la superfamilia de la papaína de las cisteína proteasas, y su gen codificador está presente en el locus genético 17q11.2 en seres humanos (Takeda, *et al.*, J. Biochem., 119, 29-36, 1996). Está presente en todos los tejidos, y aunque se sabe que también está presente en la piel (Kamata, *et al.*, J. Biochem., 141, 69-76, 2007), su relación con la filagrina era completamente desconocida hasta que fue revelada por los inventores de la presente invención.

Basándose en los resultados de la tinción de tejidos, se determinó que la bleomicina hidrolasa se expresaba a niveles altos en la capa superior de la epidermis en la piel normal, de la misma manera que la filagrina (figura 8). Por otra parte, en pacientes con dermatitis atópica, la expresión de esta enzima, así como de la filagrina, disminuye en localizaciones de erupciones atópicas (figura 9). Esto sugiere con fuerza que la causa de la dermatitis atópica no es una anomalía en el gen de la profilagrina, sino una anomalía del sistema enzimático responsable de su degradación. Además, la actividad bleomicina hidrolasa es significativamente menor no solo en las áreas con lesiones de la piel de pacientes con dermatitis atópica, sino también en las áreas sin lesiones (los datos no se muestran).

Además, como resultado de estudiar las fluctuaciones en los niveles de expresión de la bleomicina hidrolasa usando queratinocitos cultivados, y por contraste con el hecho de que esta enzima apenas se expresa en queratinocitos no diferenciados, se determinó que se expresaba con fuerza en queratinocitos que han alcanzado la confluencia y en el que el proceso de diferenciación ha avanzado, y aunque apenas se expresa en células basales, se determinó que se expresaba con fuerza después de migrar hacia las células epidérmicas después de que hubiese avanzado la diferenciación (figura 10). Este resultado apoya los resultados de la tinción de células mencionada anteriormente. La región flanqueante-5' del gen que codifica la bleomicina hidrolasa y, en particular, la región reguladora de la transcripción y los factores de transcripción que se unen a esta región, se muestran en la figura 11. Es necesario incluir una región que se extiende al menos 216 pb cadena abajo desde la secuencia codificadora de la bleomicina hidrolasa para expresar esta enzima. Se cree que la expresión de la bleomicina hidrolasa es especialmente estimulada mediante la estimulación de la actividad de unión de factores de transcripción seleccionados entre los

factores de transcripción descritos en la figura 11 de IRF-1, IRF-2, MZF-1, SP-1 y GATA-1 contenidos en esta región. De hecho, cuando la expresión de la bleomicina hidrolasa es estimulada mediante irradiación ultravioleta (UV) (los datos no se muestran), se observa una correlación entre la estimulación de la expresión de MZF-1 y GATA-1 y la intensidad y la duración de la irradiación con UV (figura 13).

- 5 La estimulación de la producción de la bleomicina hidrolasa también se ve afectada por las citoquinas. Por ejemplo, la interleuquina-4 (IL-4), que es un tipo de citoquina Th2 que se sabe que está implicada en la dermatitis atópica, infrarregula la expresión de la bleomicina hidrolasa. Esto apoya los bajos niveles de expresión de bleomicina hidrolasa observados en la piel de pacientes con dermatitis atópica. Por otra parte, el interferón- γ , que es un representante típico de una citoquina Th1 que tiene la capacidad para inhibir la producción de IgE en contraste con IL-4, aumenta significativamente la expresión de la bleomicina hidrolasa. Además, una citoquina Th2 que también es un ejemplo típico de una citoquina inflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), también aumenta significativamente la expresión de esta enzima. Además de estas sustancias, la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa también aumenta por una irradiación con UV. Sobre la superficie del cuerpo, aunque estos resultados no se muestran, se ha confirmado que la actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel de mejillas susceptibles a la irradiación por UV aumenta por la irradiación con UV.

Aunque se emplea extracto de *Rosa roxburghii*, extracto de raíz de angélica, extracto de corteza de alcornoque, extracto de *Lamium album* y extracto de romero en preparaciones externas para la piel, no se conoce que ninguno de estos extractos tenga efectos estimulantes de la producción de bleomicina hidrolasa ni efectos de estimulación de la producción de NMF ni efectos para mejorar la piel seca. Por ejemplo, solo se sabe que el extracto de *Rosa roxburghii* tiene un efecto estimulante de la síntesis de ceramida (publicación de patente japonesa pendiente de examen n.º 2006-111560) y un efecto inhibidor de la colagenasa (publicación de patente japonesa pendiente de examen n.º 2006-241148). Aunque también se emplean de forma similar el GABA de bencenosulfonilo (ácido γ -aminobutírico de bencenosulfonilo) y el eritritol en preparaciones externas para la piel, no se conoce que ninguno de estos dos fármacos tenga efectos estimulantes de la producción de bleomicina hidrolasa ni efectos de estimulación de la producción de NMF.

Los extractos mencionados anteriormente pueden obtenerse según métodos normales y, por ejemplo, pueden obtenerse sumergiendo o sometiendo a reflujo una porción o toda la planta de origen con un disolvente de extracción a temperatura normal o con calentamiento, seguido de una filtración y una concentración. El sitio extraído puede secarse antes de la extracción con disolvente. Puede usarse cualquier disolvente como disolvente de extracción, con la condición de que sea un disolvente que se emplee normalmente para la extracción, y los ejemplos incluyen disolventes orgánicos en forma de alcoholes, tales como metanol, etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina, alcoholes que contienen agua, cloroformo, dicloroetano, tetracloruro de carbono, acetona, acetato de etilo, hexano, así como disolventes acuosos, tales como agua, disolución salina fisiológica, tampón fosfato o tampón borato, y estos pueden usarse solos o en combinación. Se emplean preferiblemente como disolvente un tipo o dos o más tipos seleccionados del grupo que consiste en agua, metanol, etanol y 1,3-butilenglicol.

El extracto obtenido extrayendo con un disolvente de la manera descrita anteriormente puede usarse directamente o después de una concentración mediante liofilización o similares, o según sea necesario, y pueden retirarse las impurezas usando un método de absorción, tal como una resina de intercambio iónico, o puede usarse después de adsorber con una columna de polímeros porosos (tal como una columna de Amberlite XAD-2), eluyendo con un disolvente deseado y después concentrando.

Ciertos extractos, tales como extracto de *Rosa roxburghii*, extracto de raíz de angélica, extracto de corteza de alcornoque, extracto de *Lamium album* y extracto de romero, y fármacos, tales como GABA de bencenosulfonilo y eritritol, han demostrado una acción que estimula, de una manera dependiente de la concentración, la producción de bleomicina hidrolasa. Así, desde este punto de vista, las cantidades incorporadas de extractos, tales como extracto de *Rosa roxburghii*, extracto de raíz de angélica, extracto de corteza de alcornoque, extracto de *Lamium album* y/o extracto de romero en el promotor de la producción de bleomicina hidrolasa de la presente invención son del 0,0001% en peso al 20,0% en peso, preferiblemente del 0,0001% en peso al 10,0% en peso, y más preferiblemente del 0,001% en peso al 1% en peso como su peso seco basado en el peso total del agente. La cantidad incorporada de fármacos, tales como GABA de bencenosulfonilo y/o eritritol es de 0,0001 mmol a 20,0 mmol, preferiblemente de 0,0001 mmol a 10,0 mmol, y más preferiblemente de 0,001 mmol a 1 mmol como su peso seco basado en el peso total del agente.

El promotor de la producción de bleomicina hidrolasa según la presente descripción puede producirse según métodos normales. Además, aunque también puede prepararse usando un tipo o dos o más tipos de los extractos y fármacos mencionados anteriormente como componentes del promotor de la producción de bleomicina hidrolasa, también se incorporan de modo adecuado componentes que normalmente se emplean en preparaciones externas para la piel, tales como cosméticos o productos farmacéuticos que contienen cuasifármacos, si es necesario, cuyos ejemplos incluyen aceites, tensioactivos, polvos, colorantes, agua, alcoholes, espesantes, agentes quelantes, siliconas, antioxidantes, absorbentes del ultravioleta, hidratantes, aromas, diversos ingredientes medicinales, antisépticos, reguladores del pH y neutralizantes.

No existen limitaciones particulares en la forma de dosificación del promotor de la producción de bleomicina

hidrolasa de la presente invención y este puede tener cualquier forma arbitraria, tal como un sistema en disolución, un sistema solubilizado, un sistema emulsionado, un sistema de polvo dispersado, un sistema de doble capa de agua-aceite, un sistema de triple capa de agua-aceite-polvos, un ungüento, un gel o un aerosol. Además, tampoco existen limitaciones concretas en la forma de uso, y puede usarse de cualquier forma arbitraria, tal como una loción de belleza, una leche, una crema, una esencia, una jalea, un gel, un ungüento, un paquete para el cuidado facial, una mascarilla o una base de maquillaje.

Puesto que el promotor de la producción de bleomicina hidrolasa de la presente invención se aplica a la piel, este puede usarse en tratamientos de belleza para prevenir y/o mejorar la piel seca. No existen limitaciones concretas sobre la manera de usar o dosificar el promotor de la producción de bleomicina hidrolasa de la presente descripción cuando se emplea en dichos tratamientos de belleza, y aunque la manera de uso y la dosificación se determinan de modo adecuado según la forma del fármaco o el estado de arrugas de la piel que se va a tratar, generalmente una cantidad adecuada de 0,1 ml a 1 ml por cm² se frota directamente sobre la piel o esta cantidad adecuada se impregna sobre un trozo de gasa y después se aplica a la piel varias veces al día, por ejemplo, de 1 a 5 veces al día.

A continuación se proporciona una explicación más detallada de la presente descripción. Además, la presente invención se define por la reivindicación.

Ejemplos

Se emplearon los siguientes materiales en los presentes experimentos.

La calpaína-1 se obtuvo en EMD Biosciences, Inc., y la bleomicina hidrolasa se preparó a partir de la capa córnea de una epidermis humana según el documento que no es patente 5. La IL-4 y el IFN- γ humanos se adquirieron en Peprotech EC (Londres, Reino Unido). La IL-13 y la IL-17A/F humanas fueron fabricadas por R&D Systems Inc. (Minneapolis, Minn.). La 4-metilcumaril-7-amida de citrulina (Cit-MCA) se adquirió en Bachem Bioscience AG (Bubendorf, Suiza). Se emplearon productos químicos de calidad de reactivo para todas las demás sustancias usadas.

Cultivo de queratinocitos

Se cultivaron queratinocitos epidérmicos humanos normales derivados de epidermis neonatal (Kurabo Industries, Ltd., Osaka, Japón) en medio EpiLife (Cascade Biologics, Inc., Portland, Oreg.) que contenía calcio a baja concentración (0,03 mM) y suplemento de crecimiento HKGS (Cascade Biologics, Inc.). Todas las células se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% y se usaron tras 4 transferencias de subcultivo. Las células se recolectaron a una confluencia del 70%, a una confluencia del 100%, a los 2 días después de alcanzar la confluencia, y a los 2 días después de alcanzar la confluencia con calcio 2 mM.

Experimento 1

Se cree que la bleomicina hidrolasa actúa en la etapa final de la producción de NMF. En este caso, existe la posibilidad de que la expresión de esta enzima disminuya en la piel seca. En este experimento se realizó un estudio para determinar si la disminución en la expresión y/o la actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel está relacionada o no con la piel seca.

Se recolectaron muestras de la capa córnea de la piel mediante un pelado con cinta adhesiva que consiste en pegar cinta adhesiva transparente (CelloTape™, Nichiban Co., Ltd.) a la superficie de la piel de un brazo, seguido de despegar la cinta. La cinta con la capa córnea de piel adherida después se cortó en trozos, se sumergió en tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), NaCl 0,14 M, Tween-20 al 0,1%, 1 ml) y después se sometió a un tratamiento ultrasónico (20 s \times 4 rondas) para preparar extractos de la capa córnea. Estos extractos después se sometieron a un análisis de la transferencia Western. El anticuerpo antibleomicina hidrolasa (BH) usado se produjo según el método de Kamata, *et al.* (Journal of Biological Chemistry, 2009). De forma más específica, después de someter el extracto de capa córnea a una electroforesis se trasladó a Immobilon-P (Millipore Corp.), y después de lavar la película trasladada se dejó que reaccionase con anticuerpo anti-BH durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de retirar el anticuerpo mediante un lavado adicional, el extracto se hizo reaccionar con un anticuerpo secundario unido a HRP. Después de lavar, la banda de la proteína de BH iluminada con el kit de transferencia Western ECL Plus Western Blotting Kit (GE Healthcare Inc.) se coció sobre una película de rayos X y se calcularon los niveles de expresión basándose en el grado de sombreado de la banda. Estos resultados se muestran en la figuras 1 y 2.

En la figura 1, el espécimen 1 indica una muestra de capa córnea de la piel de una persona que cree que tiene piel seca, mientras que el espécimen 2 es una muestra de capa córnea de la piel de una estudiante sano que no cree que tenga la piel seca. Además, los especímenes T y A en la figura 2 proceden de sujetos que no tienen piel seca, el espécimen N procede de un sujeto que tiene la piel algo seca, y el espécimen M procede de un sujeto que tiene piel seca. Aunque el nivel de expresión de la bleomicina hidrolasa en el espécimen 1 es bajo, el nivel de expresión de esta enzima en el espécimen 2 es alto. Basándose en este resultado, se entiende que los especímenes 1 y 2 proceden de una piel seca y de una piel hidratada, respectivamente. Además, basándose en los resultados de la utilización del espécimen 1, en el caso de la piel seca parece que la cantidad de bleomicina hidrolasa disminuye en sitios más cercanos a la superficie epidérmica en donde se realiza la producción de NMF. En la figura 2, los

especímenes T y A indican transferencias Western de extractos obtenidos a partir de especímenes que no tienen la sensación de tener piel seca, mientras que los especímenes N y M indican transferencias Western de extractos obtenidos a partir de especímenes que tienen una fuerte sensación de tener piel seca.

Experimento 2

5 En este experimento se realizó un estudio de las diferencias individuales en la cantidad y la actividad de bleomicina hidrolasa en piel humana, junto con el examen de la relación entre estas cantidades y la actividad. Se prepararon extractos de la capa córnea procedentes de la piel del brazo de 40 mujeres estudiantes con una edad de 20 a 25 según el método descrito en el experimento 1. Se midió la cantidad y la actividad de bleomicina hidrolasa presente en los extractos según el método de Kamata, *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 284, número 19, 12829-12836, 8 de mayo, 2009). Se evaluaron los niveles de expresión mediante transferencia Western, mientras que la actividad enzimática se evaluó para la actividad aminopeptidasa de esta enzima midiendo la cantidad degradada de un sustrato fluorescente, Cit- β -NA. Los resultados se muestran en la figura 3, mientras que se muestra un diagrama de correlación en la figura 4. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 4, existe una correlación entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y su actividad.

