

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 627**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 5/08 (2006.01)
A61Q 5/10 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/04 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2009 PCT/GB2009/051139**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10029343**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09736640 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2331057**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular la pigmentación de la piel**

30 Prioridad:

10.09.2008 GB 0816507
18.05.2009 GB 0908498

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF BRADFORD (100.0%)
Richmond Road
Bradford, Yorkshire BD7 1DP , GB

72 Inventor/es:

SINGH, SUMAN, KUMAR y
TOBIN, DESMOND, JOHN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 727 627 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

Composiciones y métodos para modular la pigmentación de la piel

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para estudiar o modular la pigmentación de melanina en la piel. La invención se refiere a composiciones capaces de modular la transferencia de melanina de melanocitos a queratinocitos y potencialmente de queratinocitos a queratinocitos, y a los métodos para modular la pigmentación de la piel conforme a las reivindicaciones.

Los melanocitos son células procedentes de la cresta neural distribuidas a lo largo de la capa basal de la epidermis y el bulbo piloso. Estas células sintetizan el pigmento melanina dentro de orgánulos específicos de melanocitos únicos llamados melanosomas. Para que la piel y el cabello se pigmenten, esta melanina debe transferirse de los melanocitos a los queratinocitos adyacentes. El color de la piel y el pelo/lana/piel de los mamíferos se determina por la cantidad y calidad de la melanina (eumelanina marrón/negra o feomelanina roja/amarilla) en un proceso que involucra una gran cantidad de etapas reguladas en varios puntos de control por una gama de diferentes moléculas y compuestos. Las últimas dos décadas han visto un gran avance en nuestros centros de conocimiento sobre cómo se controla, un interés clínico/cosmético principal ya que este proceso controla por último el nivel de pigmentación percibido en la superficie de la piel y a lo largo de la fibra capilar.

En esta solicitud se describe un nuevo mecanismo que controla la transferencia de melanina desde los melanocitos cutáneos humanos a los queratinocitos cutáneos humanos. Este mecanismo implica la acción de BMP6, que estimula este proceso en función de la dosis.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son moléculas de señalización segregadas que pertenecen a la superfamilia de TGF- β . Desempeñan funciones importantes en la proliferación, diferenciación, motilidad, adherencia y muerte celular de las células (Hogan, 1996). Hasta la fecha, se han descrito más de 20 miembros distintos de la familia de BMP, y cada uno ejerce su actividad biológica mediante la interacción con receptores específicos de BMP (Wozney *et al.*, 1988). La señalización de BMP opera en múltiples niveles según el tipo de BMP, la presencia de antagonista(s), la etapa de desarrollo del tejido objetivo y el tipo de receptor de dianocito (Botchkarev 2003). Las BMP se unen a dos familias de receptores transmembrana, receptor BMP múltiple (BMPRI) I y un solo BMPRII (Hogan 1996). Curiosamente, para iniciar la señalización, BMP tiene que unirse a ambos receptores, produciendo la fosforilación de un dominio intracelular en BMPRI y BMP-RII y activar la transducción de señales intracelular.

Las BMP son potentes reguladores del desarrollo cutáneo, y también desempeñan funciones importantes en el control de la homeostasis epidérmica, el crecimiento del folículo piloso y la melanogénesis en la piel normal posnatal (Botchkarev 2003). Los melanocitos son células procedentes de la cresta neural que migran a la epidermis y los folículos pilosos durante la embriogénesis y posteriormente sintetizan y distribuyen melanina a los queratinocitos circundantes (Halaban *et al.* 2003). Curiosamente, hay varios receptores BMPRI, BMPRIA (ALK3; Seq ID 4), BMPRIB (ALK6; Seq ID 2) y ActR-I (ALK2) (Kawabata *et al.*, 1998) y en las células precursoras neurales la señalización a través de ALK3 induce su proliferación, mientras que ALK6 induce su diferenciación (Panchision *et al.*, 2001), lo que sugiere que la expresión del receptor determina el efecto BMP en las células.

El grupo Gilchrest demostró por primera vez la función de BMP4 en la biología de los melanocitos en un estudio que demuestra que este miembro particular de la familia de BMP actuó como un inhibidor autocrino de melanogénesis en melanocitos humanos normales al inhibir la expresión y la actividad de la enzima limitadora de la velocidad (tirosinasa) en melanocitos (Yaar *et al.*, 2006). El documento WO03/086313 describe métodos para el aclaramiento de la piel y el cabello en relación con BMP4.

Sin embargo, la participación de otras proteínas BMP en la biología de los melanocitos (p. ej., melanogénesis y/o transferencia de melanina) no se ha descrito hasta el momento. Si bien se sabe mucho sobre la regulación de la melanogénesis (es decir, la síntesis de melanina) en los melanocitos, nuestro conocimiento de cómo los melanosomas se transfieren de los melanocitos a los queratinocitos es aún muy limitado. Además de la función de la citofagocitosis, hay cada vez más pruebas que apoyan la transferencia de melanosomas a través de filopodios que pueden interactuar con la membrana plasmática de queratinocitos (Scott *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2008). Curiosamente, las estructuras consistentes con filopodios que surgen de los lados y puntas de las dendritas de melanocitos y que contienen melanosomas dentro de su luminaria, ya se han descrito en la piel humana *in situ*, así como *in vitro* (Scott *et al.*, 2002).

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para aumentar la pigmentación de la melanina del cabello de un sujeto.

Para modular la pigmentación de la piel, existen dos enfoques principales: la modulación de la melanogénesis y la modulación de la transferencia de melanina. La presente invención puede implicar uno, otro o ambos de estos

enfoques. Sin embargo, los métodos que modulan la transferencia de melanina son de particular interés ya que los presentes inventores han descubierto que la transferencia de melanina puede ser dirigida eficazmente. Dado que se trata de un proceso más "aguas abajo" que la melanogénesis, es un objetivo más atractivo en lo que se refiere a evitar efectos secundarios.

- 5 Esto es útil para el aclaramiento cosmético de la piel y/o el aclaramiento u oscurecimiento del color del cabello mediante la modulación del nivel de pigmentación de melanina de la piel y/o el cabello.

Por consiguiente, la invención también proporciona el uso de una composición que comprende esclerostina antagonista de BMP6, la proteína cordinoide o la relacionada con la folistatina (FSRP) para reducir la pigmentación de la piel y/o el cabello de un sujeto y (reivindicación 12) un método cosmético de aclaramiento del color de la piel y/o el cabello al reducir el nivel de pigmentación de la piel y/o el cabello por la melanina, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que comprende la esclerostina antagonista de BMP6, la proteína cordinoide o relacionada con la folistatina (FSRP).

Además se proporciona un método cosmético de oscurecimiento del color del cabello al aumentar el nivel de pigmentación de la melanina del cabello, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que comprende BMP6, o un fragmento o variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina.

Es bien sabido que la melanina protege la piel de muchos de los efectos dañinos de la radiación ultravioleta. Por consiguiente, el aumento de la cantidad de melanina en la piel de un sujeto puede ser importante para reducir el daño producido por la luz solar, p. ej. la mutación de una célula que podría provocar cáncer o un envejecimiento prematuro.

Por lo tanto, la invención también proporciona BMP6, o un fragmento o variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para utilización en un método de aumento de la pigmentación de la piel de un sujeto por la melanina.

En otra alternativa, la invención proporciona composiciones para usar en el tratamiento de una afección asociada a una pigmentación anormal de la piel según las reivindicaciones. Dicho tratamiento puede ser curativo o puede usarse para síntomas de lesión. Las enfermedades o afecciones asociadas a la pigmentación alterada de la piel que podrían tratarse incluyen hiperpigmentación (p. ej., melasma, cloasma, lentigo senil, lentigo solar, efélides, hiperpigmentación posinflamatoria) e hipopigmentación (p. ej., vitiligo e hipopigmentación posinflamatoria) y pérdida de pigmentación como resultado de daños en la piel.

Por lo tanto, la invención también proporciona BMP6, o un fragmento o variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. n°: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. n°: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para utilización en un método de tratamiento de hipopigmentación de la piel para utilizar en un método de tratamiento de vitiligo.

Además, la invención también proporciona una composición que comprende esclerostina, proteína cordinoide o relacionada con folistatina, para su utilización en un método de tratamiento de hiperpigmentación de la piel.

En una realización preferida de la presente invención la composición se aplica a la superficie externa de la piel y/o del cabello de un sujeto.

En una realización, la presente invención implica la aplicación de una composición que comprende un polipéptido de BMP6 (número de ingreso NM_001718; Seq ID 1) o un fragmento o variante del mismo según las reivindicaciones, en donde dicho fragmento o variante es funcionalmente activo.

En particular, "activo" en este contexto puede significar la capacidad para estimular la transferencia de melanina desde los melanocitos a los queratinocitos en los ensayos descritos anteriormente.

Un fragmento o variante de BMP6 "funcionalmente activo" muestra la capacidad de aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina según se determina mediante los ensayos que se describen más adelante. La actividad funcional de las proteínas BMP6, las variantes y los fragmentos pueden analizarse mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica (Current Protocols in Protein Science (1998), Coligan *et al.*, eds., John

Wiley & Sons, Inc., Somerset, Nueva Jersey) y como se explica más adelante.

Para los fines en la presente memoria, los fragmentos funcionalmente activos pueden incluir los fragmentos que comprenden uno o más dominios estructurales de un BMP6, como un dominio de unión, siempre que dicho dominio sea capaz de la actividad deseada. Los dominios de proteínas se pueden identificar utilizando el programa PFAM (Bateman A., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27: 260-2).

El fragmento o variante funcionalmente activo incluye polipéptidos BMP6 biotecnológicas y fragmentos funcionalmente activos o variantes de los mismos, incluidos los codificados por un ácido nucleico que codifica BMP6.

El polipéptido BMP6 funcionalmente activo podría abarcar teóricamente la proteína precursora de BMP6 (número de ingreso P22004) (SEC ID 1). Se cree que el polipéptido BMP6 maduro incluye los aminoácidos 374-513 del mismo.

Los fragmentos funcionalmente activos comprenden los aminoácidos 382-513, 388-513 y 412-513 del precursor de BMP6 (SEC ID 1).

La expresión "ácido nucleico que codifica BMP 6" se refiere a una molécula de ADN o ARN que codifica un polipéptido BMP6.

Preferiblemente, el polipéptido BMP6 o ácido nucleico o variante o fragmento del mismo es de un ser humano, pero también puede ser un homólogo o derivado del mismo.

Dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente 85%, aún más preferiblemente 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con BMP6 humana o la secuencia que codifica BMP6 (NM 001718).

Como se usa en la presente memoria, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia del asunto, o una porción específica de una secuencia del asunto, se define como el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia del derivado experimental idéntica a los nucleótidos o aminoácidos en la secuencia del asunto (o parte específica de la misma), después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, según lo generado por el programa WU-BLAST-2.0a19 (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1997) 215: 403-410) con todos los parámetros de búsqueda establecidos en los valores predeterminados. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa en función de la composición de cada secuencia y la composición de la base de datos concreta frente a la que se busca la secuencia de interés. Un% de valor de identidad se determina por el número de nucleótidos o aminoácidos idénticos coincidentes dividido por la longitud de la secuencia para la cual se comunica el porcentaje de identidad. El "porcentaje (%) de similitud de secuencia de aminoácidos" se determina haciendo el mismo cálculo que para determinar el% de identidad de secuencia de aminoácidos, pero incluyendo sustituciones conservadoras de aminoácidos además de aminoácidos idénticos en el cálculo.

Una sustitución conservadora de aminoácidos es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que el plegamiento o la actividad de la proteína no se ve significativamente afectado. Los aminoácidos aromáticos que pueden sustituirse entre sí son fenilalanina, triptófano y tirosina; los aminoácidos hidrófobos intercambiables son leucina, isoleucina, metionina y valina; los aminoácidos polares intercambiables son glutamina y asparagina; los aminoácidos básicos intercambiables son arginina, lisina e histidina; los aminoácidos ácidos intercambiables son ácido aspártico y ácido glutámico; y los pequeños aminoácidos intercambiables son alanina, serina, treonina, cisteína y glicina.

Alternativamente, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman proporciona una alineación para las secuencias de ácido nucleico (Smith y Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489; base de datos: European Bioinformatics Institute; Smith y Waterman, 1981, *J. of Molec. Biol.*, 147: 195-197; Nicholas *et al.*, 1998, "A tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods" (www.psc.edu) y referencias citadas en ésta; W. R. Pearson, 1991, *Genomics* 11 : 635-650). Este algoritmo puede aplicarse a las secuencias de aminoácidos utilizando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff (Dayhoff: *Atlas of Proteins Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., EE.UU.), y normalizada por Gribskov (Gribskov 1986 *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 6745-6763). El algoritmo de Smith-Waterman se puede emplear donde los parámetros predeterminados se usan para la puntuación (por ejemplo, penalización de 12 por apertura de hueco, penalización de dos por ampliación de hueco). De los datos generados, el valor de "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencia".

Las moléculas de ácido nucleico modificadas de las moléculas del presente ácido nucleico incluyen secuencias que se hibridan con la secuencia de ácido nucleico que codifica BMP6. La severidad de hibridación puede controlarse mediante la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de agentes desnaturizantes como la formamida durante la hibridación y el lavado. Las condiciones usadas de forma rutinaria se exponen en textos de procedimientos fácilmente disponibles (p. ej. *Current Protocol in Molecular Biology*, vol. 1, cap. 2.10, John Wiley & Sons, Publishers (1994); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor (1989)).