15 A continuación se realizó un análisis estadístico con respecto a la bleomicina hidrolasa y diversos parámetros de la piel en los extractos de capa córnea mencionados anteriormente. En este experimento, los extractos de capa córnea de 40 sujetos se clasificaron en los siguientes dos tipos. Después de haber digitalizado las cantidades de bleomicina hidrolasa determinadas basándose en la transferencia Western con un densitómetro, se clasificaron los extractos en los que la cantidad de bleomicina hidrolasa es menor que 10, basándose en una unidad arbitraria de 1, y en los que la actividad enzimática es menor que 1,5 nmol/min/ml, como que presentan una cantidad baja de proteína de bleomicina hidrolasa y una baja actividad enzimática (BH baja), mientras que el resto de los extractos se clasificaron como que presentan una cantidad alta de proteína y una alta actividad enzimática (BH alta).

25 Los aminoácidos libres se midieron según el método de Kamata, *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 284, número 19, 12829-12836, 8 de mayo, 2009). De modo más específico, se dejó que el péptido de filagrina degradado con calpaína-1 reaccionase con cada extracto, seguido de la medición de la cantidad de aminoácidos libres mediante la cuantificación de los grupos amino empleando fluorescamina. Los resultados de la medición de los aminoácidos libres se muestran en la figura 5A. Las unidades del eje vertical de la figura 5A indican la cantidad total de aminoácidos libres (nmol) en 3 ml de muestra de medición.

30 Se evaluó la actividad bleomicina hidrolasa midiendo la cantidad de un sustrato fluorescente, Cit- β -Na, degradado por la aminopeptidasa de esta enzima, tal como ha sido descrito previamente. Los resultados de la medición de la actividad bleomicina hidrolasa se muestran en la figura 5B. Las unidades del eje vertical de la figura 5B indican la cantidad degradada de Cit- β -Na (nmol/min/ml).

35 Se midió la pérdida de agua transepidérmica (TEWL, por sus siglas en inglés) de la piel de las estudiantes mencionadas anteriormente usando un vapómetro (Delfin Technologies, Ltd., Finlandia) y se expresó como g/m²/h. Los resultados de la medición de la TEWL se muestran en la figura 5C.

Tal como se muestra en la figura 5C, se observa una diferencia significativa en el contenido en humedad de la capa córnea entre el grupo con actividad bleomicina hidrolasa baja (menor que 2,5 U) y el grupo con actividad alta. Además, se observaron pocos aminoácidos libres y la TEWL fue elevada en un grupo que presentaba baja cantidad de enzima y baja actividad (figuras 5A y 5C).

40 Aunque los datos no se muestran, se observó una diferencia significativa en las cantidades de NMF y ácido urocánico entre los grupos con baja cantidad (menos que 1000) y alta cantidad de aminoácidos libres, y se observó una diferencia significativa en la cantidad de ácido urocánico entre los grupos con NMF bajos (menor que 0,8) y NMF altos. Además se observaron diferencias significativas en NMF, ácido láctico y urea entre los grupos con TEWL baja (menor que 2,5) y TEWL alta. Cuando se piensa en que el ácido urocánico se produce a partir de la histidina contenida en grandes cantidades en la filagrina, puede entenderse que la bleomicina hidrolasa es importante en la degradación de la filagrina.

50 Basándose en los resultados de este experimento, en los casos en que la cantidad absoluta de bleomicina hidrolasa es baja, puede entenderse que tanto la cantidad de aminoácidos libres como la función de barrera disminuyen significativamente. Aunque los datos no se muestran, incluso en el caso de emplear un extracto de capa córnea procedente de mejilla, se confirma una relación proporcional entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y la función de barrera de la piel.

Experimento 3

55 En este experimento se realizó un estudio entre las estudiantes mencionadas anteriormente basándose en el diagrama de flujo mostrado en la figura 6, y se clasificó la piel de cada estudiante en una de cuatro categorías que consisten en piel hidratada, piel seca, piel grasa seca o piel grasa. Los resultados del estudio y las correlaciones con los resultados de los parámetros de la piel medidas en el experimento 2 mencionado anteriormente se muestran en la figura 7. Basándose en los datos mostrados en la figura 7, la actividad bleomicina hidrolasa fue significativamente

mayor en las estudiantes clasificadas como que tenían piel grasa seca.

Experimento 4

En este experimento se realizó un estudio para determinar la cantidad de bleomicina hidrolasa presente en la piel y la localización de la filagrina.

5 Tinción inmunohistoquímica

Se realizó la tinción inmunohistoquímica según el método de Kamata, *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 284, número 19, 12829-12836, 8 de mayo, 2009). Las muestras consistían secciones congeladas de piel humana con un espesor de 5 µm, y se empleó una IgG anti-BH de rata. De modo más específico, se obtuvieron especímenes de piel humana de pacientes que padecían dermatitis atópica que estaban siendo tratados en the Tokyo Medical University después de obtener su consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por the Institutional Review Board de Tokyo Medical University con relación a los aspectos éticos en seres humanos y por un subcomité especial de Shiseido Co., Ltd.

Se incubaron secciones de piel humana con dermatitis atópica (piel con lesiones y piel sin lesiones) y normal con IgG anti-BH de rata e IgG antifilagrina humana durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado con PBS y una posterior incubación con un anticuerpo secundario de unión fluorescente, Alexa Fluor 555 o 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.). Se empleó DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes Inc.) para visualizar los núcleos.

Los resultados para la inmunotinción de la piel normal se muestran en la figura 8, mientras que los resultados de comparar la piel de un individuo sano (piel normal) con la piel de un paciente con dermatitis atópica (erupciones atópicas) se muestran en la figura 9. Tal como se muestra en la figura 8, la bleomicina hidrolasa se expresó a niveles altos en la capa superior de la epidermis y mostró la misma localización que la filagrina. Por otra parte, en las localizaciones de las erupciones atópicas, la expresión de bleomicina hidrolasa y filagrina fue menor en comparación con la que aparece en la piel normal (figura 9).

PCR cuantitativa

Se midió el nivel de expresión de la bleomicina hidrolasa en queratinocitos mediante una PCR cuantitativa según el siguiente método usando un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se empleó como reactivo Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I. Se añadieron partes alícuotas de 0,6 µl de cada uno de los siguientes cebadores de bleomicina hidrolasa y 6,8 µl de agua a 10 µl de la mezcla maestra SYBR Green I, seguido de llevar a un volumen total de 20 µl y de realizar la PCR durante 45 ciclos que consistieron en 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 55 °C y 20 segundos a 72 °C. Los resultados obtenidos se corrigieron mediante una comparación con los resultados para un gen constitutivo, G3PDH.

Cebador directo: TGTGGTTTGGCTGTGATGTT (SEQ ID NO:1)

Cebador inverso: GCACCATCCTGATCATCCTT (SEQ ID NO:2)

Los resultados de la PCR cuantitativa mencionada anteriormente se muestran en la figura 10. Tal como se muestra en la figura 10, la bleomicina hidrolasa se expresó a niveles más altos en queratinocitos que habían alcanzado la confluencia, concretamente los queratinocitos diferenciados, que en queratinocitos a una confluencia del 80%, concretamente los queratinocitos no diferenciados. En otras palabras, según los resultados de este experimento, puede entenderse que esta enzima no se expresa en tanta cantidad en las células basales antes de la diferenciación. Estos resultados de la PCR cuantitativa apoyan los resultados de la tinción de tejidos mencionada anteriormente.

Experimento 5

1) Ensayo de luciferasa del promotor de BH usando queratinocitos epidérmicos humanos

Se añadió tampón de lisis (200 µl) a queratinocitos en la etapa de proliferación (aproximadamente al 80% de confluencia) o después de la diferenciación (después de alcanzar la confluencia, obtenida mediante una exposición al aire, la adición de calcio 2 mM y la continuación del cultivo durante 2 días más) para lisar las células. Se empleó el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega Co., Madison, Wis., EE. UU.) para la medición. Se trasladaron 20 µl de la muestra a un tubo prescrito y se midió usando Auto Lumat Plus (LB953, Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wilbad, Alemania). Basándose en los resultados mostrados en la figura 12, se determinó que una región que se extiende al menos 216 pb cadena abajo desde la secuencia codificadora de la bleomicina hidrolasa debe estar presente en la región reguladora de la transcripción mencionada anteriormente para que esta enzima se exprese.

2) Irradiación con UV de queratinocitos epidérmicos humanos normales ("Normal Human Epidermal Keratinocytes", NHEK)

Se recuperó el ARN mediante un método prescrito 3 horas, 24 horas y 48 horas después de irradiar con UVB a 30

mJ o 60 mJ (Torex F120S-E-30/DMR, 20 W, Toshiba Medical Supply Co., Ltd.), y se midieron los niveles de expresión de ARNm de la bleomicina hidrolasa y de la calpaína mediante una PCR cuantitativa. Como resultado de estas mediciones, se determinó que el nivel más alto del ARNm de bleomicina hidrolasa fue expresado por la muestra recuperada 48 horas después de irradiar a 30 mJ (figura 13).

5 3) Efecto de las citoquinas sobre la expresión de bleomicina

Se añadió IL-4 (concentración final: 0,1, 1,0 o 10 ng/ml), TNF α (concentración final: 0,1, 1,0 o 10 ng/ml) e IFN- γ (concentración final: 1,0, 10 o 100 ng/ml), respectivamente, a los queratinocitos cultivados en la etapa de proliferación y, después de incubar durante 24 horas, se recolectó el ARN empleando Isogen. Se midió la expresión del ARNm de bleomicina hidrolasa mediante una PCR cuantitativa. Estos resultados se muestran en la figura 14. Basándose en los resultados mostrados en la figura 14, puede entenderse que un tipo de citoquina, la interleuquina-4 (IL-4), infrarregula la expresión de la bleomicina hidrolasa.

Experimento 6: Caracterización del gen de BH humana

1) Clonación de la región flanqueante-5' de BH

La región flanqueante-5' se amplificó basándose en la secuencia de nucleótidos del gen de BH humano usando el kit Genome Walker Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, Calif.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante y empleando el cebador 1 específico de gen ("Gene-Specific Primer 1", GSP1): 5'-tccctcgagctctgtatcagagcagctaca-3' (SEQ ID NO:3) y el cebador 2 específico de gen (GSP-2): 5'-tgaacacgcgctccgagctgctcatggcg-3' (SEQ ID NO:4). Brevemente, se realizó una PCR primaria empleando GSP1 y un cebador adaptador ("Adapter Primer", AP) 1 según el protocolo de PCR de dos etapas recomendado por el fabricante (que consiste en 7 ciclos a 94 °C durante 25 segundos, y 72 °C durante 4 minutos, seguido de 32 ciclos a 94 °C durante 25 segundos y 67 °C durante 4 minutos y, por último, una extensión a 67 °C durante 4 minutos) usando ADN polimerasa Ex Taq (Takara Corp., Shiga, Japón) en presencia de dimetilsulfóxido al 5%. Después la mezcla de la PCR primaria se diluyó y se empleó como molde para una amplificación con PCR secundaria que usa GSP2 y AP2. La PCR secundaria se realizó de la misma manera que la PCR primaria, con la excepción de realizar inicialmente 5 ciclos en lugar de 7 ciclos y de realizar posteriormente 20 ciclos en lugar de 32 ciclos. Se produjeron cepas mutantes de deleciones 5' consecutivas de la región flanqueante-5' de BH mediante PCR usando los cebadores listados en la figura 15. Tras la amplificación, todos los productos de la PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega Co., Madison, Wis.) y después se sometieron a una secuenciación empleando el analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.).

Para construir un plásmido indicador pGL3-1216/+1 se realizó una PCR bajo las condiciones de 30 ciclos de desnaturalización inicial que consistió en 4 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C y, por último, una extensión durante 4 minutos a 72 °C, usando pGEM-T-1216/+1 como molde y una pareja de cebadores específicos de BH que contenían los sitios de restricción KpnI y MluI (5'-cgggtaccatcagagctccttagaa-3' (SEQ ID NO:5) y 5'-taaatacgcgttgccgcccacgctgccc-3' (SEQ ID NO:6)). Los productos de la PCR resultantes se digirieron con KpnI y MluI y se clonaron en el vector pGL3-Basic (Promega Co.). Además, el vector pGL3-Basic contiene el gen de luciferasa de luciérnaga. Todas las construcciones se prepararon usando el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen GmbH, Dusseldorf, Alemania).

2) Mutagénesis específica de sitio

Se realizó una mutagénesis en los sitios de unión a MZF-1, Sp-1 e IRF-1/2 empleando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Quick Change (Stratagene Corp., La Jolla, Calif.). Para crear una mutación de deleción en Sp-1 se emplearon cebadores que consistían en 5'-ggaccccgcttcagcctcccgcc-3' (SEQ ID NO:7) (cebador directo del sitio SP-1 mutante) y 5'-ggcggggaggctgaaacggggtcc-3' (SEQ ID NO:8) (cebador inverso del sitio Sp-1 mutante). Con respecto a la mutación de MZF-1, se emplearon cebadores que consistían en 5'-gactcagcaacgcggtttgtccctccgc-3' (SEQ ID NO:9) (cebador directo del sitio MZF-1 mutante) y 5'-gaggaggacaacacggctgctgagtc-3' (SEQ ID NO:10) (cebador inverso del sitio MZF-1 mutante). Con respecto al IRF-1/2 mutante, se emplearon cebadores que consistían en 5'-gccgagcctccggcgctcc-3' (SEQ ID NO:11) (cebador directo del sitio IRF-1/2 mutante) y 5'-ggagcggcggaggctcggcggc-3' (SEQ ID NO:12) (cebador inverso del sitio IRF-1/2 mutante).

3) Transfección y medición de la actividad del promotor

Se cultivaron queratinocitos en una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguido de una transfección con partes alícuotas de 1 μ g de cada construcción usando el reactivo de transfección FuGene HD (Roche Diagnostics AG, Basilea, Suiza). Para corregir para la eficacia de transfección, todas las células se transfectaron simultáneamente con el vector pGL4.74 [hRluc-TK] (Promega Co.) que contenía el gen de luciferasa del pensamiento de mar (*Renilla*) bajo el control del promotor de HSV-TK. A menos que se indique específicamente lo contrario, las células se recogieron 24 horas después de la transfección y se lisaron usando 250 μ l de tampón de lisis pasivo (Promega Co.) por pocillo. Se analizó la actividad luciferasa usando un sistema de ensayo indicador de luciferasa dual (Promega Co.) y un luminómetro Auto Lumat Plus Luminoeter (Berthold Technologies GmbH, Bad Wilbad, Alemania). Se estandarizó la actividad de la luciferasa de luciérnaga para la actividad de la luciferasa del pensamiento de mar. Se realizaron independientemente tres transfecciones para cada

construcción, y los resultados se expresan como su valor promedio.

4) Análisis de RT-PCR a tiempo real cuantitativa

Se analizaron los niveles de transcripción de BH y factores relacionados mediante una RT-PCR a tiempo real cuantitativa. Se extrajo el ARN total de células cultivadas usando Isogen (Nippon Gene Co., Ltd., Tokio, Japón) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se realizó la transcripción inversa del ADNc usando SuperScript™ II (Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.). Se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con el sistema ciclador Light Cycler Raid usando la mezcla maestra Light Cycler 480 SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En la figura 16 se muestra la información relacionada con los cebadores usados. Se empleó la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo. Se confirmó la especificidad de los fragmentos amplificados mediante un análisis cuantitativo de las curvas de fusión por medio del software analítico de Light Cycler. Se estandarizaron las cantidades de ARNm con respecto al ARNm de GAPDH y, por último, se indican como una proporción con respecto al ARNm de un control no tratado.

5) Supresión basada en ARNiP de IRF-1 e IRF-2

Se transfectaron queratinocitos cultivados usando 40 nM de siIRF-1, siIRF-2 y siControl A (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Calif.), junto con Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Después de cultivar las células durante 24 horas en un medio sin antibióticos se extrajo el ARN total y se analizó mediante una RT-PCR a tiempo real de una manera previamente descrita.

6) Análisis de desplazamiento de la movilidad electroforética ("Electrophoretic Mobility Shift Analysis", EMSA)

Se prepararon sondas oligonucleotídicas bicatenarias asociando un oligonucleótido biotinilado monocatenario y un oligonucleótido monocatenario no marcado (figura 17). Se realizó la extracción nuclear y el EMSA usando un kit de extracción nuclear y un kit de desplazamiento en gel de EMSA (Panomics, Inc., Santa Clara, Calif.). Los extractos nucleares (4 µg) se incubaron con 1× tampón de unión, 1 µg de Polyd (1-C) y sondas biotiniladas (50 pmol) que se corresponden con los sitios de unión de MZF-1, Sp-1, IRF-1/2 y GATA-1 durante 30 minutos a 15 °C. Para realizar un ensayo competitivo, se añadió una cantidad en exceso de dos veces de la sonda no marcada a la reacción de unión antes de la adición de la sonda biotinilada. Estas mezclas incubadas se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, junto 5× tampón TBE, y después se trasladaron a una membrana de nailon Biodyne B (Pall Corp., Port Washington, N.Y.). Las bandas se visualizaron usando el reactivo de detección de quimioluminiscencia proporcionado por el kit de desplazamiento en gel de EMSA.

7) Resultados

Aislamiento y caracterización del promotor del gen de BH humana

Se identificaron un gran número de supuestos sitios de unión al factor de transcripción en la región flanqueante-5' de la BH humana mediante una selección con el programa Genome Net Motif (figura 18A). Puesto que están presentes ciertas secuencias que casi coinciden con las secuencias consenso reconocidas por MZF-1, Sp-1, IRF-1/2 y GATA-1/2 en la región -216/+1 cercana al sitio de inicio de la transcripción en particular, se ha sugerido que estos factores de transcripción están implicados en la regulación de la actividad del promotor de BH. Se realizó un análisis de delección para determinar con más precisión la región del promotor de BH (figura 19B). Se detectó el nivel más alto de actividad luciferasa en queratinocitos diferenciados transfectados con pGL3-816. Sin embargo, la actividad luciferasa relativa de los plásmidos de delección permaneció alta hasta que la delección avanzó hasta pGL3-216. En esta construcción (indicada como pGL3-444), un plásmido que contenía el fragmento -444/+1 mostró una actividad significativamente más baja en queratinocitos cultivados, sugiriendo con ello la presencia de una actividad supresora cadena arriba en la región -616/-444. Puesto que estos resultados verifican que la región -216/-1 contiene la secuencia de promotor mínima para la transcripción del gen de BH, su secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 18C. Puesto que esta secuencia no contiene una caja TATA o CCAAT, se ha sugerido que este gen tiene propiedades constitutivas. Por otra parte, están presentes varios sitios de unión a un factor de transcripción, tales como MZF-1, Sp-1, IRF-1/2 y GATA-1/2, en esta región central del promotor.

Identificación del elemento en cis latente implicado en la regulación del gen de BH

Para determinar el elemento en cis latente de la secuencia mínima de promotor implicado en la regulación de la transcripción de la expresión del gen de BH, se construyó una nueva serie de cepas de mutantes de delección que se dirigían a cada elemento en cis. La actividad del promotor fue considerablemente infrarregulada en el caso de tener delecionados los sitios de unión a MZF-1, Sp-1 e IPF-1/2 (figura 19A).

Además se realizó una investigación para determinar si estos factores de transcripción son realmente capaces o no de unirse a cada supuesto sitio de unión. Así se realizó un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) usando extractos nucleares procedentes de queratinocitos cultivados y sondas oligonucleotídicas bicatenarias biotiniladas que contenían el sitio de unión a MZF-1, Sp-1, GATA-1 o IRF-1/2. Tal como se muestra en la figura 19B, aunque Sp-1, MZF-1 e IRF-1/2 se unen a los sitios diana correspondientes al promotor de BH, GATA-

1/2 no se unió. Estos resultados indican que estos sitios de unión de la región del promotor de -216 pb a -105 pb son fundamentales para el elemento en cis para la transcripción de BH.

Regulación mediada por citoquinas de la expresión del gen de BH

5 Puesto que la BH es una enzima productora de NMF, esta tiene la posibilidad de estar implicada en la patofisiología de la AD. Por consiguiente se realizó una investigación de los efectos de citoquinas Th1, Th2 y Th17 sobre la expresión del gen de BH. La figura 20A indica la infrarregulación dependiente de la dosis de la expresión del ARNm de BH por una citoquina Th1, IFN- γ , en queratinocitos en proliferación. Por otra parte, las citoquinas Th2 y Th17 no mostraron ningún efecto significativo sobre la expresión de BH. Se obtuvieron resultados similares con queratinocitos diferenciados (los datos no se muestran). Para aclarar el papel del IFN- γ en la regulación de la expresión del gen de BH, se realizó un ensayo de promotor para identificar los elementos de respuesta a citoquinas. Tal como se muestra en la figura 20B, el IFN- γ infrarregula la actividad del promotor de BH en queratinocitos cultivados transfectados con pGL3-BH-616 que contiene sitios de unión a IRF-1/2 entre -131 y -120. El IFN- γ ya no suprime la actividad del promotor después de delecionar esta secuencia (figura 20B). Además, para determinar si IRF-1/2 es o no es un mediador fundamental de la infrarregulación inducida por IFN- γ de la BH, se suprimió la expresión de los genes de IRF-1 e IRF-2 usando ARN de interferencia pequeño (ARNip). La actividad del IFN- γ fue significativamente inhibida en queratinocitos cultivados transfectados con ARNip de IRF-1 o IRF-2 (40 nM) (figura 20C). Estos resultados sugieren con fuerza que la secuencia de unión a IRF-1/2 es fundamental para la infrarregulación inducida por IFN- γ de la expresión del gen de BH.

Expresión de BH y factores relacionados en queratinocitos cultivados

20 Para investigar el mecanismo de regulación de la transcripción en la epidermis se analizó la expresión de BH, calpaína-1 y supuestos factores de transcripción en células en proliferación y diferenciadas mediante una PCR a tiempo real. Tal como se muestra en la figura 21A, el ARNm de BH estaba sobreexpresado en queratinocitos diferenciados, tales como los obtenidos dos días después de la confluencia (en 3,6 veces) o los cultivados a una alta concentración de calcio (en 8,6 veces), en comparación con los queratinocitos en proliferación. Estos resultados coinciden con los datos del ensayo de promotor (figura 18B). Se obtuvieron resultados similares con respecto a la calpaína-1 (sobreexpresada en aproximadamente 2,5 veces). Además se investigaron los patrones de expresión de diversos factores de transcripción, tales como MZF-1, Sp-1, GATA-1, IRF-1 e IRF-2, en queratinocitos cultivados. Tal como se muestra en la figura 21B, estos factores de transcripción se encontraban sobreexpresados en queratinocitos diferenciados en paralelo a la expresión de BH. Sin embargo, la expresión del ARNm de GATA-1 fue significativamente menor en comparación con otros factores (menos de 1/32). Por tanto, no se considera que GATA-1 desempeñe un papel importante en los queratinocitos. Por consiguiente, se ha sugerido que la BH se sintetiza de un modo dependiente de la diferenciación que está mediado por MZF-1 y Sp-1. El hecho de que IRF-1 e IRF-2 también aparecieran sobreexpresados como resultado de ser estimulados por la diferenciación indica que la expresión de BH es extremadamente sensible al IFN- γ .

Efectos de las citoquinas Th1 y Th2 sobre la expresión de supuestos factores de transcripción

35 Se realizó una investigación sobre la regulación dependiente de citoquinas de estos factores de transcripción. La figura 22A indica que el IFN- γ muestra una potente sobreexpresación de la expresión de ARNm de IRF-1 dependiente de la dosis. De modo similar, la expresión de IRF-2 también fue sobreexpresada en presencia de IFN- γ . Por contraste, la expresión de IRF-1 e IRF-2 fue significativamente amplificada solo en presencia de IL-4 a 100 ng/ml (figura 22B). Resulta interesante advertir que MZF-1 y Sp-1 fueron infrarregulados con más eficacia en presencia de IL-4 a 10 ng/ml (figura 22C). Estos resultados sugieren que la expresión de BH es regulada por citoquinas Th1 y citoquinas Th2 directa e indirectamente.

Infrarregulación de la BH en piel con dermatitis atópica

45 Aunque las mutaciones de pérdida de función de FLG están relacionadas con el mecanismo patogénico de la AD, otros defectos genéticos, así como trastornos de la vía de degradación, también pueden estar relacionados con la patología de la AD. En consecuencia se realizó la siguiente investigación para la localización de la BH y la filagrina, junto con la actividad de BH en piel con lesiones y en piel sin lesiones de un paciente con AD. En la epidermis normal, una doble tinción con un anticuerpo anti-BH y un anticuerpo antifilagrina indica la localización simultánea de la BH y la filagrina en la epidermis superior, y, en particular, en la capa granular, tal como se ha sido indicado previamente (figura 23A). A mayores aumentos, aunque se observó que la localización de la BH se trasladaba de la capa granular a la capa córnea, se demostró que la filagrina claramente se limita a las células granulosas. Por contraste, la expresión de BH disminuye notablemente en la piel con lesiones y en la piel sin lesiones de los pacientes con AD (n = 7) examinados en este estudio. En todos estos pacientes, aunque siempre se detectó una tinción significativa, la tinción de la filagrina fue comparativamente débil (figura 23A). Además de la inmunohistoquímica, se midió la actividad de BH en extractos de queratinocitos adquiridos de las muestras obtenidas con cinta adhesiva de 18 pacientes con AD y 30 voluntarios sanos. Los extractos obtenidos de la piel con lesiones y de la piel sin lesiones de los pacientes con AD mostraron una actividad de BH sustancialmente menor, en comparación con los de los voluntarios sanos (disminuyendo en 27,1% y 8,8%, respectivamente) (figura 23B). Estos resultados demuestran que la BH se localiza junto a la filagrina, y que su actividad disminuye notablemente en la piel

de pacientes que padecen AD.

Análisis

En este estudio se examinó el mecanismo regulador de la expresión del gen de BH mediante la clonación de la región del promotor y la caracterización de su función. En el análisis del promotor se identificó una región importante para la actividad del promotor de BH 16 pb cadena arriba (figura 18B). En esta región, los presuntos sitios de unión de MZF-1 y Sp-1 produjeron unos efectos significativos sobre la actividad del promotor de BH (figuras 18C y 19A). Resulta interesante advertir que también se ha indicado que Sp-1 y MZF-1 están implicadas, como factores de transcripción, en la regulación de PAD1, una importante enzima para el inicio de la degradación de la filagrina. La Sp-1 es un miembro típico de la familia similar a Sp/Kruppel de proteínas de dedos de cinc que actúan como factores de transcripción en células de mamífero. Se considera que está implicada en casi todos los aspectos de la función celular, incluyendo la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la transformación neoplásica. En la epidermis humana, la Sp-1 es un importante factor regulador de genes que participan en la diferenciación epidérmica, incluyendo los de la involucrina, loricrina, transglutaminasa y PAD 1, 2 y 3. La MZF-1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia Kruppel de proteínas de dedos de cinc y se expresa en células hematopoyéticas pluripotenciales diferenciadas y en células progenitoras de la médula ósea. Sin embargo, no se ha indicado la función de MZF-1 en la regulación de la transcripción en la epidermis de mamífero. Se ha descubierto que MZF-1, Sp-1 y BH están simultáneamente sobre reguladas en queratinocitos diferenciados, en comparación con queratinocitos en proliferación (figura 21B), lo cual demuestra el papel de la BH en la diferenciación, en lugar de un papel constitutivo. Los resultados de los inventores claramente indican que estos factores de transcripción actúan como factores de activación para la regulación básica de la transcripción de BH en queratinocitos que están atravesando la diferenciación terminal.

Por otra parte, una investigación de los elementos de acción en cis definió con más precisión los sitios de unión a IRF-1/2 en esta región. La unión directa de IRF a la región del promotor de BH se confirmó usando EMSA (figura 19B). La mutagénesis específica de sitio de esta secuencia de unión produjo una disminución significativa en la actividad del promotor de BH (figura 19A). Por consiguiente, es muy probable que también los factores de transcripción IRF-1/2 sean necesarios para una actividad mínima del promotor del gen de BH bajo condiciones básicas. La familia de IRF consiste en un grupo de factores de transcripción, y en la actualidad se han identificado nueve miembros de la familia de IRF (IRF-1 a IRF-9) en diversos tipos de células y tejidos. Estas moléculas de IRF desempeñan un papel en la defensa antiviral, la regulación/respuesta inmunológica y la regulación del crecimiento celular cuando son estimuladas por IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Se ha demostrado que IRF-1 y IRF-2 actúan como agonistas y antagonistas implicados en la regulación de numerosos genes inducidos por IFN- γ . De manera interesante, IFN- γ suprimió notablemente la expresión de ARNm de BH (figuras 20A y 20B). En análisis de inactivación y de mutagénesis específica de sitio, se confirmó que los sitios de unión a IRF-1/2 estaban implicados en la supresión mediada por IFN- γ de la expresión de BH (figuras 20B y 20C). Estos resultados claramente indican que IRF-1/2 son mediadores de la infrarregulación mediada por IFN- γ del gen de BH en queratinocitos humanos. Por otra parte, las citoquinas Th2 IL-4 e IL-13 no muestran ninguna acción directa durante 24 horas de incubación (figura 20A). Sin embargo, estas citoquinas Th2 suprimen significativamente la expresión de moléculas activadoras, MZF-1 y Sp-1. Por consiguiente, resulta razonable pensar que las citoquinas Th2 regulan negativamente la expresión de BH.