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención es capaz de hibridarse a una molécula de

ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos de una BMP6 en condiciones de hibridación de alta severidad que son: prehibridación de filtros que contienen ácido nucleico durante 8 horas a toda la noche a 65°C en una solución que comprende 6 × citrato de concentración única (SSC) (1 × SSC es NaCl 0,15 M, citrato Na 0,015 M; pH 7,0), 5 × solución de Denhardt, pirofosfato de sodio al 0,05% y 100 g/ml de ADN de esperma de arenque; hibridación durante 18-20 horas a 65°C en una solución que contiene 6 x SSC, 1 x solución de Denhardt, 100 µg/ml de ARNt de levadura y pirofosfato de sodio al 0,05%; y lavado de los filtros a 65°C durante 1 hora en una solución que contiene 0,1 x SSC y SDS al 0,1% (dodecilsulfato de sodio).

En otras realizaciones, se usan condiciones de hibridación moderadamente severas tales como: pretratamiento de filtros que contienen ácido nucleico durante 6 horas a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5 × SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado; hibridación durante 18-20 h a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5 x SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 10% (peso/vol) de sulfato de dextrano; seguido de lavado dos veces durante 1 hora a 55°C en una solución que contiene 2 × SSC y SDS al 0,1%.

Alternativamente, se pueden usar condiciones de baja severidad tales como: incubación durante 8 horas a toda la noche a 37°C en una solución que comprende formamida al 20%, 5 × SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 × solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón, cortado y desnaturalizado; hibridación en el mismo amortiguador durante 18 a 20 horas; y lavado de filtros en 1 × SSC a aproximadamente 37°C durante 1 hora.

En otra realización, la invención implica una composición que comprende un compuesto capaz de unirse a BMP6 e inactivarlo según las reivindicaciones.

Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación.

En otra realización la invención proporciona el uso de una molécula de ARN capaz de interacción complementaria dirigida o interferencia de ARN frente al ARNm que codifica ALK6 o Cdc42. Por ejemplo, una molécula de ARNi adecuada para dirigir ARNm de Cdc42 puede ser

oligorribonucleótidos 5'-GAU AACUCACCACUGUCCATT-3' y

5'-UGGACAGUGGUGAGUUAUUCTT-3'; u

oligorribonucleótidos 5'-GACUCCUUUCUUGCUUGUUTT-3' y

5'-ACAAGCAAGAAAGGAGUUCTT-3' pueden usarse para inhibir Cdc42, u otra secuencia apropiada y específica. Está dentro de los conocimientos del experto en la técnica determinar otras secuencias adecuadas que presentarían ARNi frente a ARNm de ALK6 o Cdc42.

El ARNi es el proceso de silenciamiento génico tras la transcripción específico de secuencia en animales y plantas, iniciado por un ARN bicatenario (ARNbc) que es homólogo en secuencia al gen silenciado. Se conocen en la técnica métodos relacionados con el uso de RNAi para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y seres humanos (Fire A., *et al.*, 1998 *Nature* 391: 806-811; Fire, A. *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. *Genes Dev.* 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., *et al.*, *Nature Rev. Genet.* 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. *Chem. Biochem.* 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. *et al.*, *Science* 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., *et al.*, *Nature* 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., *et al.*, *Cell* 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., *et al.*, *Nature* 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., *et al.*, *Genes Dev.* 15, 188-200 (2001); documentos WO0129058; WO9932619; Elbashir S. M., *et al.*, 2001 *Nature* 411: 494-498; Novina C. D. y Sharp P. 2004 *Nature* 430: 161-164; Soutschek J. *et al.* 2004 *Nature* 432: 173-178).

Los moduladores de ácido nucleico se usan generalmente como reactivos de investigación, diagnóstico y terapéuticos. Por ejemplo, los oligonucleótidos complementarios, que son capaces de inhibir la expresión génica con una especificidad exquisita, se usan a menudo para dilucidar la función de determinados genes (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.165.790). Los moduladores de ácido nucleico también se utilizan, por ejemplo, para distinguir entre las funciones de varios miembros de una ruta biológica. Por ejemplo, se han empleado oligómeros complementarios como restos terapéuticos en el tratamiento de condiciones patológicas en animales y en el hombre y se ha demostrado en numerosos ensayos clínicos que son seguros y eficaces (Milligan J. F., *et al.*, *Current Concepts in Antisense Drug Design*, *J. Med. Chem.* (1993) 36: 1923-1937; Tonkinson J. L. *et al.*, *Antisense Oligodeoxynucleotides as Clinical Therapeutic Agents*, *Cancer Invest.* (1996) 14: 54-65).

En una realización preferida de la presente invención, la sustancia es un antagonista de BMP6. Algunos antagonistas de BMP6 que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen esclerostina, proteína cordinoide y relacionada con folistatina (FSRP). En una realización particularmente preferida, el antagonista es esclerostina (SEC ID 3).

Los antagonistas de ALK6 pueden inhibir la transferencia de melanina de los melanocitos a los queratinocitos,

- reduciendo así la pigmentación de la piel y/o el cabello. Por otra parte, los agonistas de ALK6 pueden ser capaces de mejorar la transferencia de melanina de los melanocitos a los queratinocitos, aumentando así la pigmentación de la piel y el cabello. Ambos de estos efectos pueden ser deseables desde un punto de vista cosmético y, además, puede haber beneficios médicos de dicho efecto. Por ejemplo, actualmente es deseable en Europa occidental y en los Estados Unidos (y en otros lugares) tener un aspecto bronceado al sol por razones cosméticas. En algunos países de Asia es deseable tener un aspecto relativamente pálido por razones cosméticas. Además, dado que la melanina está involucrada en la protección de la piel de los efectos dañinos del sol, puede ser deseable aumentar el contenido en melanina de la piel desde un punto de vista protector.
- Se prefiere que el sujeto sea un mamífero, preferiblemente un primate y especialmente un ser humano.
- Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una composición que comprende una sustancia capaz de modular la actividad o expresión de ALK6 o Cdc42 para su uso en la modulación de la pigmentación de la piel y/o el cabello de un sujeto según las reivindicaciones. Los detalles de las sustancias adecuadas se proporcionaron anteriormente, y la modulación puede ser con fines estéticos o terapéuticos.
- También como se describió anteriormente, la invención proporciona el uso de una composición que comprende una sustancia capaz de modular la actividad o expresión de ALK6 o Cdc42 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a una pigmentación anormal de la piel según las reivindicaciones. Dicho tratamiento puede ser curativo, o podría ser para disminuir los síntomas.
- En general, es deseable que las composiciones según la presente invención sean adecuadas para la aplicación tópica en la piel. Se puede emplear cualquier formulación tópica corriente, tal como una solución, suspensión, gel, crema, ungüento o pomada y similares. La preparación de dichas formulaciones tópicas se describe en la técnica de formulaciones farmacéuticas como se ejemplifica, por ejemplo, por Gennaro *et al.* (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing. Para aplicación tópica, las composiciones también podrían administrarse en forma de polvo o aerosol, particularmente en forma de aerosol.
- También se describe un método para evaluar la capacidad de una sustancia para modular la transferencia de melanina de un melanocito a un queratinocito o potencialmente de queratinocito a queratinocito, comprendiendo el método las etapas siguientes:
- proporcionar una sustancia de ensayo; y
 - determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para interactuar con ALK6.
- También se describe un método que implica determinar la capacidad de una sustancia para unirse a ALK6. La ALK6 puede estar en una célula, o puede proporcionarse en un soporte.
- El método puede implicar proporcionar una célula que exprese ALK6 y determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para interactuar con la ALK6 expresada por dicha célula, especialmente ALK6 expresada en la superficie de la célula.
- La célula que expresa ALK6 puede ser un melanocito.
- Al determinar la capacidad de una sustancia de ensayo para interactuar con ALK6, es posible identificar sustancias que tienen el potencial de ser activas en la modulación de la transferencia de melanina o la melanogénesis.
- También se describe un método para determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para modular la actividad y/o la expresión de ALK6.
- El método puede implicar determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para activar ALK6, es decir, determinar si la sustancia de ensayo es un agonista de ALK6.
- El método puede implicar determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para desactivar ALK6, es decir, determinar si la sustancia de ensayo es un antagonista de ALK6.
- Hay varias formas en las que el experto en la técnica podría determinar si una sustancia de ensayo es capaz de modular la actividad de ALK6. Por ejemplo, es posible determinar el efecto de la sustancia de ensayo en las moléculas de señalización aguas abajo que se efectúan mediante la activación de ALK6. Alternativamente, sería posible determinar el efecto de una sustancia de ensayo en la expresión de ARNm o proteínas que se efectúan mediante la activación de ALK6. Esto podría implicar determinar, por ejemplo, a) la selección de las R-Smad (Smad reguladas por receptor, Smad-1, -5, -8) y su posterior fosforilación al unirse a ALK6; b) bloqueo de la activación de R-Smad por Smad inhibitoras (1-Smads), p. ej. Smad 6 y 7; o c) degradación selectiva de ALK6 por las Smurf (factores reguladores de la ubiquitinación de Smad).
- También hay varias formas en las que el experto en la materia podría determinar la capacidad de una sustancia para aumentar la expresión de ALK6. Por ejemplo, el experto en la materia podría determinar cuantitativamente las concentraciones de ARNm de ALK6 en las células (p. ej. utilizando rtPCR cuantitativa), o podría determinar

cuantitativamente la expresión de proteínas en la superficie de una célula (p. ej., utilizando técnicas de inmunofluorescencia, ELISA, electroforesis bidimensional o métodos de espectrometría de masas).

5 El método puede implicar la etapa de determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para interactuar con ALK6 al determinar el efecto de la sustancia de ensayo en la expresión o activación de Cdc42, preferiblemente la expresión de Cdc42. Los métodos para determinar la expresión de Cdc42 incluyen medir la cantidad de proteína Cdc42 en o sobre la célula, o determinar la cantidad de un precursor en la síntesis de la proteína Cdc42, por ejemplo, el ARNm que codifica a Cdc42. Las técnicas requeridas para determinar el nivel de expresión de la proteína Cdc42 o las concentraciones de ARNm de Cdc42 serían evidentes para el experto en la materia. Las técnicas para determinar las concentraciones de proteínas pueden incluir la hibridación northern, PCR con transcriptasa inversa, 10 PCR cuantitativa, chips de ADN o chips Affymetrix®.

En particular, la presente invención se refiere a sustancias según las reivindicaciones que son capaces de interactuar con ALK6 de una manera que afecta a la melanogénesis o la transferencia de melanina. Por consiguiente, es particularmente deseable determinar el efecto de una sustancia de ensayo sobre la melanogénesis o la transferencia de melanina. Los métodos para lograr esto se detallan en la presente solicitud, por ejemplo, 15 determinando el efecto de una sustancia en el número de melanosomas transferidos desde un melanocito a un queratinocito o potencialmente de queratinocito a queratinocito. Esto se puede lograr utilizando las técnicas de inmunotinción descritas en la presente solicitud.

El método puede implicar la etapa de proporcionar BMP6. Al proporcionar BMP6 en el método, es posible determinar que la capacidad de una sustancia de ensayo para modular la actividad de ALK6 es la presencia de su ligando biológico. Dicho método puede ser más relevante para las condiciones fisiológicas, ya que evalúa la capacidad de un compuesto para interactuar con ALK6 en competencia con BMP6. 20

También se describe un método para evaluar la capacidad de una sustancia para modular la transferencia de melanina desde un melanocito a un queratinocito, o potencialmente de queratinocito a queratinocito, comprendiendo el método las etapas siguientes:

- 25 - proporcionar una sustancia de ensayo;
- proporcionar una célula que expresa Cdc42; y
- determinar la capacidad de la sustancia de ensayo para modular la actividad y/o expresión de Cdc42.

La célula que expresa Cdc42 puede ser un melanocito o un queratinocito, más preferiblemente un melanocito.

30 El método puede involucrar la comparación de la actividad y/o la expresión de Cdc42 en una célula tratada con la sustancia de ensayo con la actividad y/o la expresión de Cdc42 en una célula de referencia.

El nivel de expresión de Cdc42 puede determinarse por muchos métodos evidentes para el experto en la técnica. En realizaciones de la presente invención, la expresión puede determinarse usando inmunofluorescencia, transferencia western o determinando el nivel de ARNm de Cdc42. Como se mencionó anteriormente, otros métodos adecuados serían evidentes para el experto en la materia.

35 Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- Las figuras 1A y B muestran los resultados de la evaluación de queratinocitos epidérmicos y la citotoxicidad de melanocitos epidérmicos para la incubación de BMP6 *in vitro*.

40 A. El cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos normales (mujer-68; p2) se trató durante 24 h, 48 h y 72 h con 10 ng/ml y 100 ng/ml de BMP6.

B. Cultivos de melanocitos epidérmicos humanos normales (i) mujer-68; p4 y (ii) mujer-42; las p3 se trataron 72 h con 10 ng/ml y 100 ng/ml de BMP6. La citotoxicidad se evaluó por muerte celular y el cambio citopatológico en la morfología. No se observan efectos citotóxicos.

45 - Las figuras 2 A y B muestran los resultados de la detección de la expresión de proteínas BMP6 y ALK6 en melanocitos epidérmicos humanos normales.

A. Doble inmunomarcage para (i) BMP6 (verde); (ii) tirosinasa (rojo) y (iii) imagen combinada de BMP6 y tirosinasa, confirmando la expresión de la proteína BMP6 en melanocitos epidérmicos humanos (F39-MC). (iv) muestra la imagen de campo brillante correspondiente.

50 B. Doble inmunomarcage para (i) BMP6 (verde), (ii) ALK6 (rojo) y (iii) que muestra la colocalización de BMP6 y ALK6 (amarillo) en melanocitos epidérmicos humanos (F39-MC). (iv) muestra la imagen de campo brillante correspondiente.

- Las figuras 3 A y B muestran los resultados del análisis cuantitativo de la transferencia de melanosoma estimulada por BMP6 dependiente de la dosis en el cultivo epidérmico conjunto de melanocitos-queratinocitos.

5 A. Se realizó doble inmunofluorescencia en cultivos conjuntos de melanocitos y queratinocitos (F39 MC-KC) estimulados con concentraciones crecientes de BMP-6 durante 24 h (1, 10, 50, 100 y 500 ng/ml). El doble inmunomarcaje con anticuerpo anti-gp100 (verde) y anticuerpo anti-citoqueratina (rojo) mostró un marcado aumento dependiente de la dosis en el número de manchas fluorescentes transferidas a queratinocitos. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

10 B. Cuantificación de melanosomas transferidos en cinco campos microscópicos seleccionados al azar (total de 20 células por campo) para cada uno de los diferentes grupos de tratamiento. Los valores se expresaron en aumento en porcentaje en el número de manchas positivas a gp100 por queratinocito en comparación con los niveles de referencia no estimulados. Los promedios son \pm SEM de tres experimentos independientes con * = P <0,05, ** = P <0,01, y *** = P <0,001.

15 - Las figuras 4 A y B muestran el resultado y el experimento para determinar si BMP6 aumenta la expresión de Cdc42 y ALK6 (el receptor de BMP6) en melanocitos epidérmicos. Análisis por RT-PCR de la expresión del ARNm de Cdc42 en cultivos de melanocitos epidérmicos humanos normales (mujer 39 años-MC).

A. 100 ng/ml de tratamiento con BMP6 para los tiempos indicados.

B. Tratamiento con BMP6 durante 2 h con las dosis indicadas. El ARNm de Cdc42 se detectó por RT-PCR. Se utilizó GAPDH como patrón interno para una carga comparable.

20 C. Los cultivos de melanocitos epidérmicos humanos normales (mujer 42 años-EM) se trataron durante 12 h con o sin 100 ng/ml de BMP6. Inmunomarcaje para ALK6 (verde) y que muestra un aumento en la expresión de ALK6 bajo la influencia de (ii) BMP6 en comparación con (i) patrón sin tratar. Imagen de campo brillante correspondiente (cuadro inferior).

Las figuras 5 A y B, y el suplemento-1 muestran los resultados de un experimento que demuestra que la inducción de la expresión de Cdc42 aumenta la formación de filopodios dorsales y la transferencia de melanosomas.

25 A. La superficie dorsal de las células FM55 transfectadas con (ii) GFP-Cdc42 humana constitutivamente activa (CA) (61 L) conduce a un aumento masivo en las cantidades de filopodios dorsales y las células transfectadas con (iii) GFP-Cdc42 (15A) humana dominante negativa (DN) inhibió los filopodios dorsales en comparación con los filopodios en presencia (i) de GFP sola. Vista con mayor potencia de la región encuadrada (cuadro inferior). Imágenes de SEM generadas utilizando la emisión de campo SEM (FEI, Quanta 400) a un voltaje de aceleración de 10 keV.

30 B. (Cuadro izquierdo) Se realizó inmunofluorescencia doble en cultivos conjuntos de células FM55 y queratinocitos transfectados. (i) GFP sola en FM55 y queratinocitos (ii) GFP-Cdc42(61L) humana constitutivamente activa (CA) en FM55 y queratinocitos y (iii) cultivos conjuntos de GFP-Cdc42 (15A) humana negativa dominante (ND) en FM55 y queratinocitos. El doble inmunomarcaje con anticuerpo anti-gp100 (verde) y anticuerpo anti-citoqueratina (rojo) puso de manifiesto un claro aumento en el número de manchas fluorescentes transferidas a los queratinocitos en presencia de diferentes montajes. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

35 B. (Cuadro derecho) Cuantificación de melanosomas transferidos en cinco campos microscópicos seleccionados al azar (total 20 células por campo) para cada uno de los diferentes grupos de tratamiento. Los valores se expresaron como un aumento en porcentaje en el número de manchas positivas a gp100 por queratinocito en comparación con los niveles de referencia no estimulados. Los promedios son \pm SEM de tres experimentos independientes con, *** P <0,001.

Suplemento 1: La selección de células FM55 transfectadas se confirmó mediante la expresión de GFP (verde). Para confirmar la identidad melanocítica, las células transfectadas se inmunomarcaron con anti-HMB-45/gp100 específico de melanocitos (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

45 - Las figuras 6 A y B muestran los resultados de un experimento que demuestra la inhibición de la transferencia de melanosomas inducida por BMP6 utilizando un antagonista selectivo de BMP6 (Esclerostina)

50 A. Se realizó doble inmunofluorescencia en cultivos conjuntos de melanocitos y queratinocitos emparejados (mujer 36 años MC-KC) en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, Esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 24 h. El doble inmunomarcaje con anticuerpo anti-gp100 (verde) y anticuerpo anti-citoqueratina (rojo) puso de manifiesto un claro aumento en el número de manchas fluorescentes transferidas a los queratinocitos en presencia de BMP6 en comparación con los niveles iniciales, que disminuyó notablemente cuando el antagonista selectivo esclerostina se añadió al cultivo conjunto. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

B. Cuantificación de melanosomas transferidos en cinco campos microscópicos seleccionados al azar (total de 20 células por campo) para cada uno de los diferentes grupos de tratamiento. Los valores se expresaron en aumento

de porcentaje en el número de manchas positivas a gp100 por queratinocito en comparación con los niveles de referencia no estimulados. Los promedios son \pm SEM de tres experimentos independientes con ** P <0,01, *** P <0,001.

5 - Las figuras 7 A y B muestran los resultados de un experimento que demuestra la inhibición de la expresión del receptor Cdc42 y ALK6 inducida por BMP6 utilizando un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina)

A. Análisis por RT-PCR de la expresión del ARNm de Cdc42:

10 Melanocitos epidérmicos humanos normales (Mujer 42 años-EM) cultivados en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 2 h. El ARNm de Cdc42 se detectó por RT-PCR y se usó GAPDH como patrón interno para una carga comparable.

15 B. Cultivos de melanocitos epidérmicos humanos normales (Mujer 42 años-EM) en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 12 h. Inmunomarcaje para ALK6 (verde) y que muestra la inhibición de la expresión de ALK6 inducida por BMP6 bajo la influencia de esclerostina. Imagen de campo brillante correspondiente (cuadro inferior).

20 - La figura 8 muestra los resultados de un experimento que demuestra la inhibición de la formación de filopodios inducida por BMP6 utilizando un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina). Melanocitos epidérmicos humanos normales (Mujer 42 años-EM) cultivados en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 72 h. Imágenes SEM generadas utilizando la emisión de campo SEM (FEI, Quanta 400) a un voltaje acelerador de 10 keV.

- Las figuras 9 A, B y C muestran los resultados de un experimento que demuestra el efecto de BMP6 sobre la melanogénesis epidérmica humana, la actividad de tirosinasa y la expresión de tirosinasa a concentraciones de ARNm y proteínas.

25 A. Se trataron melanocitos epidérmicos humanos normales (F62; p4) en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin la adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 72 h. Las células mostraron cambios visibles en las concentraciones de melanina después del tratamiento con diferentes fármacos. El contenido de melanina se determinó por espectrofotometría (475 nm) después de la disolución con hidróxido de sodio. Los resultados se expresaron como el cambio en el contenido de melanina (pg/célula) en comparación con las concentraciones de referencia sin estimular. Las medias son \pm SEM de 3 experimentos independientes con *P <0,05, ** P <0,01.

B. Se trataron melanocitos epidérmicos humanos normales (mujeres 62 años; p4) en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 72 h.

35 (Cuadro inferior) Se electrotransfirieron extractos de proteínas y las membranas se tiñeron con L-DOPA para la estimación de la actividad de la tirosinasa.

(Cuadro superior) La exploración densitométrica de las intensidades de banda y los valores se expresaron como un aumento del número de veces en comparación con los niveles de referencia no estimulados. Las medias son \pm SEM de 3 experimentos independientes con **P <0,01.

40 C. Se trataron melanocitos epidérmicos humanos normales (mujer 62 años; p4) en presencia o ausencia de BMP6 humana biotecnológica (100 ng/ml) con o sin adición de su antagonista selectivo, esclerostina humana biotecnológica (400 ng/ml) durante 72 h.

Cuadro superior: Se detectó ARNm de tirosinasa por RT-PCR y se usó GAPDH como patrón interno para una carga comparable.

45 Cuadro inferior: La proteína tirosinasa se detectó por transferencia Western y se utilizó actina como patrón interno para una carga comparable.

Introducción

50 Durante los estudios sobre la biología de la transferencia de melanina, los presentes inventores investigaron la posible función de un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en este proceso. En esta solicitud se describe un nuevo mecanismo que controla la transferencia de melanina de melanocitos cutáneos humanos a queratinocitos cutáneos humanos. Esto implica la acción de BMP6, que puede estimular este proceso en función de la dosis. Además, la adición de un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina) inhibió la transferencia de melanosomas inducida por BMP6, y bloquea la producción de nanotúbulos (llamados filopodios) inducida por BMP6 como se demuestra por análisis microscópico electrónico de barrido de melanocitos humanos. La disección del mecanismo molecular por el cual BMP6 induce la formación de filopodios, se encontró que BMP6 estimula la

expresión de Cdc42 (ciclo de división celular 42) en función de la dosis en melanocitos humanos utilizando análisis de transcriptasa inversa. Los requisitos de Cdc42 en la formación de filopodios y la transferencia de melanosomas en melanocitos se verificaron utilizando el análisis del SEM de células FM55 con Cdc42 transfectado constitutivamente activo (CA) y Cdc42 dominante negativo. CA-Cdc42 induce la formación de filopodios dorsales, mientras que DN-Cdc42 suprime los filopodios dorsales.

Está previsto que BMP6 se sintetice como molécula precursora que se escinde para dar un polipéptido maduro de 132 aminoácidos con un peso molecular calculado de aproximadamente 15 Kd. BMP6 (precursora) es una proteína de 57 kD, 513 aminoácidos de longitud, localizada en el cromosoma 6p24 en seres humanos. La forma madura de BMP6 contiene tres puntos posibles de glucosilación unidos por N por cadena polipeptídica. La molécula de proteína BMP-6 activa es probablemente un dímero. La transformación de BMP6 en la forma madura implica la dimerización y eliminación de la región N-terminal de una manera análoga a la transformación de la proteína TGFβ relacionada (Gentry *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8: 4162 (1988)). El precursor BMP6 humano se proporciona en la base de datos del GenBank (número de ingreso-P22004) y se integra en UniprotKB/Swiss-Prot (véase la SEC ID n°: 1). Se cree que el polipéptido maduro incluye los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. n°: 1. Otros polipéptidos de BMP-6 activos incluyen los polipéptidos que contienen los aminoácidos 382-513, 388-513 y 412-513 de la SEQ. ID. n°: 1.

Las BMP funcionan mediante la unión a un "complejo receptor" que se encuentra en la superficie de casi todas las células normales y está compuesto de receptores de tipo I y tipo II. BMPR-I, cuando está presente como monómero, se une a BMP con baja afinidad. Sin embargo, cuando BMPR-I y BMPR-II están presentes como heterodímero, su afinidad por BMP aumenta sustancialmente (Hogan 1996). Una vez segregados, los dímeros de BMP inician la señalización al unirse cooperativamente a ambos receptores tipo I y tipo II. Cada monómero de BMP6 puede conectarse a los receptores tipo I y tipo II. Por lo tanto, el montaje del "complejo receptor tetramérico es esencial para transducir la señal en la célula".

Los receptores de tipo II son cinasas constitutivamente activas, que transfosforilan los receptores de tipo I tras la unión del ligando. Sin embargo, los receptores de tipo I activan los sustratos intracelulares por fosforilación y, por lo tanto, determinan la especificidad de las señales intracelulares. Las BMP incluida BMP6 se pueden unir a 2 receptores de tipo I que incluyen BMPR-IA (ALK-3; Seq ID 4), y BMPR-IB (ALK6; Seq ID 2). Si bien BMPR-IA y BMP-IB son estructuralmente similares, muestran distintos patrones de expresión espacial y temporal.

También se ha observado que BMP6 indujo la expresión de su propio receptor afín, ALK6 (número de ingreso 000238). Una esclerostina antagonista de BMP6 selectiva inhibió esta expresión de ALK6 inducida por BMP6 junto con la expresión de Cdc42 en melanocitos, lo que sugiere que Cdc42 participa en un posible bucle de amplificación para la señalización de BMP6. En conjunto, estas observaciones sugieren que la señal de Cdc42 que emana de los receptores BMP de melanocitos está involucrada en la formación de filopodios para controlar la transferencia de melanosomas a queratinocitos.

La secuencia de aminoácidos de esclerostina (SOST) se proporciona en la base de datos del GenBank (número de ingreso-Q9BQB4) y se integra en UniprotKB/Swiss-Prot. (véase la SEQ ID n°: 3). La región C-terminal de SOST (aminoácidos 169-203 de la SEC ID n°: 3) desempeña una función en la dimerización de SOST. La región N-terminal de SOST (aminoácidos 23-58 de la SEC ID n°: 3) interactúa con los puntos de unión de receptores tipo I y tipo II en BMP6, y una parte de la región central (aminoácidos 134-166 de la SEC ID n°: 3) puede interactuar con el punto de unión del receptor tipo II, de modo que los anticuerpos específicos para estas regiones SOST puede bloquear o alterar la unión de BMP a SOST.