Además, se demostró que BH también se encontraba notablemente infrarregulada en piel con AD con lesiones y sin lesiones (figuras 23A y 23B). Aunque las mutaciones de la filagrina son un factor de riesgo principal para las enfermedades relacionadas con una alteración en la barrera, tales como AD, en un análisis de dichas mutaciones, estas son responsables de menos del 50% de las apariciones de dichas enfermedades en Irlanda y solo son responsables de no más del 20% de su aparición en Japón. Así, se establece la hipótesis de que no solo los trastornos de síntesis de filagrina, sino también la alteración de la degradación de la filagrina están implicados en la alteración de la función de barrera de la piel. Es evidente que una cantidad menor de NMF produce piel seca y provoca un aumento en la alteración de la barrera. Además, se sabe que la AD es una enfermedad polarizada por Th2. Sin embargo, informes recientes han sugerido que las citoquinas Th1 también desempeñan un papel en la AD. Por ejemplo, una "AD intrínseca" se caracteriza desde el punto de vista inmunológico por una baja expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 y una alta expresión de IFN- γ . Además, se produce un desplazamiento de Th1 a Th2 durante la transformación desde la fase aguda a la fase crónica en piel con AD. Los resultados de los inventores indican la posibilidad de que IFN- γ desempeñe un papel más importante que el que previamente se pensaba.

En conclusión, los resultados de los inventores indican que la transcripción de BH en la epidermis humana es regulada mediante un modo dual. Una de las vías está bajo el control de la diferenciación terminal de queratinocitos, mientras que la otra vía depende de citoquinas Th1 y Th2. Puesto que estas vías están interrelacionadas, se cree que el equilibrio entre ellas se desplaza con facilidad hacia la infrarregulación de la expresión de BH. Una disminución en la BH provoca una falta de NMF y la piel se seca o la función de barrera de la piel se altera como resultado de ello. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre la regulación de la BH y el mecanismo de aparición de la AD.

Experimento 7: Selección de agentes farmacéuticos y medicamentos a base de plantas que muestran efectos estimulantes de la producción de bleomicina hidrolasa

5 Se cultivaron queratinocitos humanos derivados de prepucio normal (Cascade Biologics Inc., Portland, Md.) durante 24 horas a temperatura ambiente en presencia de cada uno de los extractos de medicamentos a base de plantas o agentes farmacéuticos (de 5 g/ml a 50 µg/ml) mostrados en la figura 24 en medio de crecimiento de queratinocitos que consistía en medio MCDB suplementado con factor de crecimiento epidérmico (0,1 ng/ml), insulina (10 µg/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml), extracto de pituitaria bovina (al 0,4%), gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina B (50 ng/ml). Se empleó 1,3-butilenglicol al 0,1% como control.

RT-PCR

10 El ARN total (500 ng) aislado a partir de queratinocitos humanos cultivados de la manera descrita anteriormente se sometió a transcripción inversa usando hexámeros aleatorios y ARNasa H-transcriptasa Superscript II (Gibco-BRL Corp., Gaithersburg, Md.), seguido de una amplificación con PCR empleando ADN polimerasa Taq (Takara Corp., Kioto, Japón) y los siguientes cebadores. Se realizaron 40 ciclos de amplificación que consistieron en 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C.

15 Según los resultados mostrados en la figura 24, puede entenderse que ciertos extractos, tales como extracto de *Rosa roxburghii* (10 µg/ml), extracto de raíz de angélica (10 µg/ml), extracto de corteza de alcornoque (10 µg/ml), extracto de *Lamium album* (10 µg/ml) y extracto de romero (10 µg/ml), así como GABA de bencenosulfonilo (50 µg/ml) y eritritol (50 µg/ml) aumentan significativamente la expresión de la bleomicina hidrolasa en comparación con el control. Así, puede entenderse que cada uno de estos extractos estimulan la expresión de la bleomicina hidrolasa. A continuación se indican los cebadores usados en la PCR.

Cebador directo: 5'-TGTGGTTGGCTGTGATGTT-3' (SEQ ID NO:13)

Cebador inverso: 5'-GCACCATCCTGATCATCCTT-3' (SEQ ID NO:14)

Además, la GAPDH fue amplificada mediante PCR para emplearla como control interno, y los cebadores empleados en este caso se indican a continuación.

25 Cebador directo: GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCG (SEQ ID NO:15)

Cebador inverso: TATTGGAACATGTAAACCATGTAGTTGAGG (SEQ ID NO:16)

Listado de secuencias

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

<120> Agente que estimula la producción de Bleomicina Hidrolasa

30 <130> Z787-PCT

<150> JP2011-057126

<151> 2011.03.15

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

35 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Cebador directo de G3PDH

<400> 1

tgtggttgg ctgtagtgtt 20

<210> 2

<211> 20

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso de G3PDH

<400> 2
 gcaccatcct gatcatcct 20

5 <210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador 1 específico del gen BH

10 <400> 3
 tccctcgagt ctgtatcaga gcagctaca 29

<210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> cebador 2 específico del gen BH

<400> 4
 tgaacacgcg tccgagctgc tcatggcg 28

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

<220>
 <223> Cebador específico de BH que contiene Kpn 1

25 <400> 5
 ccgggtacca tcagagtcc ttagaa 26

<210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador específico de BH que contiene Mlu 1

<400> 6
 taaatacgcg ttggcgccca cgctgcc 28

35 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> cebador directo del sitio Sp-1

<400> 7
 ggaccccggt tcagcctccc cgcc 24

<210> 8
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador inverso del sitio Sp-1

<400> 8
 50 ggcggggagg ctgaaacggg gtcc 24

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> cebador directo del sitio MZF-1

<400> 9
 gactcagcaa cgcggtttg tcctccgc 29

10 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador inverso del sitio MZF-1

15 <400> 10
 gcggaggac aaaaccgct tgctgagtca 30

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador directo del sitio IRF-1/2

<400> 11
 gccgccgagc ctccggcgt cc 22

25 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador inverso del sitio IRF-1/2

30 <400> 12
 ggagcgcgg aggctcggc gc 22

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

35 <220>
 <223> Cebador directo para BH

<400> 13
 tgtggttg ctgtgatgtt 20

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

45 <220>
 <223> Cebador inverso para BH

<400> 14
 gcaccatcct gatcatcct 20

50 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para GAPDH

<400> 15

5 ggtgaaggtc ggagtcaacg gatttggctg 30

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Cebador inverso para GAPDH

<400> 16

tattggaaca tgtaaaccat gtagtgagg 30

REIVINDICACIONES

1.- Una sustancia de promotor de la producción de bleomicina hidrolasa para uso en un método para mejorar o prevenir la piel seca provocada por una dermatitis atópica debida a la reducción de la expresión de bleomicina hidrolasa en la piel, en la que la sustancia es un extracto de *Rosa roxburghii*.

5

Fig.1

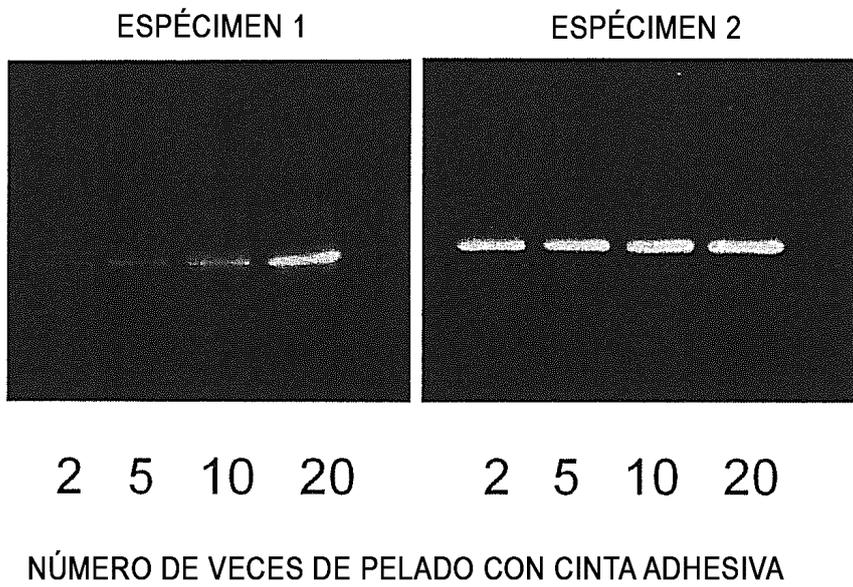
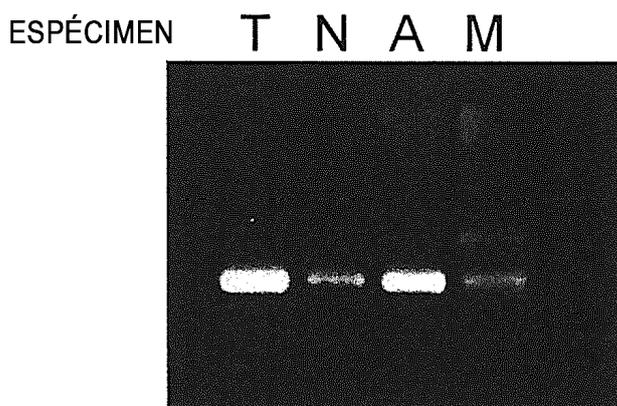