Por último, también se ha demostrado que BMP6 puede provocar melanogénesis al estimular la expresión y la actividad de la enzima limitante de la velocidad (tirosinasa) en melanocitos.

En esta solicitud, se ha demostrado por primera vez que BMP6 puede controlar la transferencia de melanina entre melanocitos y queratinocitos, y posiblemente de queratinocitos a queratinocitos. Esto ocurre, al menos en parte, mediante la acción de Cdc42. Los antagonistas de BMP y las moléculas basadas en su estructura y acción se pueden utilizar como nuevos reguladores de la pigmentación de la piel y el cabello de los mamíferos.

Materiales y métodos

Cultivo celular: Aislamiento y cultivo de queratinocitos epidérmicos y melanocitos epidérmicos emparejados

Se obtuvo piel del abdomen humano con consentimiento informado y la aprobación del comité de ética de investigación local de donantes caucásicos sanos normales con foto tipo II de piel (mujeres de 68 años, 39 años, 36 años) y foto tipo VI de piel (mujer de 42 años) después de una cirugía plástica programada.

Todos los reactivos de cultivo celular se adquirieron en Invitrogen Ltd. (Paisley, Escocia) a menos que se indique otra cosa. Se recogieron muestras de piel en medio RPMI 1640 y se procesaron en 5 h de cirugía. Se crearon cultivos de melanocitos epidérmicos como se describió anteriormente (Kausar *et al.*, 2003) y se cultivaron en una mezcla de K-SFM y medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) enriquecido con FBS al 1%, 1 x mezcla concentrada de aminoácidos no esenciales, penicilina (100 U/ml)/estreptomina (100 µg/ml), L-glutamina 2 mM, 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y 5 ng/ml de endotelina-1 (Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido). Se

crearon queratinocitos epidérmicos completamente emparejados (es decir, de la misma muestra de piel) como se describió anteriormente (Kausser *et al.*, 2003) y se cultivaron en medio sin suero de queratinocitos (K-SFM) enriquecido con 25 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE), 0,2 ng/ml de rEGF, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) y L-glutamina 2 mM. El medio de cultivo se reponía cada dos días. Los cultivos primarios de queratinocitos y melanocitos se identificaron utilizando un anticuerpo anti-citoqueratina (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo NK1/beteb específico de melanocitos (Monosan, Uden, Holanda) contra gp100 respectivamente.

Para los estudios de cultivo conjunto, se sembraron melanocitos (paso 4) y queratinocitos (paso 2) en portaobjetos con cámara Lab-Tek® de 8 pocillos (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, EE. UU.) a una densidad celular de 1×10^4 células./pocillo y en una proporción de 1 melanocito a 10 queratinocitos. Los cultivos conjuntos se mantuvieron durante la noche (16 h) en una mezcla de K-SFM y MEM (medio de cultivo conjunto) para permitir la unión celular, seguido de reposición del medio durante otras 24 h.

Los cultivos conjuntos se incubaron durante 16 h en medio carente de suero (es decir, sin suero de ternera fetal y extracto de hipófisis bovina) para eliminar las fuentes exógenas de factores de crecimiento, antes de evaluar los efectos de 100 ng/ml de BMP-6 humana biotecnológica (R & D System, Oxfordshire, Reino Unido) y 400 ng/ml de esclerostina humana biotecnológica (R & D System, Oxfordshire, Reino Unido) durante 24 h.

Evaluación de las dosis de BMP-6:

Se sembraron melanocitos epidérmicos (MC) y queratinocitos epidérmicos (KC) en placas de 6 pocillos en medio de melanocitos MEM completo y de queratinocitos K-SFM enriquecidos con suero durante 24 h. Las células se cambiaron a medio sin suero (denominado sin nutrientes) enriquecido con 10 ng/ml y 100 ng/ml de BMP-6 durante 24 h, 48 h y 72 h. La citotoxicidad se evaluó por la muerte celular y el cambio citopatológico en la morfología.

Se sembraron aproximadamente 1×10^4 MC en cada pocillo de un portaobjetos con cámara de 8 pocillos Lab-tek® y se dejaron que se fijaran durante 24 h. Las células se lavaron a continuación 3 veces con PBS estéril y se enriquecieron con 350 µl de medio de melanocitos sin suero privado de nutrientes y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 24 h. Las células se lavaron tres veces a continuación con PBS estéril y se incubaron con o sin 100 ng/ml de BMP-6 durante 12 h. A continuación, las células se lavaron 3 veces suavemente con PBS estéril y se fijaron en metanol enfriado con hielo durante 10 minutos a -20°C. Los portaobjetos se almacenaron a -20°C hasta que se realizó la inmunocitoquímica.

Análisis de transferencia Western:

Se tripsinizaron MC en un matraz T225 confluyente y se sembraron en un matraz T225 con medio lleno y se dejaron fijar durante la noche. 24 h antes del tratamiento, el medio se reemplazó por medio sin nutrientes durante 24 h. Las células se lavaron 3 veces con PBS estéril y se incubaron en medio sin nutrientes solo o con 100 ng/ml de BMP-6 durante diferentes períodos de tiempo (1-24 h). En un experimento diferente, las células se trataron durante 12 h con diferente concentración de BMP-6.

Se sometieron a electroforesis 40 mg de proteína total de cada extracto celular en la reducción reducir SDS-8%-PAGE y se transfirieron en membranas de PVDF (Millipore Corporation, Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con PBS en leche al 5%/Tween-20 al 0,075% durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se sondaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. La escala de peso molecular (Magik Marker, Invitrogen) se incubó en PBS en leche al 5%/Tween-20 al 0,075% y las tiras de membrana se incubaron con 1 ml de PBS con 5% de leche/Tween-20 al 0,075% (referencia negativa) o 1 ml de anti-tirosinasa de conejo (anticuerpo policlonal 1:200 PBS en 5% de leche/Tween 20 al 0,075%) y 1 ml de anti-actina de cabra (1:1000 de anticuerpo policlonal en PBS en leche al 5%/Tween 20 al 0,075%) en una plataforma oscilante durante la noche a 4°C. Después de exhaustivos lavados, las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peróxidos de rábano picante durante 2 h. La escala de peso molecular se incubó luego con 1 ml de HRP- anti-IgG humana de cabra (H + L) (Zymed, EE. UU.) (1:500) diluida en PBS en lecheal 5%/Tween-20 al 0,075% y se incubaron las tiras de membrana en 1 ml de anti-IgG de conejo, anticuerpo completo unido a peroxidasa de rábano picante (HRP) anticuerpo secundario (Amersham Biosciences, Reino Unido) (1:700 diluido en PBS en leche al 5%/Tween-20 al 0,075%) en una plataforma oscilante durante 2 horas a temperatura ambiente. El procedimiento de lavado se repitió y las tiras de membrana se incubaron en reactivo LumiGLO® y peróxido (BioLab Ltd, Reino Unido) durante 2 minutos a temperatura ambiente. La señal de quimioluminiscencia se detectó al exponer las tiras de transferencia a la película de rayos X Kodak XRA (Kodak, Reino Unido) a diferentes tiempos de exposición, seguido de revelado en la solución de revelado (Kodak, Reino Unido) hasta que aparecieron las bandas, se enjuagó con agua del grifo, se fijó en el fijador (Kodak, Reino Unido) hasta que la película se volvió azul, luego se enjuagó con agua del grifo y se dejó secar. Luego se marcó la membrana y se exploró para el análisis densitométrico para la evaluación semicuantitativa de los niveles de expresión de proteínas utilizando un programa informático de análisis (Image Master Total Lab versión 1.11).

Tinción de inmunofluorescencia:

Las células fijadas en metanol enfriado con hielo se lavaron en PBS y luego se bloquearon con suero de asno al

10% para la detección de la expresión de proteínas. Para los experimentos de doble marcaje, el primer anticuerpo primario, ya sea BMP-6 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), BMPR-IB/ALK-6 (R & D Systems, Oxfordshire, Reino Unido) o NKi/beteb (1:30) (Monosan, Uden, Holanda) se aplicó durante la noche a 4°C, seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado con FITC (1: 00) durante 1 hora a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo primario, ya sea citoqueratina (1:100) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) o β -actina (1:100) (Santa Cruz, EE. UU.) se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (1:100) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, EE. UU.). Se usó DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para teñir los núcleos. Se tomaron imágenes con una cámara digital Hamamatsu enfriada que utiliza un objetivo de 100 × o 40 × y se procesaron posteriormente con Paint Shop Pro (Jasc Software Ver. 7. CA, EE. UU.). Las referencias negativas incluyeron la omisión del anticuerpo primario y el reemplazo con suero no inmune del huésped del anticuerpo secundario e inclusión de anticuerpos secundarios.

Análisis cuantitativo de transferencia de melanosomas:

Se estimularon cultivos conjuntos de melanocitos-queratinocitos emparejados con diferentes dosis de BMP-6 y se compararon con células no estimuladas. La evaluación de la transferencia de melanosomas se realizó contando las manchas fluorescentes positivas a gp100 en los queratinocitos receptores en 5 campos microscópicos aleatorios por pocillo a 100 aumentos (inmersión en aceite) en 3 experimentos independientes. Para evitar el recuento de gránulos de melanina que aún pueden estar asociados a melanocitos, solo se contaron las manchas positivas a gp100 dentro de los queratinocitos que no estaban en contacto directo con los melanocitos.

Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)

El ARN completo se obtuvo a partir de 1×10^6 melanocitos tratados con 1, 10, 50, 100 y 500 ng/ml de BMP6 durante 4 horas o 100 ng/ml de BMP6 durante el período de tiempo indicado (FIG. 4A). Para algunos experimentos, los melanocitos también se trataron con o sin 400 ng/ml de esclerostina, ya sea en presencia o en ausencia de 100 ng/ml de BMP6. Las muestras de ARN se trataron con desoxirribonucleasa (QIAGEN, Reino Unido), seguido de la determinación de la concentración. Luego, se utilizó una síntesis de la primera cadena de Superscript III para el equipo de transcripción inversa (Invitrogen, California) para sintetizar la primera cadena de ADNc. La concentración final de ARN en la reacción fue de 1 μ g/100 μ l para todas las muestras. La PCR se realizó con el equipo Fast Cycler PCR de QIAGEN (QIAGEN, Reino Unido) en las condiciones descritas por el fabricante. En resumen, se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: 95°C durante 15 minutos (1ª etapa); 96°C durante 15 s; hibridación del cebador durante 15 s (para Cdc 42-65°C, Tirosinasa -58°C y GAPDH-60°C); 72°C durante 25 s (2ª etapa) x 30 ciclos. Los cebadores utilizados para las reacciones de RT-PCR se muestran en la tabla 1 y se adquirieron en Sigma-Genosys, Reino Unido. Los productos de la PCR se separaron sobre gel de agarosa al 1% en 1x amortiguador TAE y se tiñeron con bromuro de etidio. Se usó una escalera de ADN de 1 Kb Plus DNA (Invitrogen, California) como marcador de ADN.

Tabla 1. Cebadores para RT-PCR semicuantitativa

	Gen	Cebador directo	Cebador inverso	Longitud del producto (pb)
1.	Cdc42	GCCCGTGACCT GAAGGCTGTCA	TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA	195
2.	Tirosinasa	CACCCACAAATCCTAAC	CCTACTCTATTGCCTAAGCC	1.600
3.	GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTACA	TTGTTTTGGAGGGATCTCG	160

Transfección

El GFP-Cdc42 humano dominante-negativo (15A) y el GFP-Cdc42 (61 L) constitutivamente activo y GFP en pEGFP-C3 fueron generosas donaciones de Richard E. Cheney (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill). Los vectores incluían el gen de neomicina que confiere resistencia a la geneticina (G418). Aproximadamente 5×10^5 células FM55 moderadamente pigmentadas se cultivaron hasta 70-80% de confluencia en placas de seis pocillos durante 16 h en medio RPMI con 10% de FBS el día antes de la transfección. Se transfectaron células FM55 utilizando el reactivo de transfección Lipfectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.). En resumen, se mezclaron 3,2 μ g de montajes de ADNc con 8 μ l de reactivo de transfección Lipfectamine 2000 en 1,6 ml de medio de suero reducido Opti-MEM. Las células se incubaron con mezcla de transfección durante 12 h, se lavaron tres veces con 1 x PBS, se incubaron en RPMI fresco que contenía FBS al 10% durante 48 h. Las células transfectadas se seleccionaron durante 15 días usando 1,6 mg/ml de G418. A continuación 1×10^4 células transfectadas estables se cultivaron durante 24 h en portaobjetos Lab-Tek® de 8 pocillos en presencia de medio RPMI con FBS al 10%. Después de 24 horas, las células transfectadas de manera estable se fijaron inmediatamente en glutaraldehído al 1% (Sigma, Reino Unido) amortiguado en cacodilato sódico 0,1 M (Agar, Reino Unido) a 37°C para conservar la configuración de la forma (incluidos los filopodios) de células FM55 y se procesaron para el análisis SEM. Células en paralelo en portaobjetos con cámara Lab-Tek® de 8 pocillos se fijaron también en metanol enfriado con hielo

durante 10 min a -20°C , se lavaron en PBS y luego se bloquearon con suero de asno al 10% para estudios de inmunofluorescencia de gp100 para verificar la transfección y selección (Suplemento-1). Para los estudios de cultivo conjunto, se sembraron células FM55 transfectadas de manera estable y queratinocitos (paso 2) en portaobjetos con cámara Lab-Tek® de 8 pocillos a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo y en una proporción de 1 FM55 a 10 queratinocitos. Los cultivos conjuntos se mantuvieron durante la noche (16 h) en una mezcla de K-SFM y MEM (medio de cultivo conjunto) para permitir la unión celular, seguido de la reposición del medio durante otras 24 h. Luego, las células se fijaron a continuación en metanol enfriado con hielo durante 10 min a -20°C , se lavaron en PBS y luego se bloquearon con un 10% de suero de asno para estudios de inmunofluorescencia doble de gp100 y citoqueratina para probar la eficacia de la transferencia de melanosomas.

10 *Evaluación al microscopio electrónico de barrido de la morfología celular*

Los melanocitos epidérmicos tratados con o sin 400 ng/ml de esclerostina en presencia o ausencia de 100 ng/ml de BMP6 durante 72 h y células FM55 transfectadas seleccionadas de manera estable se fijaron con glutaraldehído al 1% (Sigma, Reino Unido) amortiguado en cacodilato de sodio 0,1 M (Agar, Reino Unido) a 37°C . Las células se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% (Agar, Reino Unido) y ácido tánico al 1% (Agar, Reino Unido) utilizado como mordiente, se deshidrataron mediante una serie de alcoholes del 20% al 70%, se tiñeron en acetato de uranilo al 0,5%, seguido de una deshidratación más en alcohol al 90% y 100%. La deshidratación final fue en hexametil-disilazano (Sigma, Reino Unido), seguido de secado al aire. Una vez secas, las muestras se recubrieron con oro en un pulverizador de oro (EMITECH, K550) (Blazer 20 mA) durante 10 minutos. Las muestras se observaron bajo emisión de campo SEM (FEI, Quanta 400) a un voltaje acelerador de 10 keV.

20 *Análisis de melanina*

Se prepararon 500 $\mu\text{g/ml}$ de melanina sintética (Sigma, Reino Unido) en hidróxido de sodio 1 M (NaOH) (BOH Ltd, Reino Unido) y se disolvieron en un baño de agua con ultrasonidos durante 20 minutos. A partir de esta solución madre, se prepararon varios patrones de melanina en NaOH 1 M desde 100 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. Los patrones de melanina se pipetearon en una placa de 96 pocillos para producir una curva de calibración para la evaluación del contenido de melanina en las muestras de prueba. Se añadieron 400 μl de NaOH 1 M a cada sedimento celular y se disolvieron en un bloque térmico (100°C) durante 15 minutos. Los sedimentos se agitaron vigorosamente y el sedimento disuelto se pipeteó en la misma placa de 96 pocillos. Las densidades ópticas de la muestra se leyeron a 495 nm en un programa DYNEX REVELATION 4.02. El contenido de melanina de cada muestra de prueba se leyó en la curva de calibración.

30 *Detección de DOPA oxidasa utilizando SDS-PAGE no desnaturalizante para la evaluación de la actividad de la tirosinasa*

Aproximadamente 1×10^6 de melanocitos epidérmicos, se sembraron en tres matraces T75 y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante la noche. Las células se prepararon para SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se pipetearon 70 μg de extracto de proteína sin reducir sin hervir en los pocillos apropiados de geles de SDS-PAGE al 8%. La membrana de PVDF que contenía las proteínas separadas se lavó una vez en 1 x PBS y luego se incubó a temperatura ambiente en L-DOPA 5 mM en amortiguador de fosfato de sodio 0,1 M durante 3 horas con tres cambios de la L-DOPA. La reacción de L-DOPA se detuvo lavando la membrana en agua destilada y se exploró la membrana.

Análisis estadístico:

40 Se evaluó la significación estadística entre grupos y el tratamiento utilizando ANOVA de una vía y la prueba posterior de Dunnett utilizando Prism v. 4.00 (Graph Pad Software Chicago, Illinois, EE. UU.). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos: ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

Resultados y discusión

BMP6 (10 y 100 ng/ml) no presenta citotoxicidad para melanocitos y queratinocitos epidérmicos humanos normales

45 Para descartar la posibilidad de que BMP6 sea tóxico para los melanocitos o queratinocitos, las células se mantuvieron en presencia de 10 ng/ml y 100 ng/ml durante 24 h, 48 h y 72 h. Ambas dosis de BMP6 no están asociadas con el crecimiento celular alterado o la morfología de los melanocitos y los queratinocitos (Fig. 1A, 1B).

Los melanocitos epidérmicos humanos normales expresan la proteína BMP6 y el receptor ALK6

50 La expresión de BMP6 en melanocitos humanos normales se confirmó por doble inmunomarcaje (amarillo-naranja, Aiii) de anti-BMP6 (verde, Ai) con anticuerpo anti-tirosinasa (rojo, Aii) (Figura 2A). El doble inmunomarcaje de melanocitos con anticuerpos anti-BMP6 (verde, Bi) y anti-ALK6 (Rojo, Bii) puso de manifiesto la localización conjunta de BMP6 y ALK6 (amarillo, Biii) en toda la célula (Figura 2B).

Análisis cuantitativo de la transferencia de melanosoma estimulada por BMP6 dependiente de la dosis

Los receptores ALK6 son funcionales, ya que el tratamiento con BMP6 en el cultivo conjunto de melanocitos-

queratinocitos conduce a la estimulación de la transferencia de melanosomas de melanocitos a queratinocitos en función de la dosis (Figura 3 A, B). Por lo tanto, este es el primer informe de un efecto de BMP6 sobre la transferencia de melanosomas en el sistema de cultivo conjunto de melanocitos-queratinocitos. Tanto los efectos autocrinos como los paracrinos pueden estar involucrados.

5 *BMP6 incrementa la expresión del mensaje de Cdc42 en melanocitos epidérmicos humanos*

Para comprender mejor las funciones mecánicas de BMP6 en la transferencia de melanosomas, los inventores investigaron la expresión de Cdc42; un regulador maestro de la formación de filopodios en melanocitos humanos (Scott *et al.*, 2002). El análisis por RT-PCR indicó que la inducción máxima de Cdc42 después del tratamiento con 100 ng/ml de BMP6 ocurrió de 2 a 4 horas y luego se redujo ligeramente pero continuó elevada durante 12 horas, en comparación con la expresión de nivel basal del ARNm de Cdc42 en la referencia sin tratar (FIG. 4 A). La inducción de ARNm de Cdc42 por BMP6 se produjo en función de la dosis (Figura 4B). BMP6 también estimuló la expresión del receptor de BMP6 ALK6 (verde Figura 4C ii) en comparación con el nivel basal normal de expresión de ALK6 (Figura C i) en melanocitos epidérmicos humanos normales (Figura 4C).

Requisito de Cdc42 para estimular la transferencia de melanosomas mediante inducción de filopodios dorsales

15 Dos tipos de mutantes de la proteína Rho se han utilizado ampliamente para analizar sus funciones; mutantes activados, que están constitutivamente unidos a GTP debido a que las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) están inhibidas; y mutantes negativos dominantes que actúan al valorar el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Feig 1999). Los inventores han observado que el Cdc42 constitutivamente activo induce filopodios dorsales y que los Cdc42 negativos dominantes suprimen los filopodios dorsales del melanoma humano FM55 cuando se comparan con el vector de referencia (Figura 5 A).

Luego estábamos interesados en determinar si la sobreexpresión de proteínas Cdc42 también puede afectar la transferencia de melanosomas. Para probar la participación de estas proteínas sobreexpresadas en la transferencia de melanina, se utilizaron células FM55 transfectadas para crear los cultivos conjuntos de melanoma FM55 y queratinocitos durante 24 h. El inmunomarcaje de este cultivo conjunto con anticuerpo anti-gp100 (verde) mostró claros cambios en el número de puntos fluorescentes transferidos a los queratinocitos (flecha blanca) (Figura 5B, cuadro izquierdo). El GFP-Cdc42 constitutivamente activo induce la transferencia de melanosomas mientras que el GFP-Cdc42 negativo dominante inhibió la transferencia de melanosomas en comparación con el vector de referencia de GFP (Figura 5B, cuadro derecho). La manipulación de la transferencia de melanosomas por sobreexpresión o inhibición de Cdc42 sugiere además la fuerte implicación de los filopodios en la transferencia de melanosomas. Dado que BMP6 puede incrementar la expresión de Cdc42, esto sugiere que la estimulación de la transferencia de melanosoma asociada a BMP6 puede involucrar a Cdc42 como su objetivo aguas abajo. Para probar esto, los inventores aprovecharon el efecto inhibidor de DN-Cdc42 sobre la formación de filopodios y la transferencia de melanosomas. Esto también puede lograrse de manera similar eliminando la expresión de Cdc42 endógeno de melanocitos humanos utilizando un ARNsi contra Cdc42 humano.

35 *Inhibición de la transferencia de melanosomas inducida por BMP6 usando un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina)*

Para probar si la esclerostina (un antagonista selectivo de BMP6) inhibe o no la transferencia de melanosomas inducida por BMP-6, los inventores probaron este antagonista en el cultivo conjunto de melanocitos y queratinocitos epidérmicos humanos normales. La adición de la propia esclerostina inhibió el nivel basal de la transferencia de melanosomas de melanocitos a queratinocitos (Figura 6 A, B). Además, la esclerostina inhibió la transferencia de melanosomas inducida por BMP6 en el cultivo conjunto epidérmico de queratinocitos de melanocitos y humanos, lo que sugiere que la esclerostina se puede usar como un nuevo regulador de la pigmentación de la piel y el cabello de los mamíferos (Figura 6A, B).

45 *Inhibición de la expresión del receptor de Cdc42 y ALK6 inducida por BMP6 utilizando un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina)*

Los inventores han demostrado por primera vez el papel fisiológico de Cdc42 como regulador de la transferencia de melanosomas de melanocitos a queratinocitos (Figura 5B). La capacidad de la esclerostina para inhibir la transferencia de melanosomas inducida por BMP6 sugirió que la esclerostina podría bloquear la expresión de Cdc42 inducida por BMP6 en melanocitos humanos. Usando el análisis de RT-PCR de melanocitos humanos, los inventores han observado que la esclerostina disminuía la expresión de Cdc42 inducida por BMP6 (Figura 7A). Usando el estudio de inmunofluorescencia, también han observado que la esclerostina disminuía la expresión de ALK6 inducida por BMP6 (verde), un receptor de BMP6 (Figura 7B). Esta observación sugiere que Cdc42 participa en un posible bucle de amplificación para la señalización de BMP6.

Inhibición de la formación de filopodios inducida por BMP6 usando un antagonista selectivo de BMP6 (esclerostina)

El análisis de SEM de los melanocitos muestra la estimulación de numerosos filopodios dorsales por el tratamiento con BMP6 en comparación con la referencia sin tratar (Figura 8iii). Los melanocitos tratados con esclerostina mostraron una reducción en la formación de filopodios dorsales, mientras que las células tratadas con BMP6 no indujeron la formación de filopodios en presencia de esclerostina (Figura 8 ii, iv). Estos datos apoyan firmemente el requisito de BMP6 para la estimulación de la formación de filopodios dorsales en melanocitos humanos.

Junto con la inhibición de la transferencia de melanosomas inducida por BMP6 (Figura 6), la inhibición de la expresión del receptor Cdc42 y ALK6 (Figura 7) y la inhibición de la formación de filopodios (Figura 8) por la esclerostina sugieren que la señal de Cdc42 que emana de los receptores BMP de melanocitos está implicada en la formación de filopodios que controlan la transferencia de melanosomas a queratinocitos.

Efecto de BMP6 en la melanogénesis en melanocitos epidérmicos humanos

BMP6 aumentó el contenido de melanina (aproximadamente $32 \pm 9\%$ después de 72 h) en los melanocitos epidérmicos humanos *in vitro* (Figura 9A). Una esclerostina antagonista de BMP6 selectiva inhibió el contenido de melanina inducida por BMP6 (en un $15 \pm 3\%$), en melanocitos epidérmicos humanos (Figura 9A). La actividad de la tirosinasa (un indicador de la potencial síntesis de melanina) también fue estimulada por BMP6 mientras que la esclerostina inhibió el aumento inducido por BMP6 en la actividad de la tirosinasa (Figura 9B).

Resumen: El estudio de los mecanismos de señalización para la inducción de melanogénesis en melanocitos indicó que los agentes elevadores de cAMP, que actúan a través de la proteína cinasa A, provocaron melanogénesis en melanocitos al aumentar la expresión de tirosinasa (Bertolotto *et al.*, 1998). Más allá de este esquema simplificado, también se demostró que la cascada p38 MAPK está involucrada en la melanogénesis en los melanocitos mediante el tratamiento con MSH, luz UV o esfingolípido placentario humano (Galibert *et al.*, 2001; Smalley y Eisen, 2000; Singh *et al.*, 2005). Recientemente, las BMP también están emergiendo como un potente regulador de la melanogénesis (Botchkarev 2003; Yaar *et al.*, 2006). Se ha descubierto que BMP4 actúa como inhibidor autocrino de melanogénesis en los melanocitos humanos normales al inhibir la expresión y la actividad de la enzima limitante de la velocidad (tirosinasa) en los melanocitos (Yaar *et al.*, 2006). En el estudio, los inventores han descubierto que BMP6 actúa como un estimulador de la melanogénesis al estimular la expresión de la tirosinasa tanto en proteínas como en genes (Figura 9C). Mientras que la esclerostina inhibió la expresión de tirosinasa inducida por BMP6 en melanocitos epidérmicos humanos tanto en proteínas como en genes (Figura 9C).