Fig.2



T, A: SUJETOS SIN PIEL SECA
N: SUJETOS CON PIEL ALGO SECA
M: SUJETOS CON PIEL SECA

Fig.3

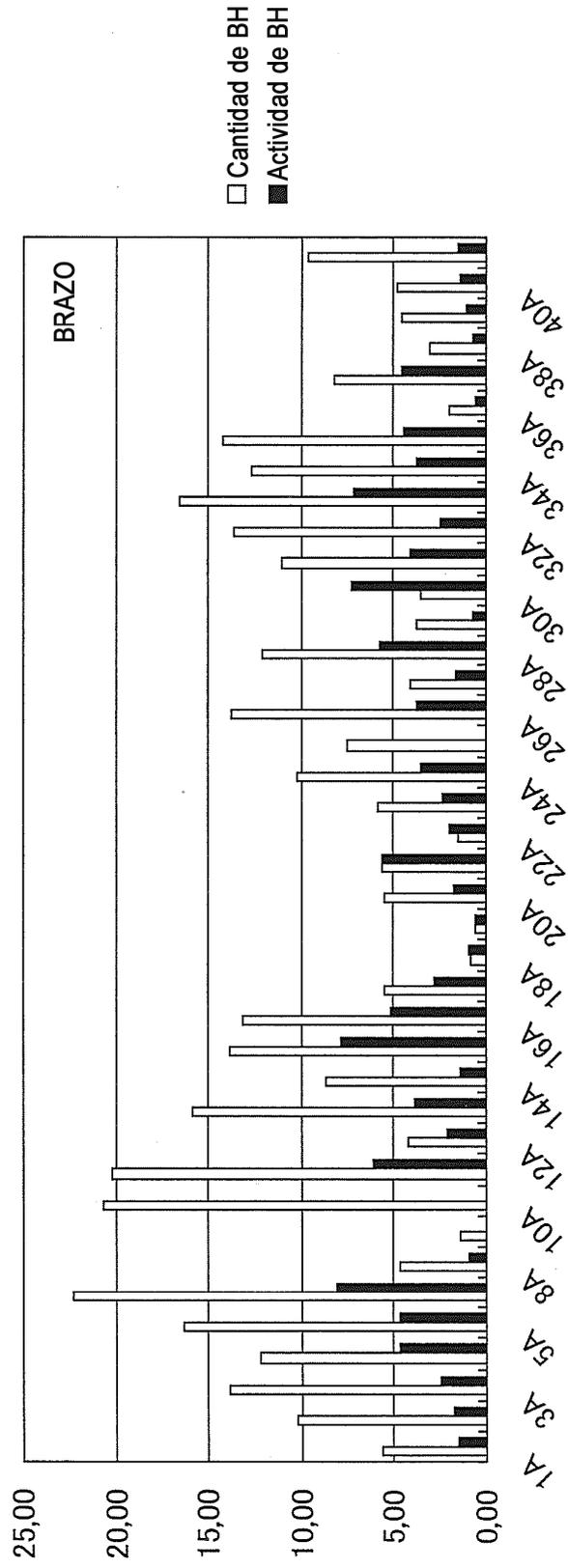


Fig.5

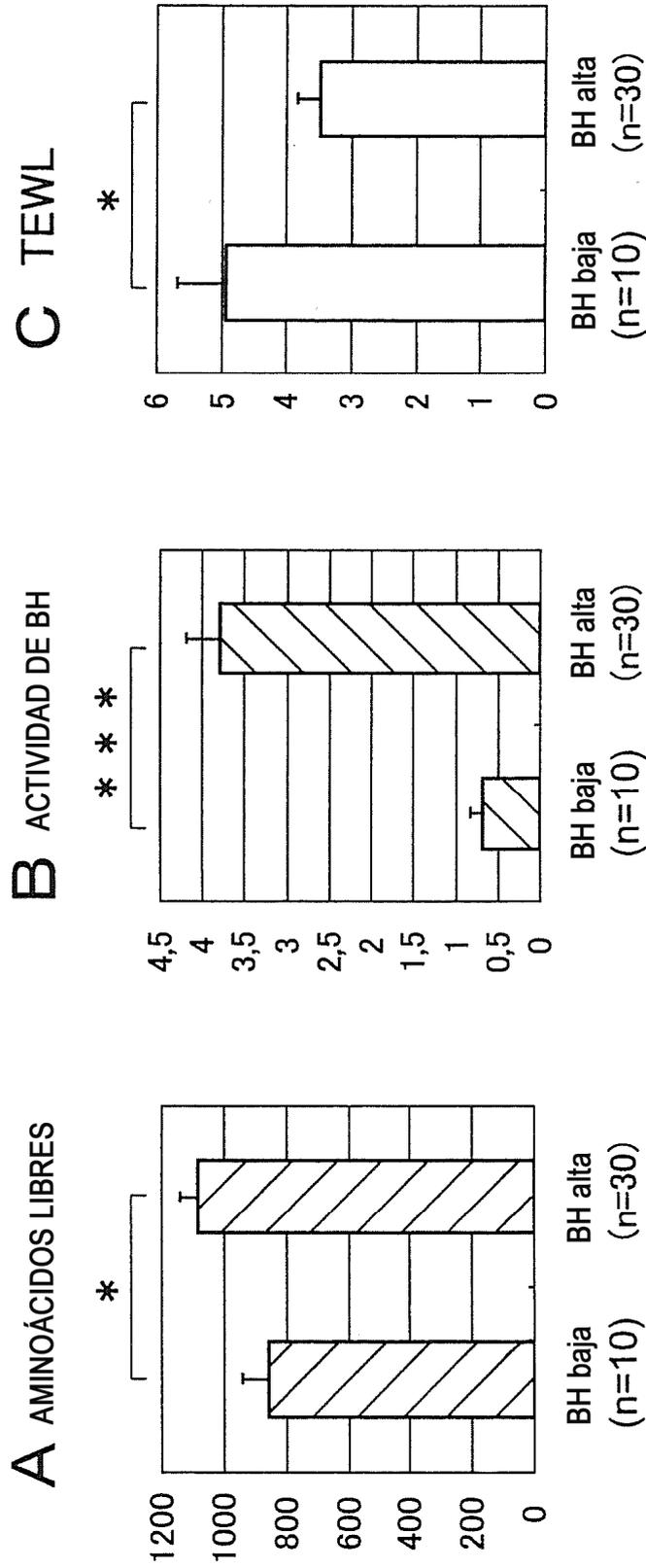


Fig.6

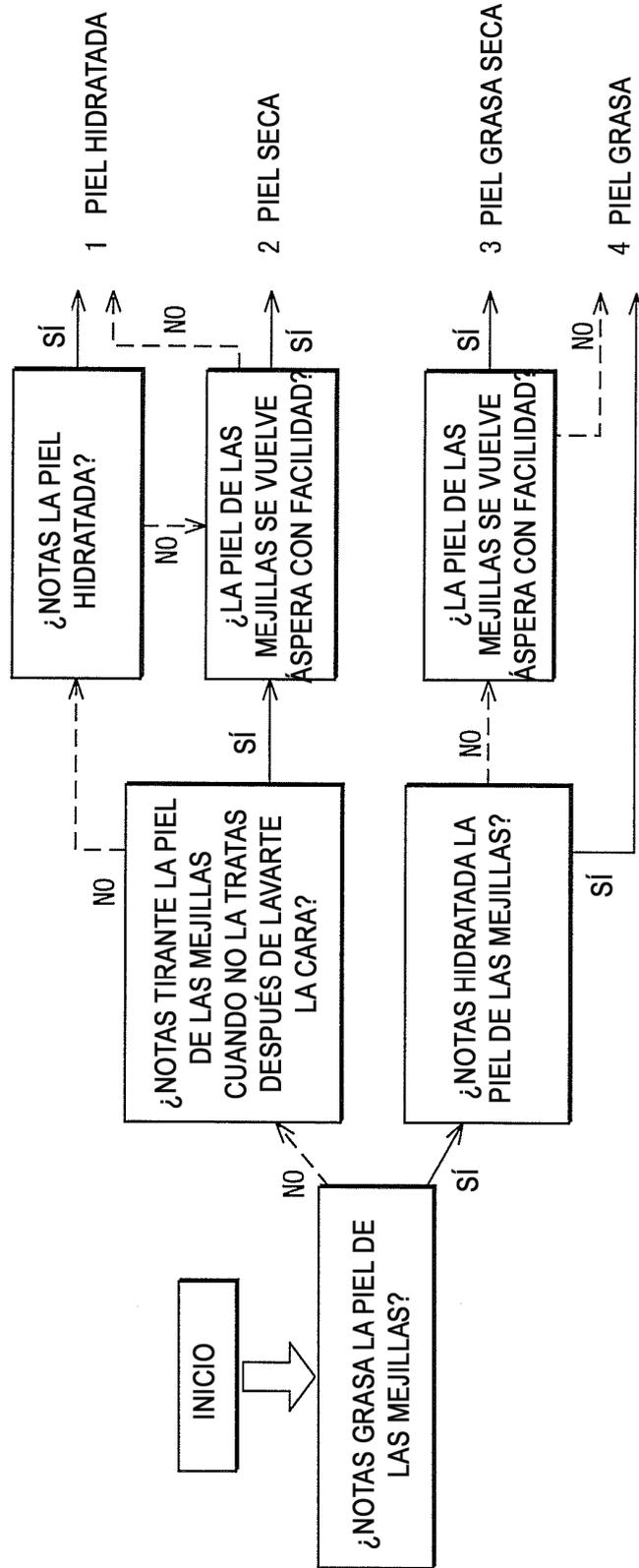


Fig.7