Listado de secuencias

- 30 <110> Bradford University
- <120> Composiciones y métodos
- <130> P107320.WO
- <150> GB0816507.8
- <151> 10-09-2008
- 35 <150> GB0908498.9
- <151> 18-05-2009
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 513
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 727 627 T3

Met Pro Gly Leu Gly Arg Arg Ala Gln Trp Leu Cys Trp Trp Trp Gly
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Cys Cys Gly Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly
 35 40 45

Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser
 50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro Leu
 85 90 95

His Gly Leu Gln Gln Pro Gln Pro Pro Ala Leu Arg Gln Gln Glu Glu
 100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Pro Arg Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg
 115 120 125

Leu Lys Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Leu Ser
 130 135 140

Ala Asp Asn Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu Gly Glu Arg Gln Gln Ser
 145 150 155 160

ES 2 727 627 T3

Trp Pro His Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gln Arg Arg Gln Pro Pro Pro
165 170 175

Gly Ala Ala His Pro Leu Asn Arg Lys Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ser
180 185 190

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ala Gln Asp Ser Ala Phe
195 200 205

Leu Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu Tyr
210 215 220

Asp Lys Glu Phe Ser Pro Arg Gln Arg His His Lys Glu Phe Lys Phe
225 230 235 240

Asn Leu Ser Gln Ile Pro Glu Gly Glu Val Val Thr Ala Ala Glu Phe
245 250 255

Arg Ile Tyr Lys Asp Cys Val Met Gly Ser Phe Lys Asn Gln Thr Phe
260 265 270

Leu Ile Ser Ile Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Gln His Arg Asp Ser
275 280 285

Asp Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Val Val Trp Ala Ser Glu Glu Gly
290 295 300

Trp Leu Glu Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn Leu Trp Val Val Thr
305 310 315 320

Pro Gln His Asn Met Gly Leu Gln Leu Ser Val Val Thr Arg Asp Gly
325 330 335

Val His Val His Pro Arg Ala Ala Gly Leu Val Gly Arg Asp Gly Pro
340 345 350

Tyr Asp Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Val Ser Glu Val
355 360 365

His Val Arg Thr Thr Arg Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser
370 375 380

Arg Asn Arg Ser Thr Gln Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala
385 390 395 400

Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu

ES 2 727 627 T3

405

410

415

Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala
420 425 430

Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro
435 440 445

Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu
450 455 460

Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro
465 470 475 480

Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn
485 490 495

Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys
500 505 510

His

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
1 5 10 15

Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
20 25 30

Lys Cys His His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser
35 40 45

Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu
50 55 60

Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln
65 70 75 80

Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
85 90 95

Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro

ES 2 727 627 T3

Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
 355 360 365

Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
 370 375 380

Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met
 385 390 395 400

Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser
 405 410 415

Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro
 420 425 430

Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys
 435 440 445

Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg
 450 455 460

Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser
 465 470 475 480

Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu
 485 490 495

Ser Gln Asp Ile Lys Leu
 500

<210> 3

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60

ES 2 727 627 T3

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205

Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 4

<211> 532

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe
1 5 10 15

Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
20 25 30

Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
35 40 45

Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
50 55 60

ES 2 727 627 T3

Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
65 70 75 80

His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
85 90 95

Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
100 105 110

Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
115 120 125

Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
130 135 140

Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Trp Leu Val Leu Leu Ile Ser Met
145 150 155 160

Ala Val Cys Ile Ile Ala Met Ile Ile Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
165 170 175

Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Arg Arg Tyr Asn Arg Asp
180 185 190

Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
195 200 205

Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
210 215 220

Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
225 230 235 240

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
245 250 255

Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
260 265 270

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
275 280 285

Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
290 295 300

Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
305 310 315 320

ES 2 727 627 T3

Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365

Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380

Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Val Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415

Leu Asn Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430

Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445

Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460

Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480

Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495

Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525

Asp Val Lys Ile
 530

REIVINDICACIONES

1. Uso de BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para aumentar la pigmentación de la melanina del cabello de un sujeto.
2. Uso de BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, según la reivindicación 1 en donde la BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, modula la expresión de Cdc42 al modular la actividad de ALK6.
3. Uso de BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el fragmento o variante está codificado por la SEQ. ID. nº: 1, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en o por los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, o por los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, o por los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1.
4. BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para su uso en un método para aumentar la pigmentación de la melanina de la piel de un sujeto.
5. BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, según la reivindicación 4 en donde la BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, modula la expresión de Cdc42 al modular la actividad de ALK6.
6. BMP6, o un fragmento, o una de sus variantes, según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 en donde el fragmento o variante está codificado por la SEQ. ID. nº: 1, o por los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, o por los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, o por los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 o por los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1.
7. Uso de una composición que comprende la esclerostina antagonista de BMP6, proteína cordinioide o relacionada con folistatina (FSRP) para reducir la pigmentación de melanina de la piel y/o del cabello de un sujeto.
8. Una composición que comprende BMP6, o un fragmento o variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina, para utilización en un método de tratamiento de hipopigmentación de la piel para utilizar en un método de tratamiento de vitiligo.
9. Una composición que comprende esclerostina, proteína cordinioide o relacionada con folistatina para su uso en un método para tratar la hiperpigmentación de la piel.
10. Una composición según la reivindicación 9, para su uso en un método de tratamiento de hiperpigmentación posinflamatoria o melasma, cloasma, lentigo senil, lentigo solar o efélides.
11. Un método cosmético de oscurecimiento del color del cabello al aumentar el nivel de pigmentación de la melanina del cabello, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que comprende BMP6, o un fragmento o variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia con BMP6 humana, y donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo del grupo consistente en los aminoácidos 374-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 382-513 de la SEQ. ID. nº: 1, los aminoácidos 388-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y los aminoácidos 412-513 de la SEQ. ID. nº: 1 y en donde dicho fragmento o variante presenta la capacidad para aumentar la melanogénesis o la transferencia de melanina.
12. Un método cosmético de aclaramiento del color de la piel y/o el cabello al reducir el nivel de pigmentación de la piel y/o el cabello por la melanina, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que comprende la esclerostina antagonista de BMP6, la proteína cordinioide o relacionada con la folistatina (FSRP).
13. Uso de una molécula de ARN capaz de interacción complementaria dirigida o interferencia de ARN frente al ARNm que codifica ALK6 o Cdc42 para reducir la pigmentación de la piel y/o el cabello por la melanina de un sujeto.
14. Uso de una molécula de ARN según la reivindicación 13 que tiene la secuencia:

oligorribonucleótidos 5'-GAU AACUCACCACUGUCCATT-3' y 5'-UGGACAGUGGUGAGUUAUUCTT-3'; u oligorribonucleótidos 5'-GACUCCUUUCUUGCUUGUUTT-3' y 5'-ACAAGCAAGAAAGGAGUCTT-3',

para reducir la pigmentación de la piel y/o el cabello por la melanina de un sujeto.