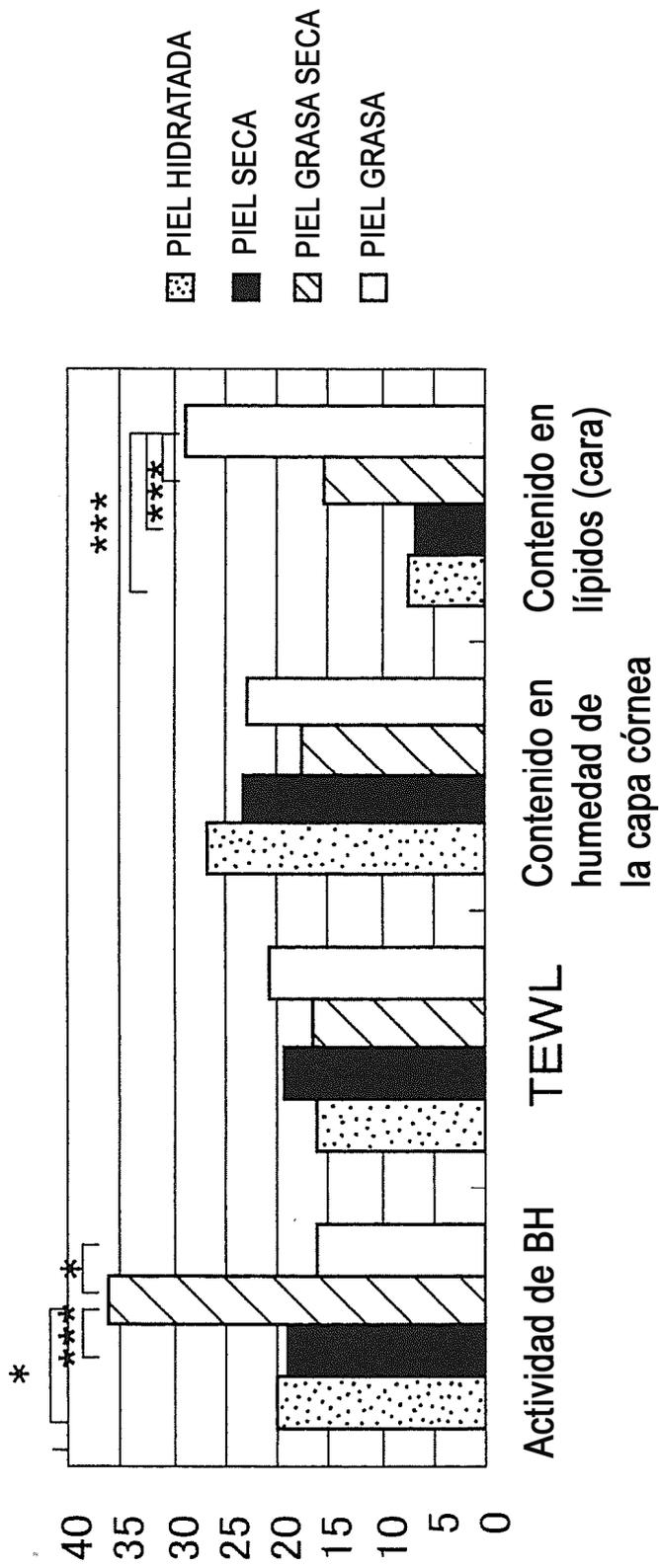


Fig.8

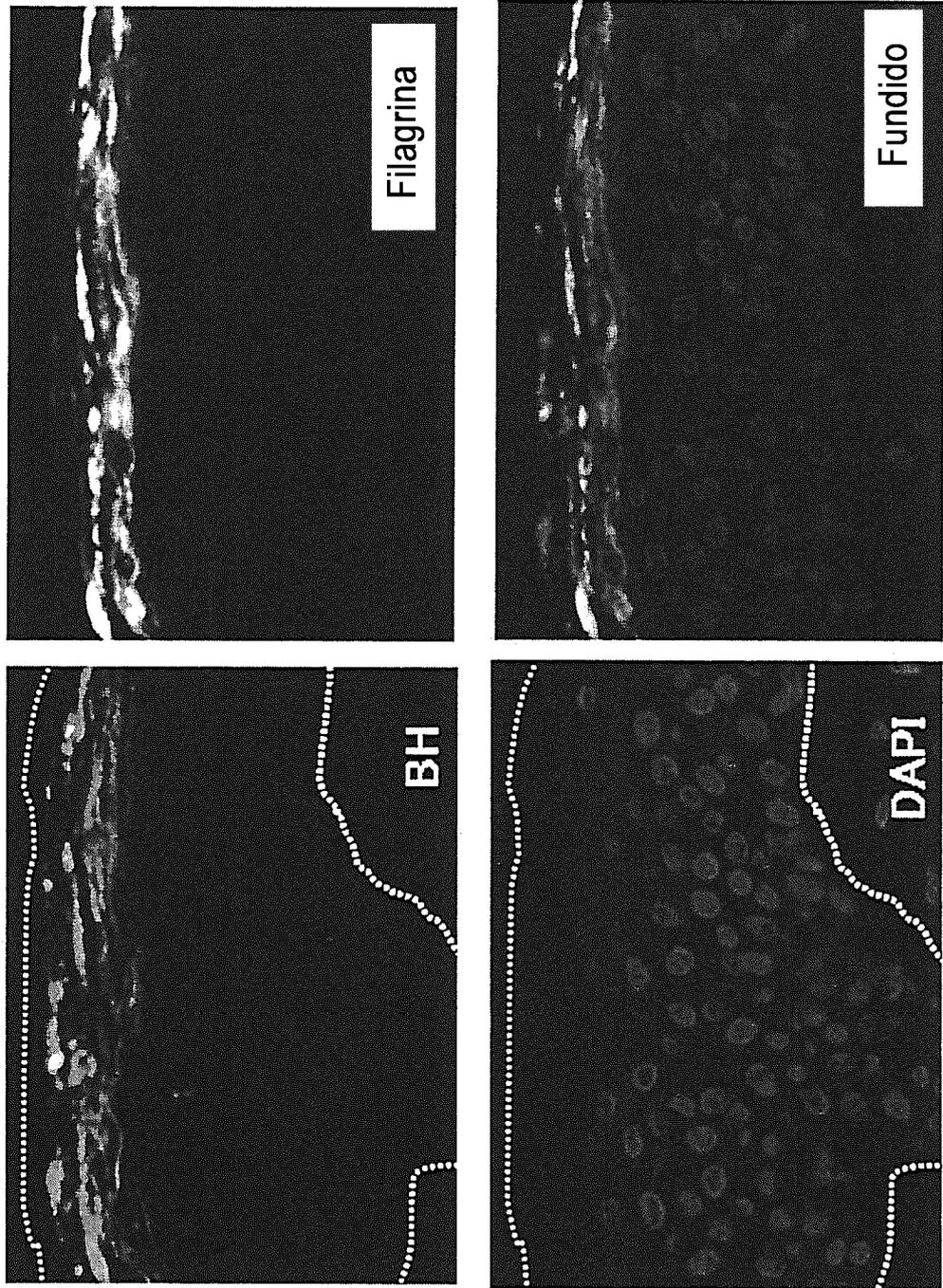


Fig.9

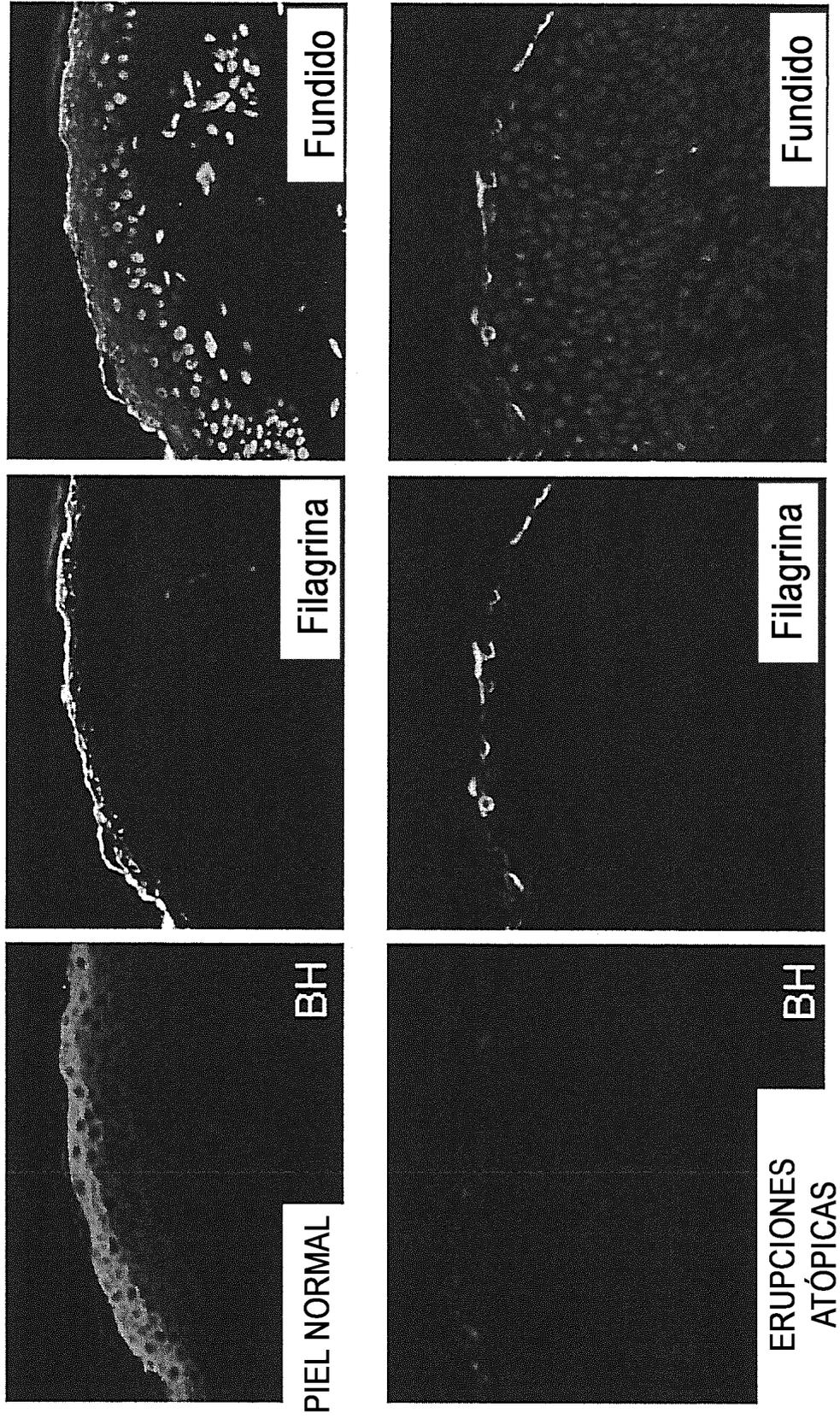


Fig. 10

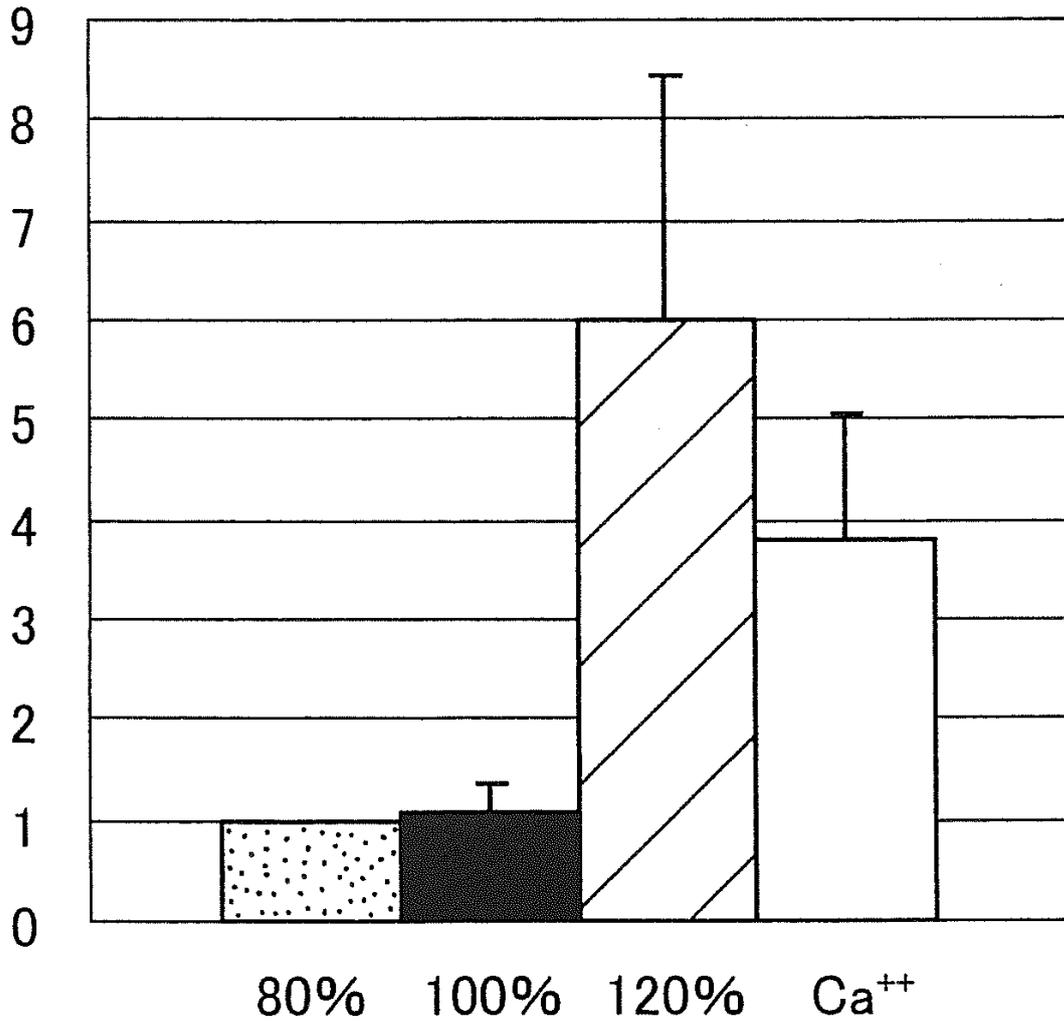


Fig.11

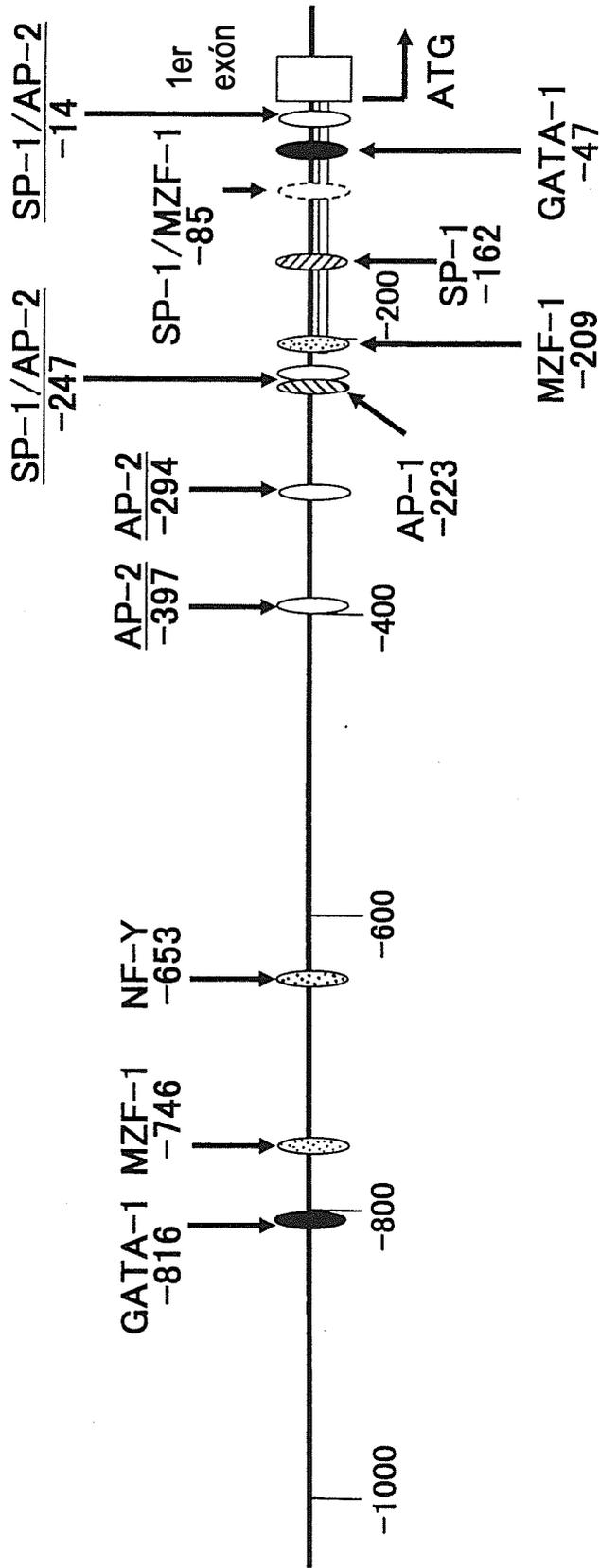
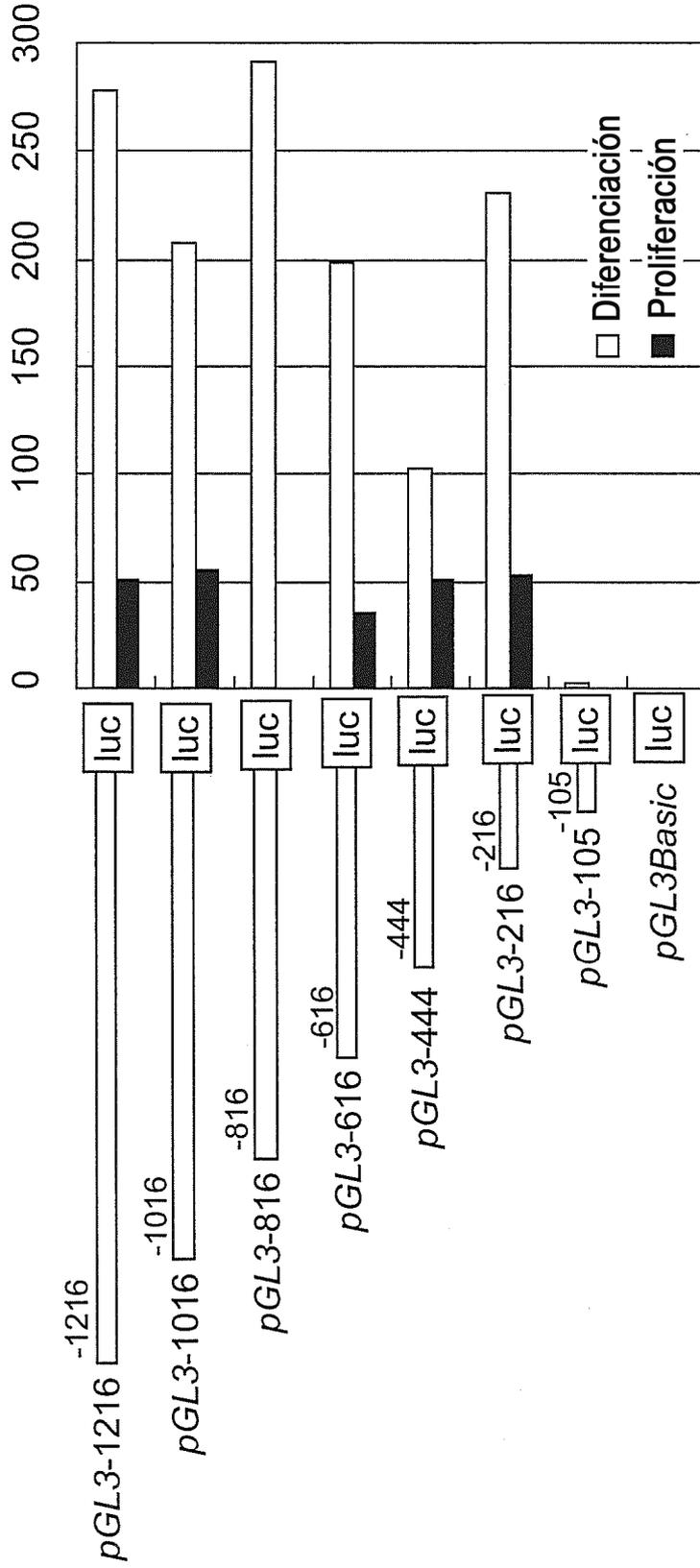