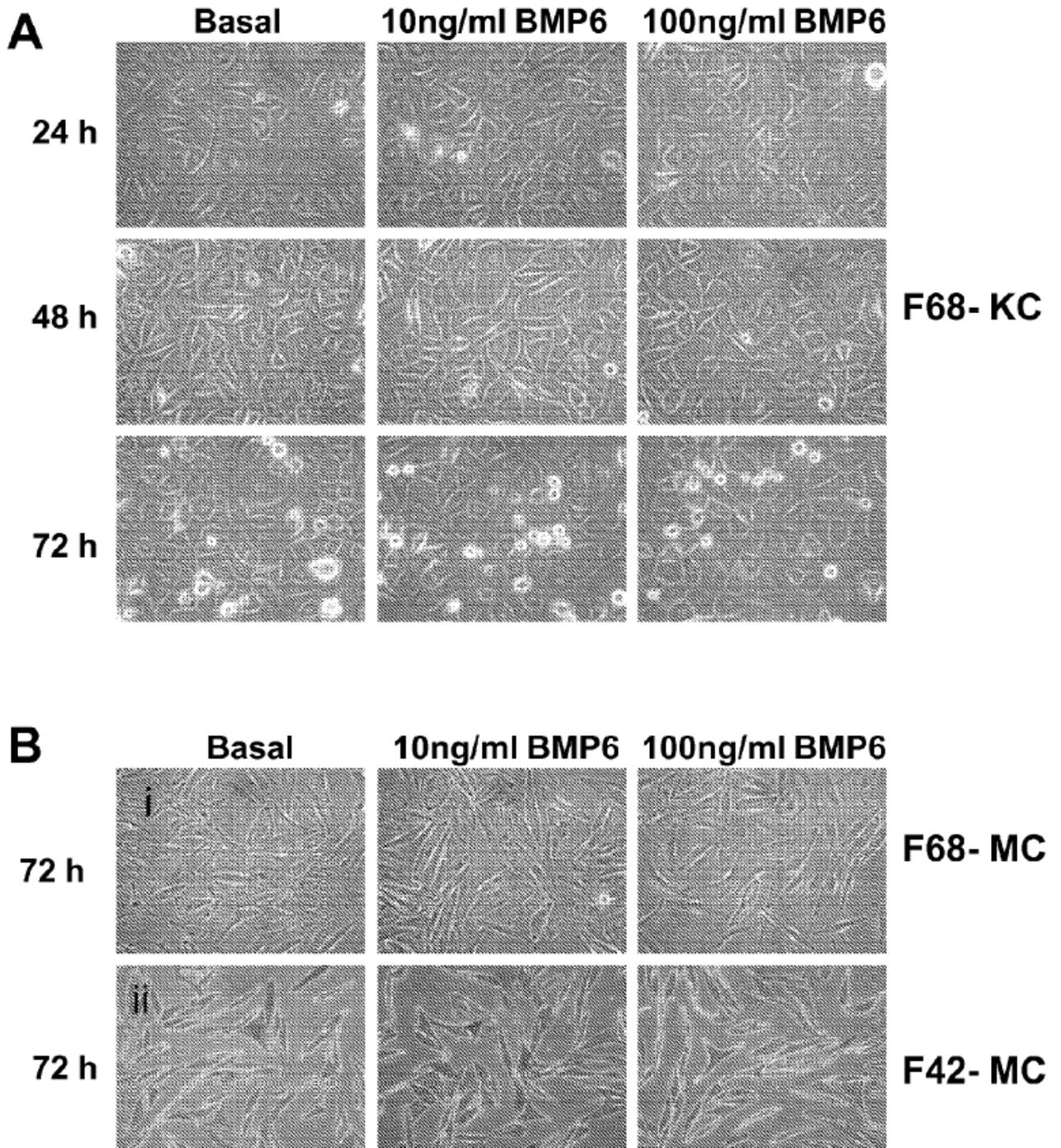


Figura 1

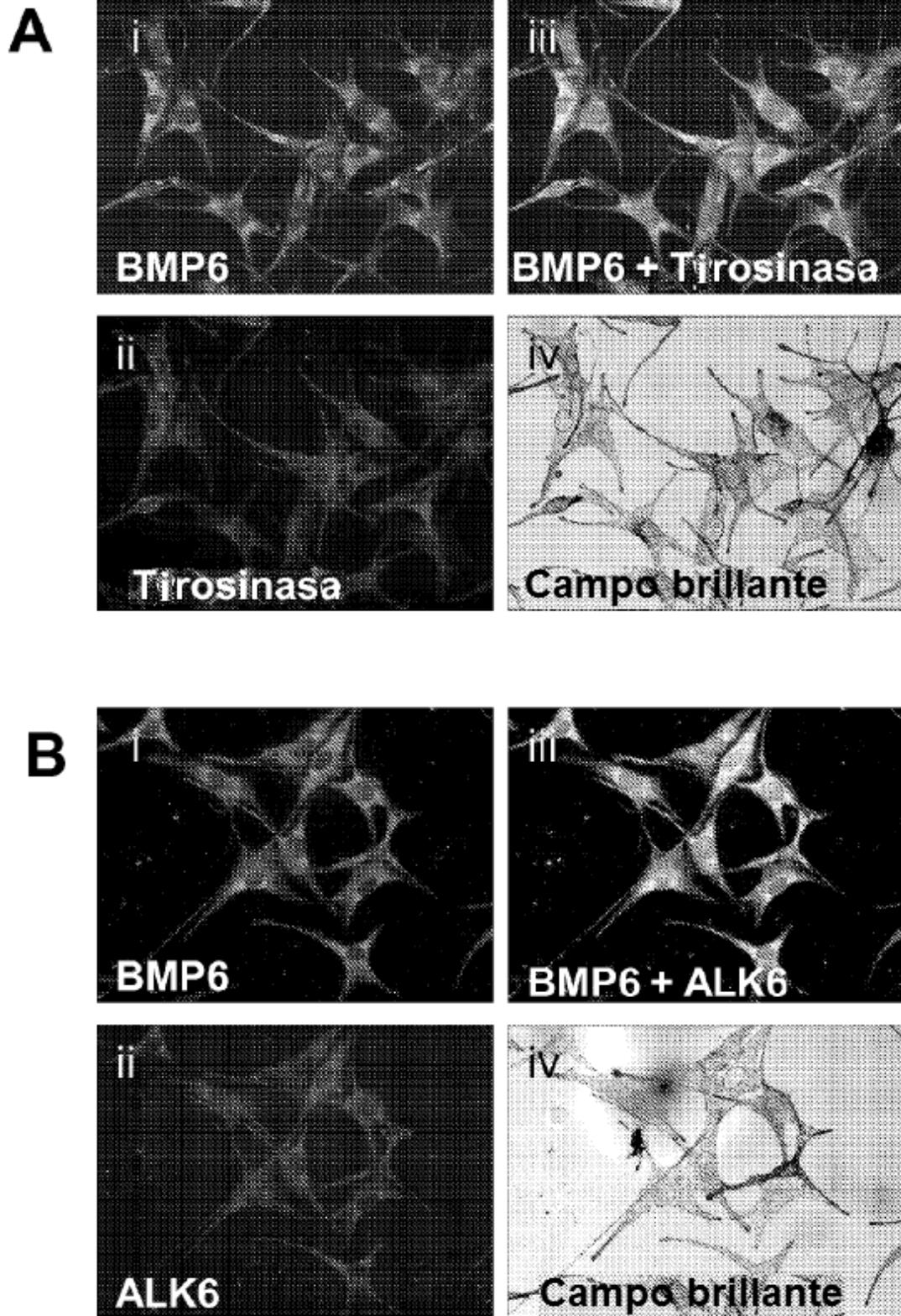
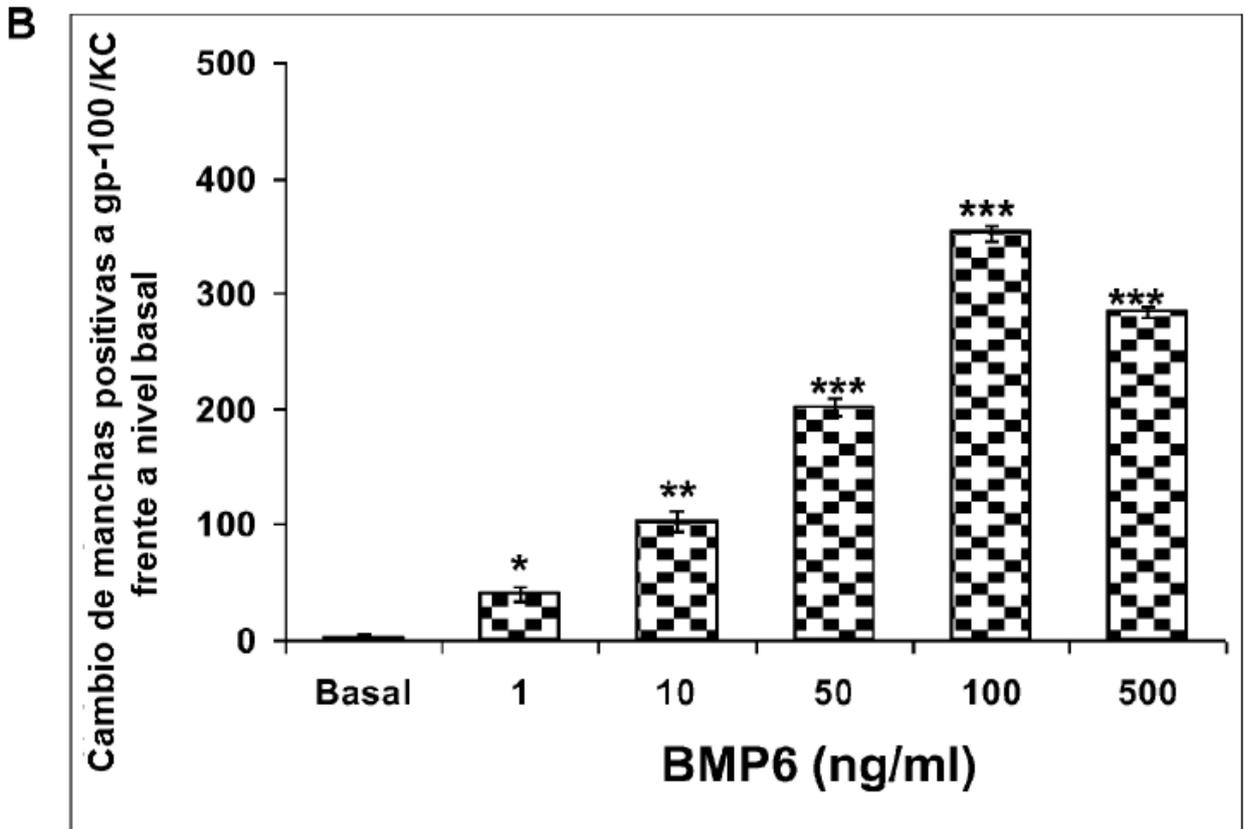
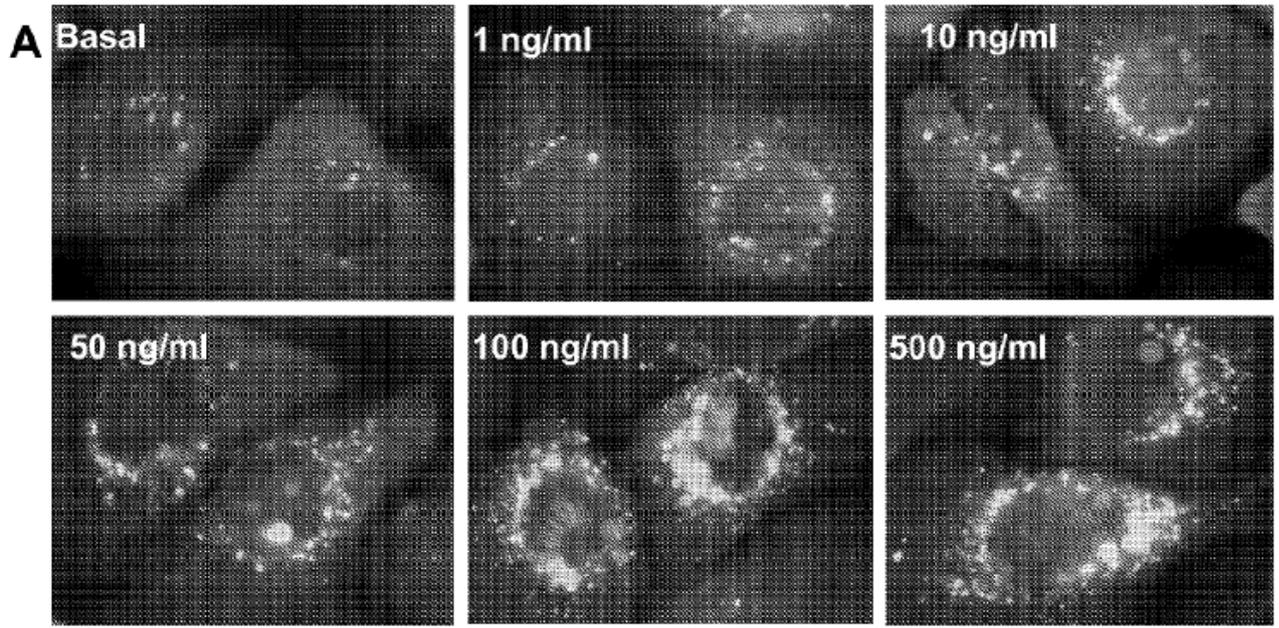


Figura 2



manchas gp100 ⁺ /KC	27,3 ± 1,6	38,4 ± 1,47	55,2 ± 2,8	64,6 ± 2,5	124,2 ± 3,9	105,4 ± 1,6
--------------------------------	---------------	----------------	---------------	---------------	----------------	----------------

Figura 3

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

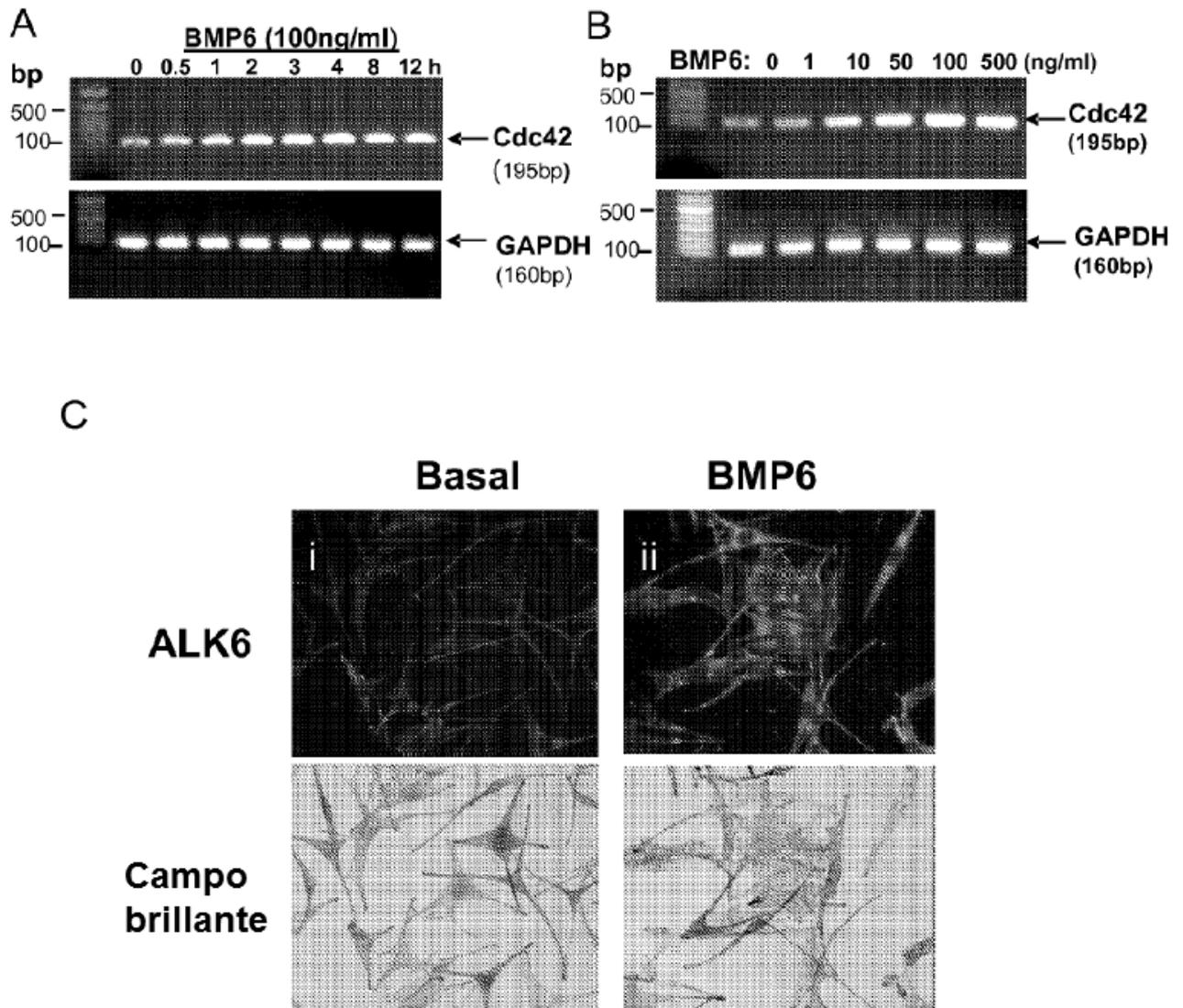
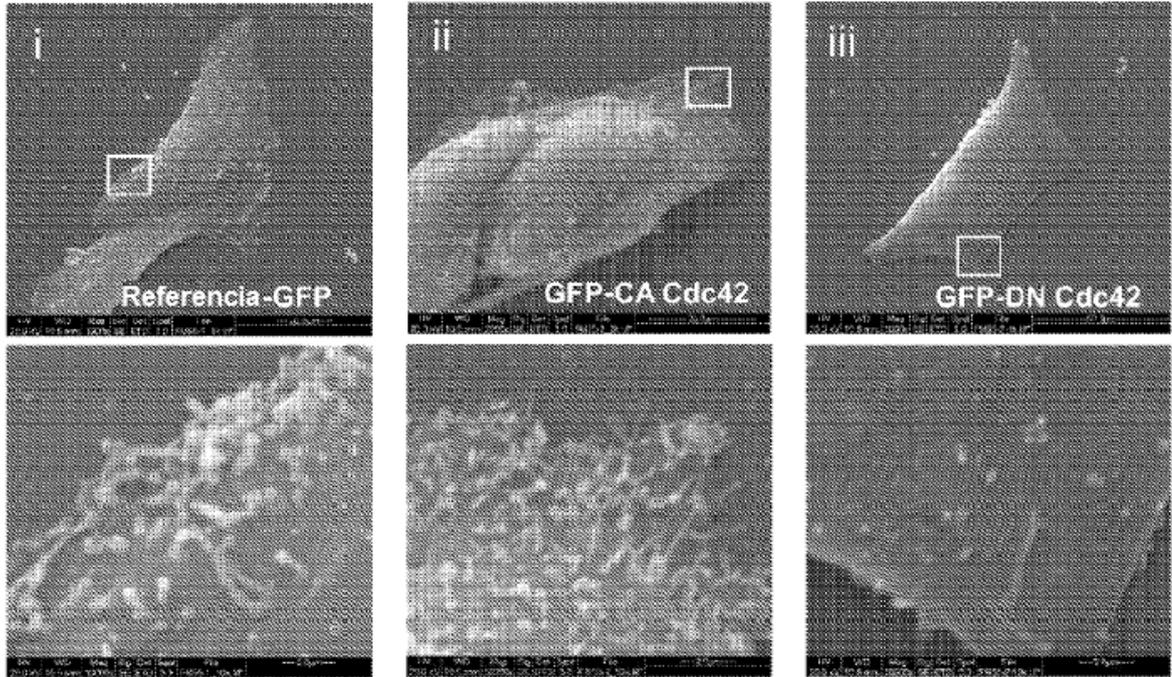
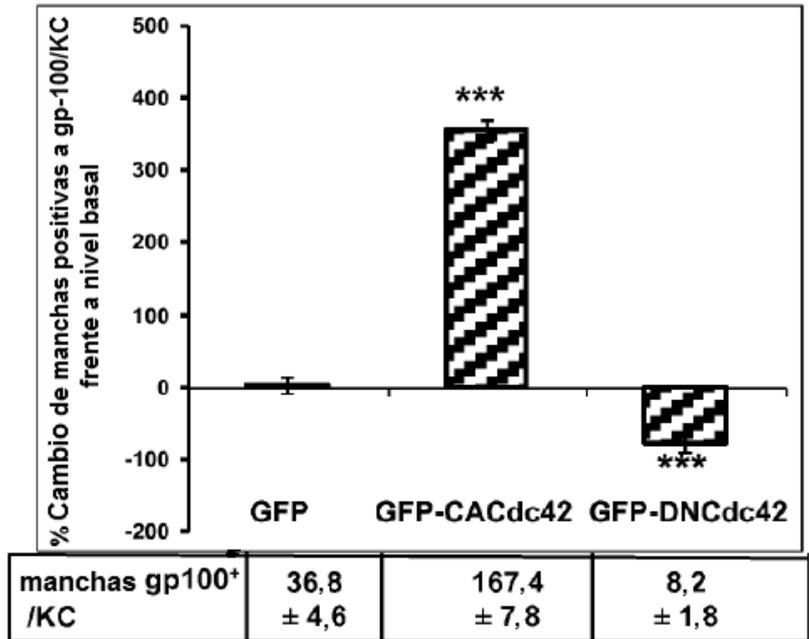
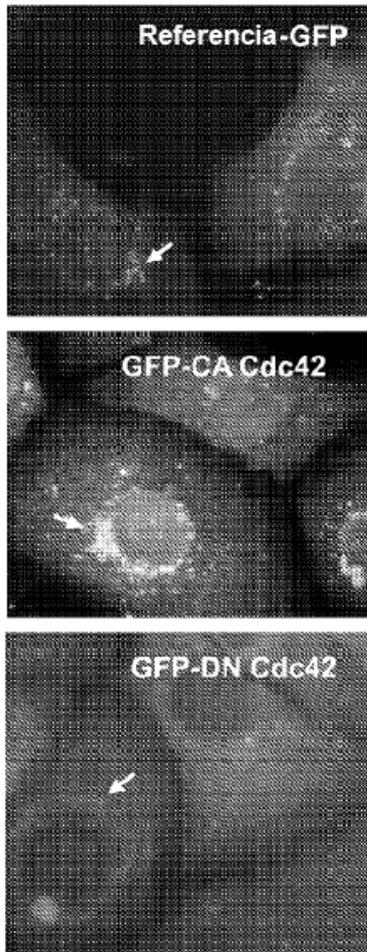