Fig.12



Ensayo de BH de luciferasa: VALORES CORREGIDOS

Fig.13

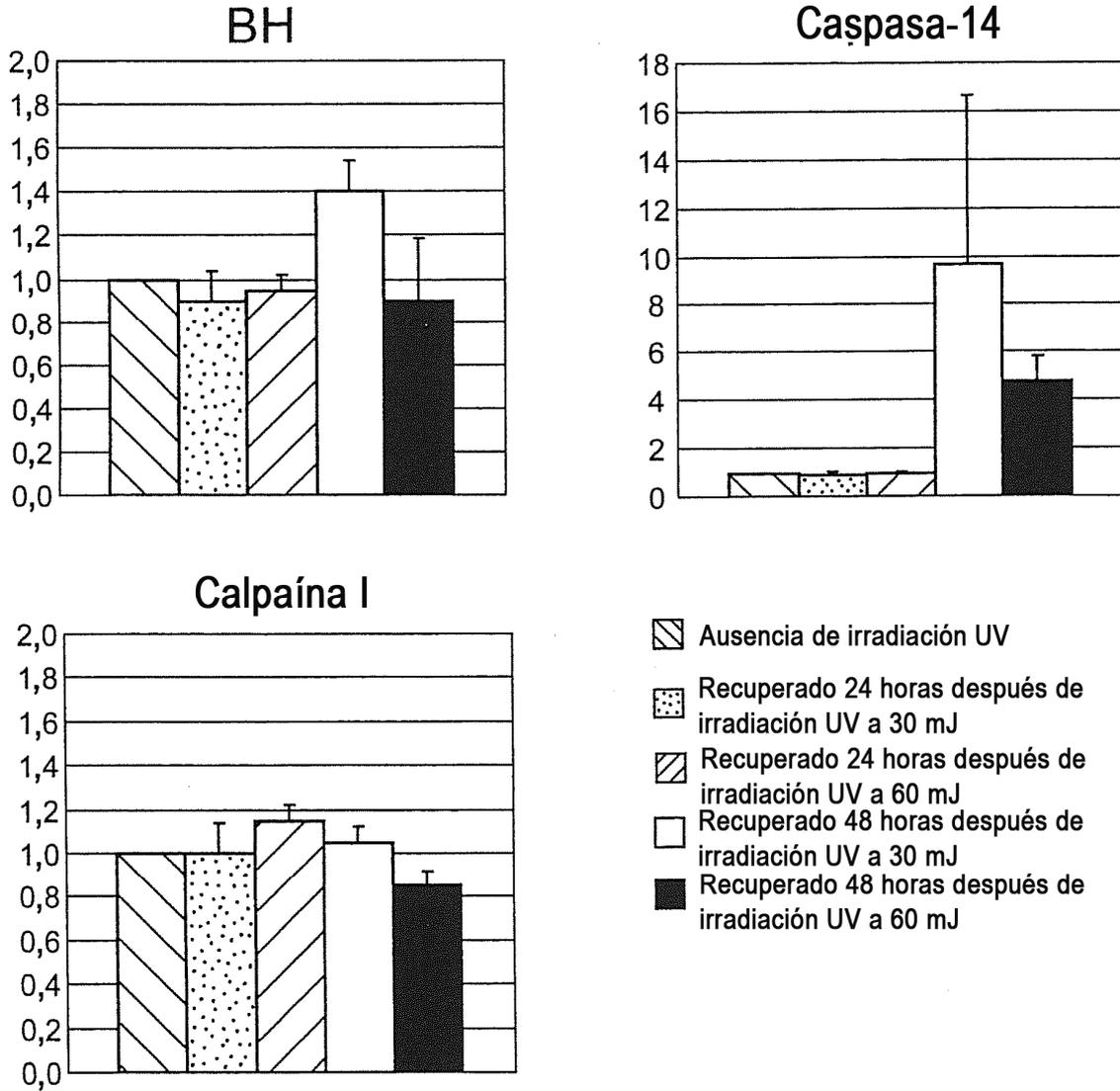


Fig.14

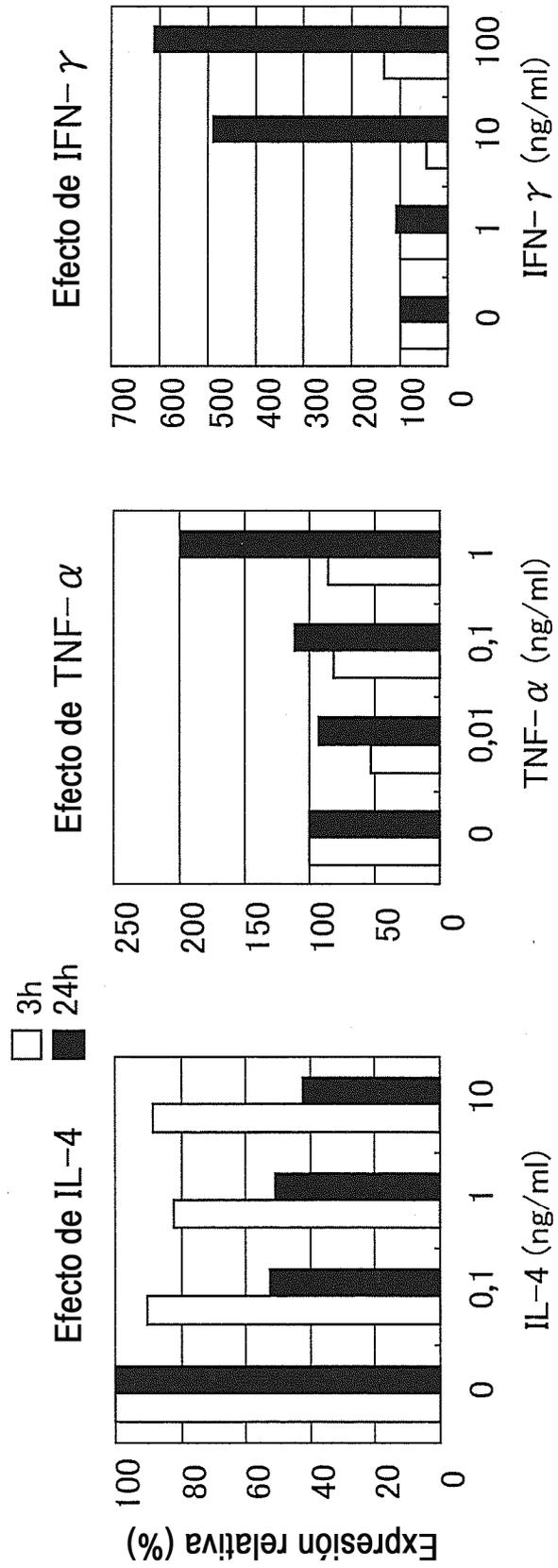


Fig.15

NOMBRE	SECUENCIA
BH-1216 KpnI (directo)	5´ -CCGGGT <u>ACCAT</u> CAGAGTTCCTTAGAA-3´
BH-1016 KpnI (directo)	5´ -CCGGGT <u>ACCCA</u> AGGTTTTTACAATCT-3´
BH-816 KpnI (directo)	5´ -CACGGT <u>ACCT</u> GGGTAGTGTTCCTTGAA - 3´
BH-616 KpnI (directo)	5´ -CGAGGT <u>ACCT</u> CCTTGTGACATATCGA - 3´
BH-444 KpnI (directo)	5´ -AATGGT <u>ACCT</u> TGGAGCGGGCCTGA - 3´
BH-216 KpnI (directo)	5´ -AATGGT <u>ACCAG</u> GGGGGAGTTTTGTCC - 3´
BH-171 KpnI (directo)	5´ -AATGAAGGT <u>ACCT</u> CAGCCTCCCCGCCG - 3´
BH-134 KpnI (directo)	5´ -ACGGGT <u>ACCAG</u> CCGGTTTCCTTTTTTC - 3´
BH-105 KpnI (directo)	5´ -AATGGT <u>ACCT</u> GCGAGAGACAGGTCG - 3´
BH+1 MluI (inverso)	5´ -TAAAT <u>ACGCGT</u> TGGCGCCCACGCTGCCG - 3´

Fig.16

SONDA	SECUENCIA
Sp-1	(sentido) 5'-TCT <u>CCCAGCCTCAGTCTCCCAGCCTCAG</u> -3' (antisentido) 5'-AGAGGGT <u>CGGAGTCAGAGGGTCGGAGTC</u> -3'
MZF-1	(sentido) 5'-CGCGAGGGGGGAGTT <u>CGAGGGGGGAGTTT</u> -3' (antisentido) 5'-GCGCT <u>CCCCCCTCAAGCTCCCCCCTCAA</u> A-3'
IRF-1/2	(sentido) 5'-CCGGTTTCCTTTTT <u>CGCGGTTTCCTTTTC</u> -3' (antisentido) 5'-GGC <u>CAAAGGAAAAAGCGCAAAGGAAAAAG</u> -3'
GATA-1	(sentido) 5'-GCAGCGCAATCCCGGCAGCGCAATCCCGGC-3' (antisentido) 5'-CGTCGCGTTAGGGCCGT <u>CGCGTTAGGGCCG</u> -3'

Fig.17

GEN	SECUENCIA	ASOCIACIÓN
BH	(directo) 5'-TGTGGTTTGGCTGTGATGTT-3' (inverso) 5'-GCACCATCCTGATCATCCTT-3'	55 °C
Calpaína-I	(directo) 5'-ACATGGAGGCCATCACTTTC-3' (inverso) 5'-GGTCCACGTTGTTCCACTCT-3'	55 °C
Sp-1	(directo) 5'-AGCGACCAAGATCACTCCAT-3' (inverso) 5'-TGGGTGACTCAATTCTGCTG-3'	58 °C
MZF-1	(directo) 5'-TAGAGCCCTTGCTCACGTTT-3' (inverso) 5'-GGGCATTGTCTAGGTGGAAA-3'	58 °C
IRF-1*	(directo) 5'-GAACTCCCTGCCAGATATCGAG-3' (inverso) 5'-TGCTCTTAGCATCTCGGCTGGA-3'	58 °C
IRF-2*	(directo) 5'-TGGATGCATGCGGCTAGA-3' (inverso) 5'-CATCTGAAATTCGCCTTCC-3'	58 °C
GATA-1	(directo) 5'-ATTGTCAGTAAACGGGCAGG-3' (inverso) 5'-TCTGAATACCATCCTTCCGC-3'	58 °C

Fig.18

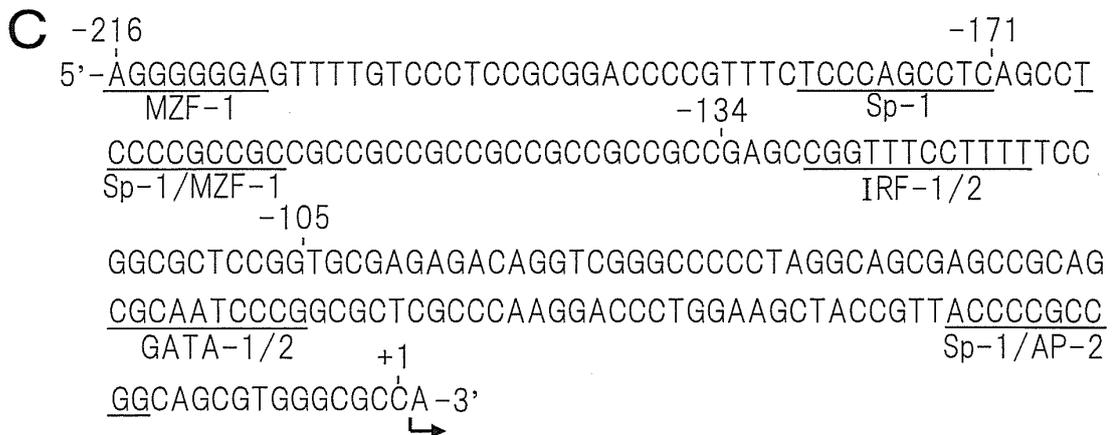
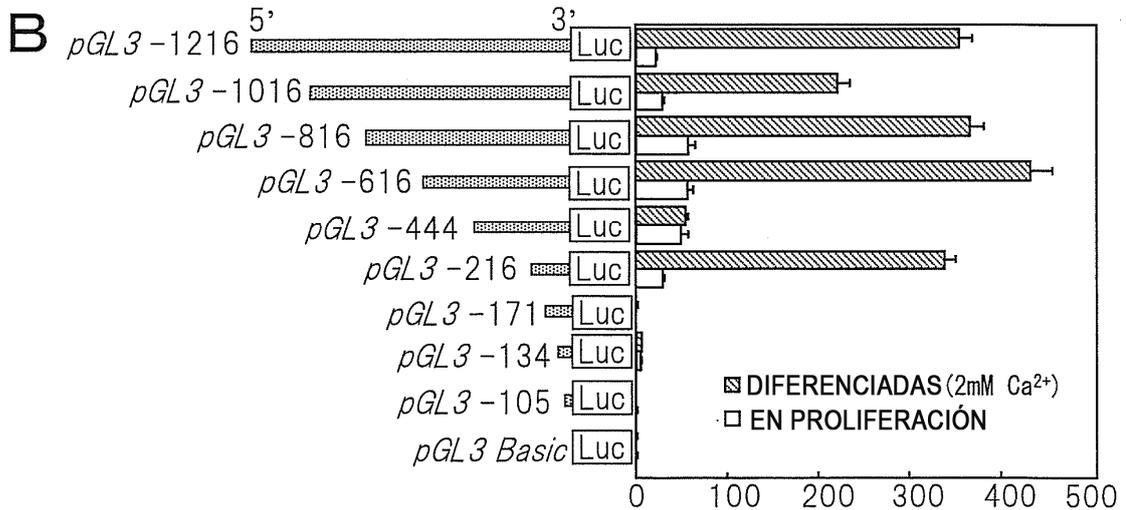
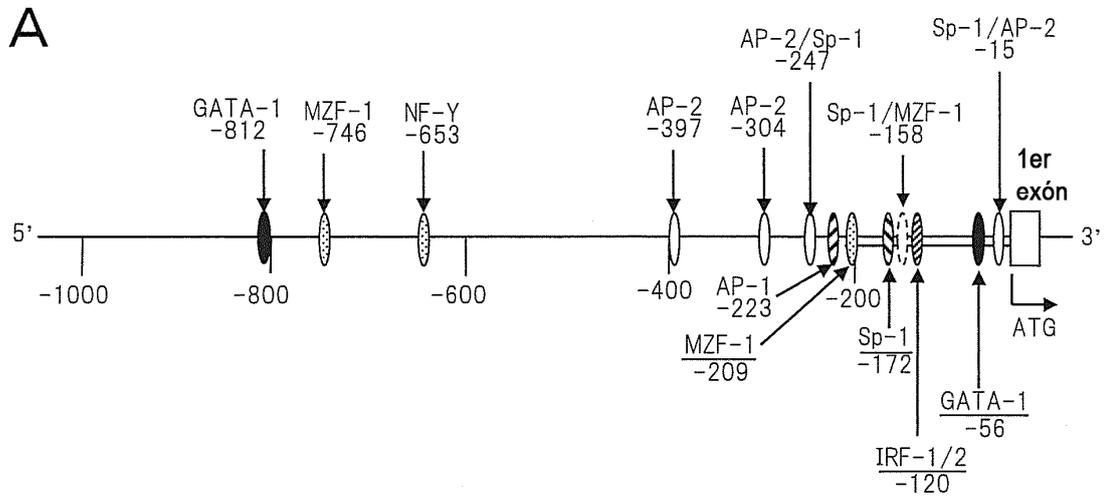


Fig.19

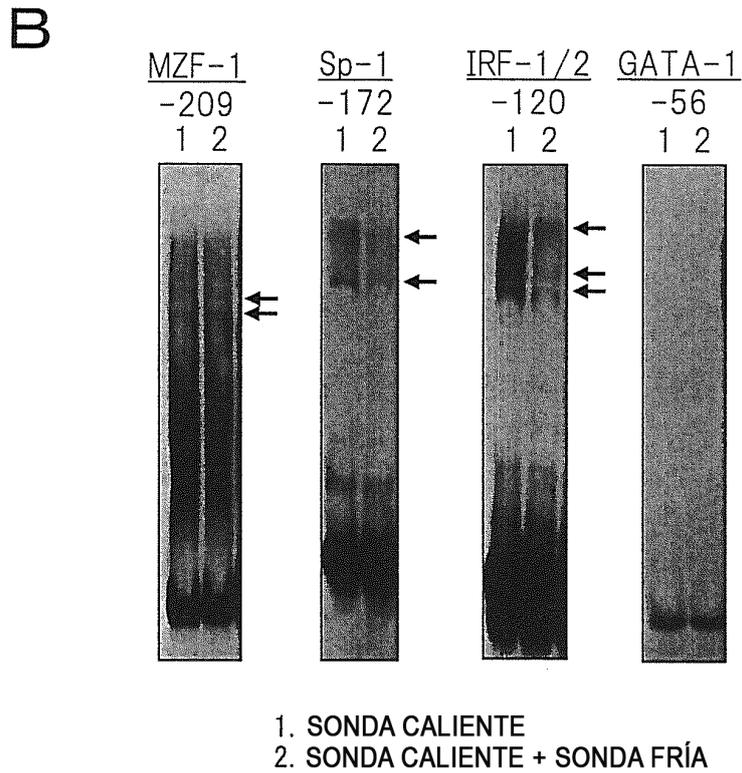
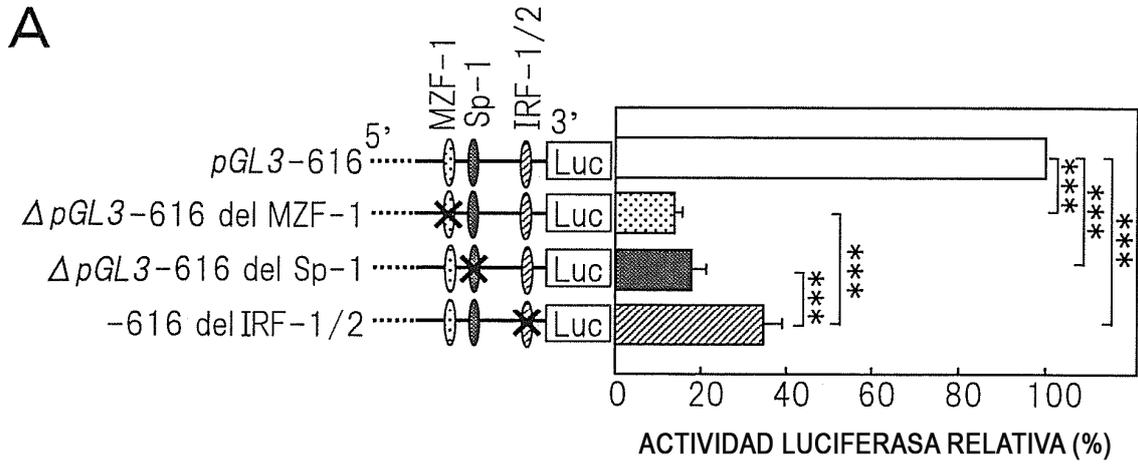


Fig.20

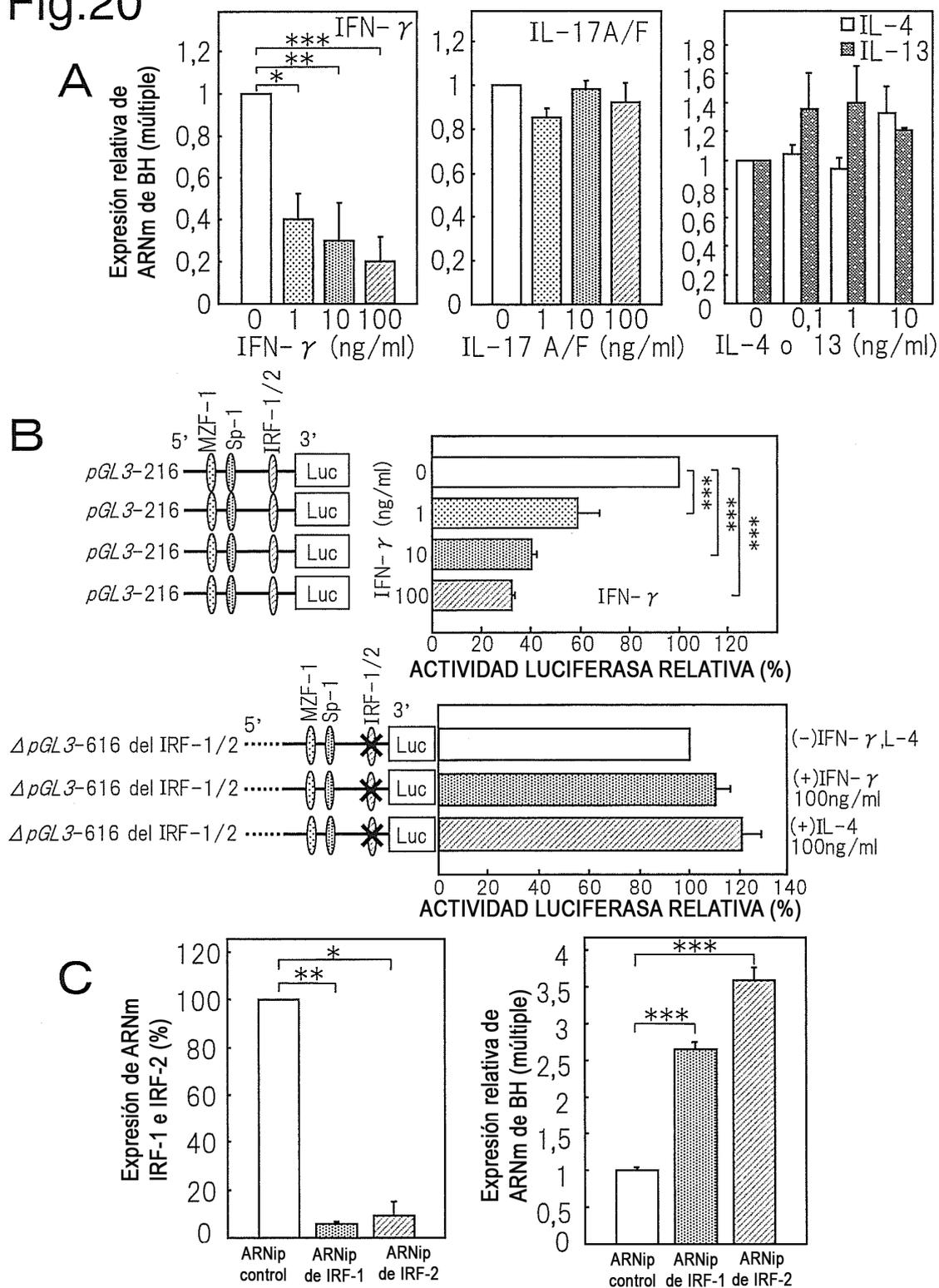


Fig.21

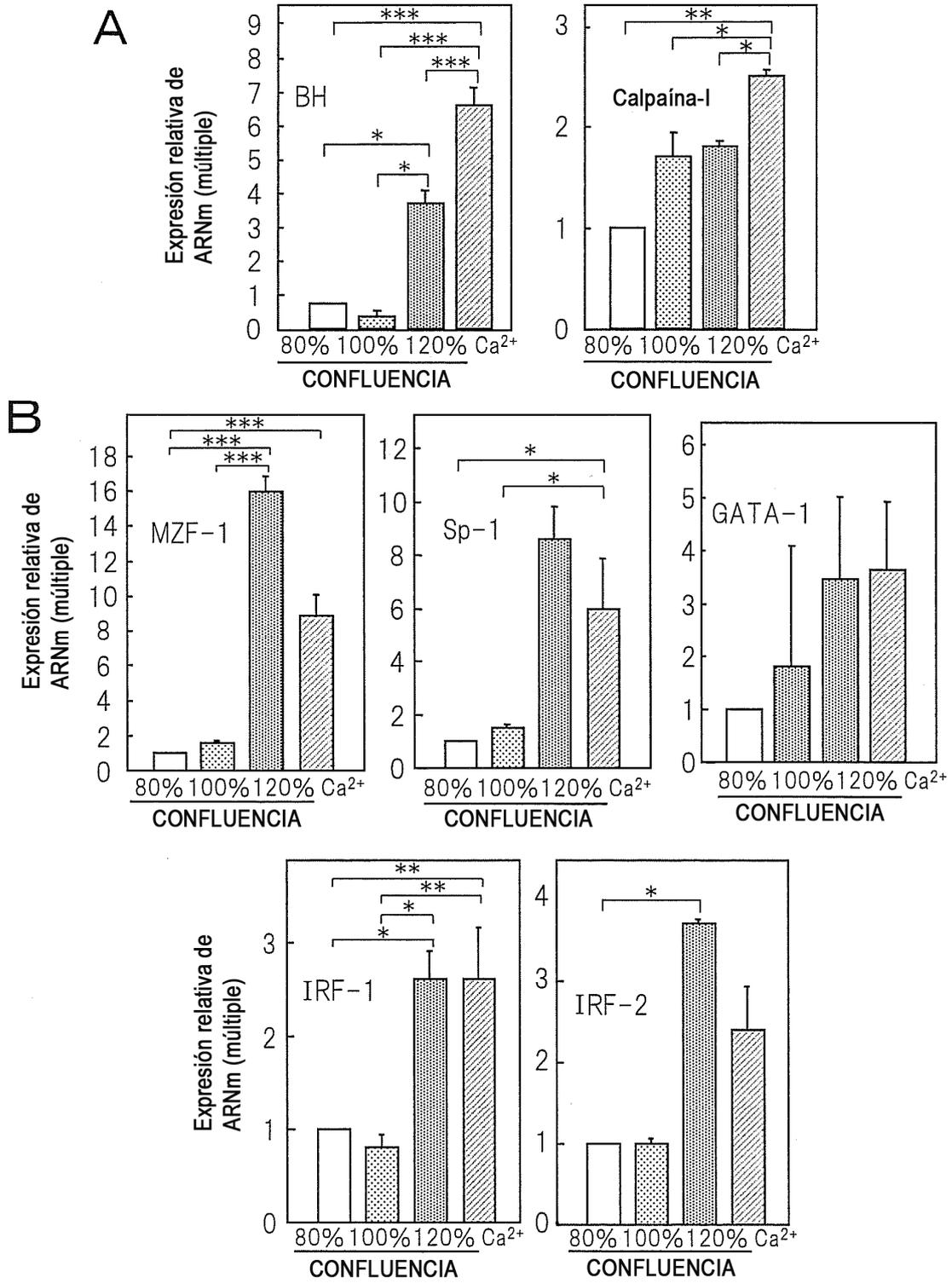


Fig.22

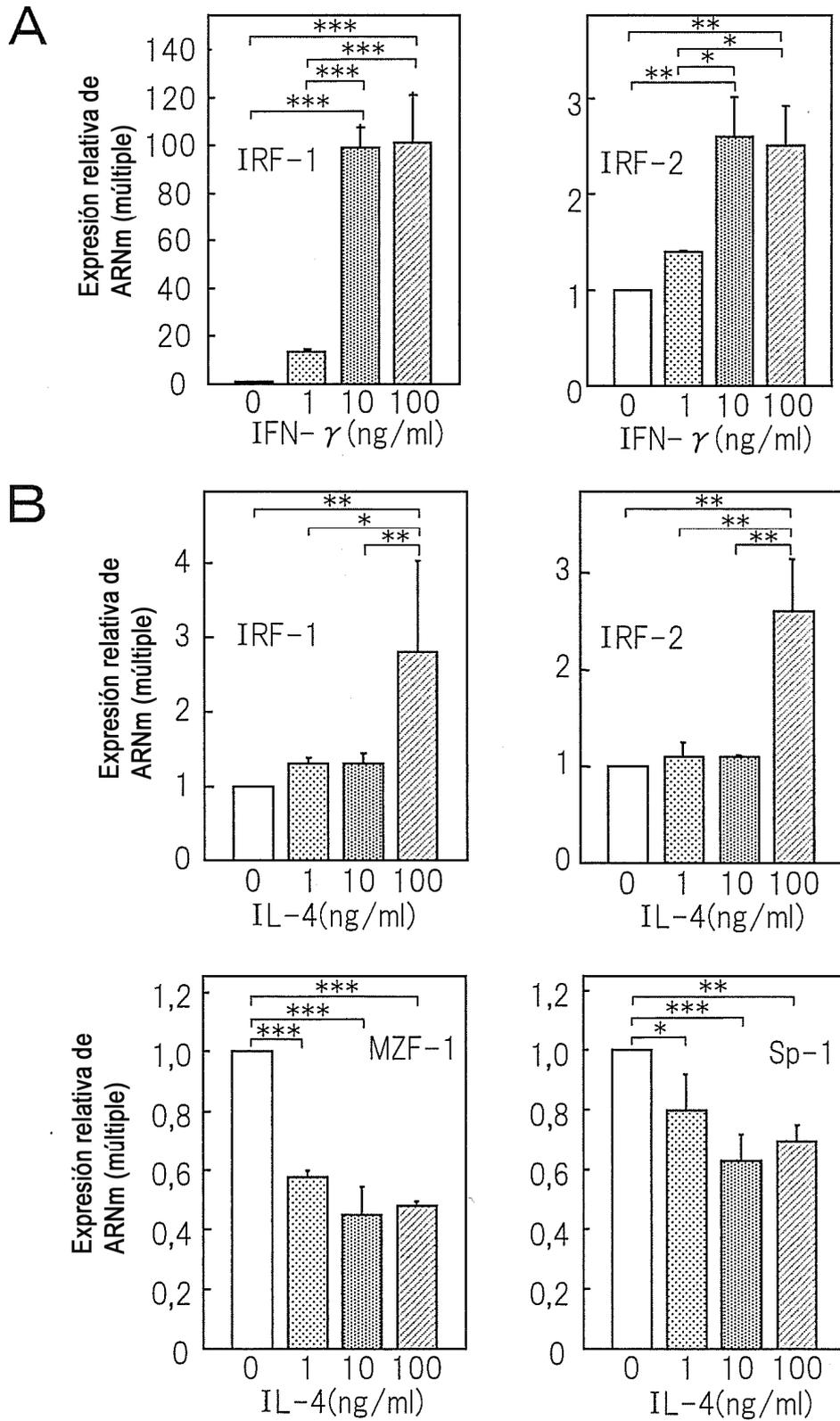
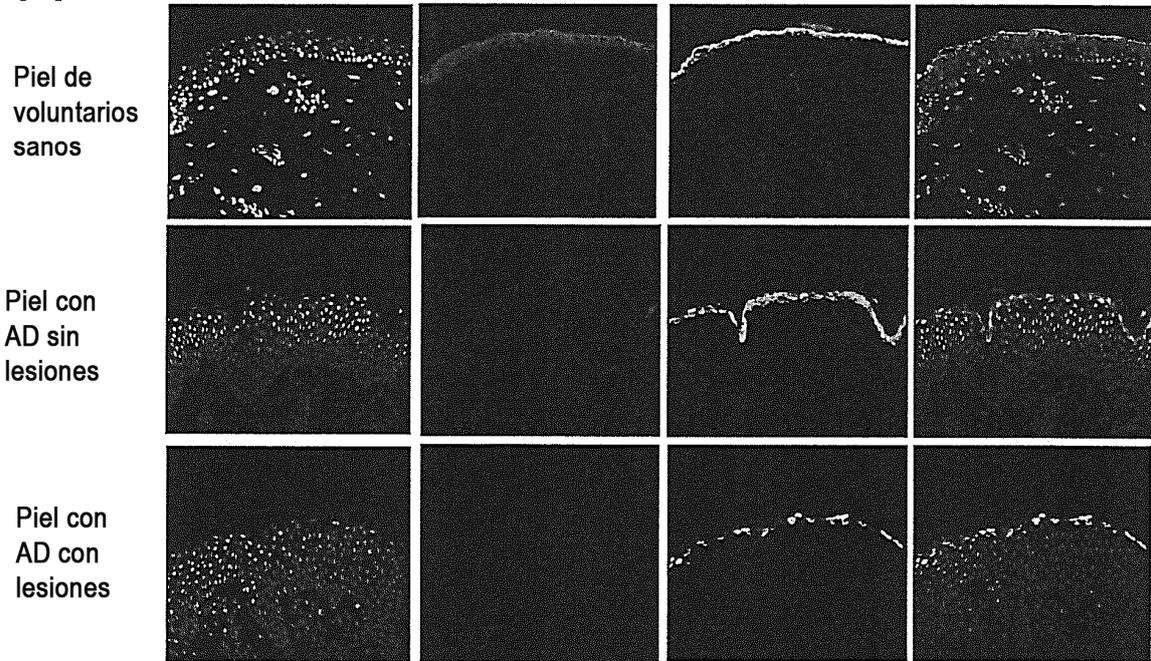


Fig.23

A



B

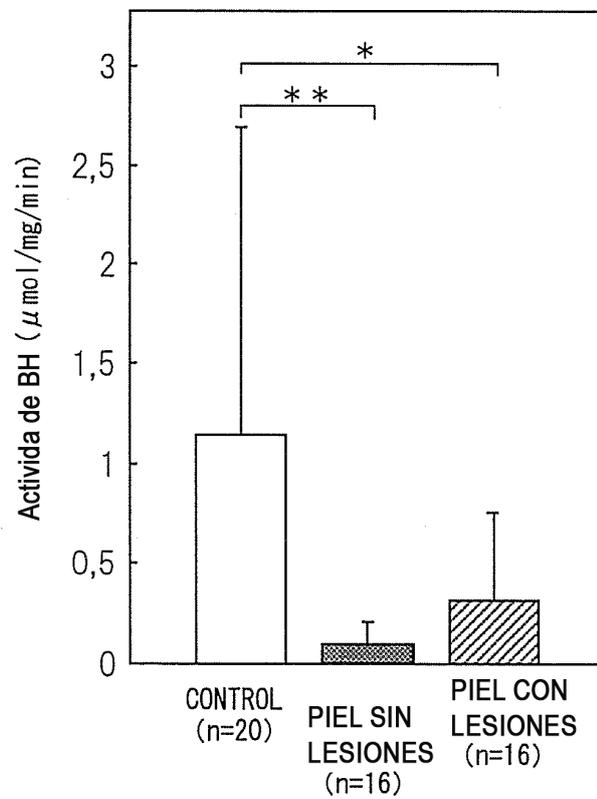


Fig.24