Figura 4

A



B



***P<0,001

Figura 5

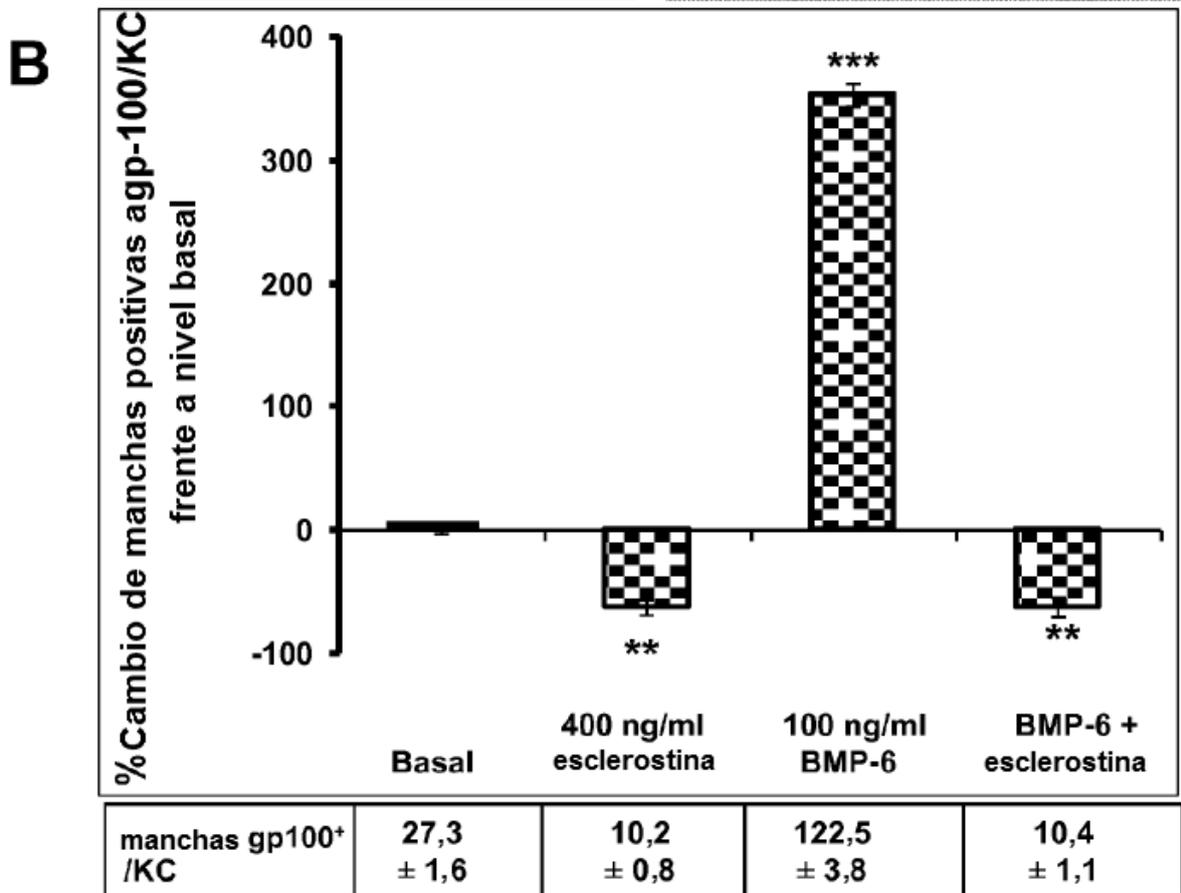
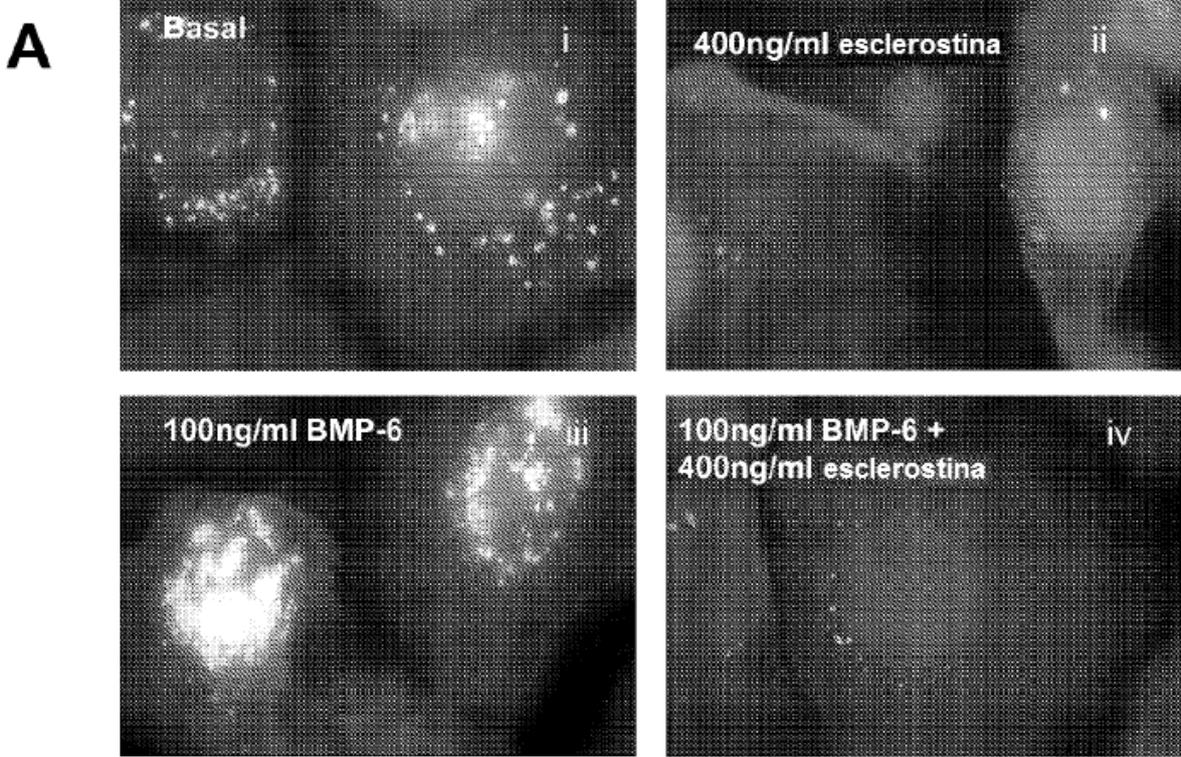


Figura 6

P<0,01, *P<0,001

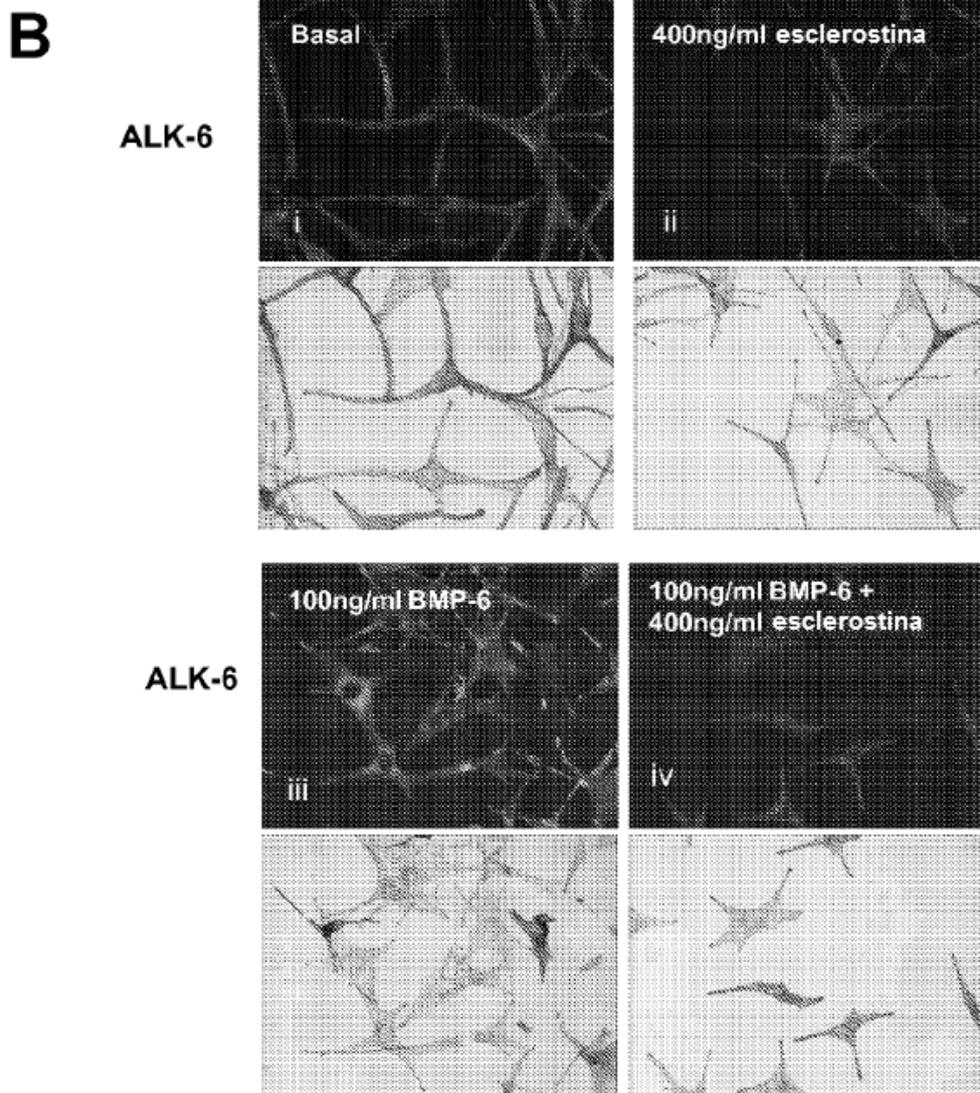
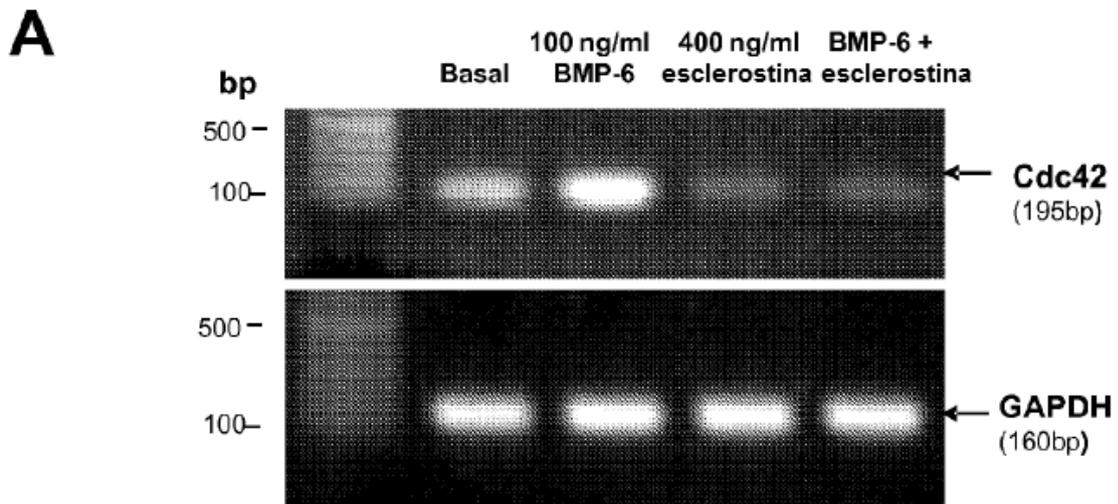


Figura 7

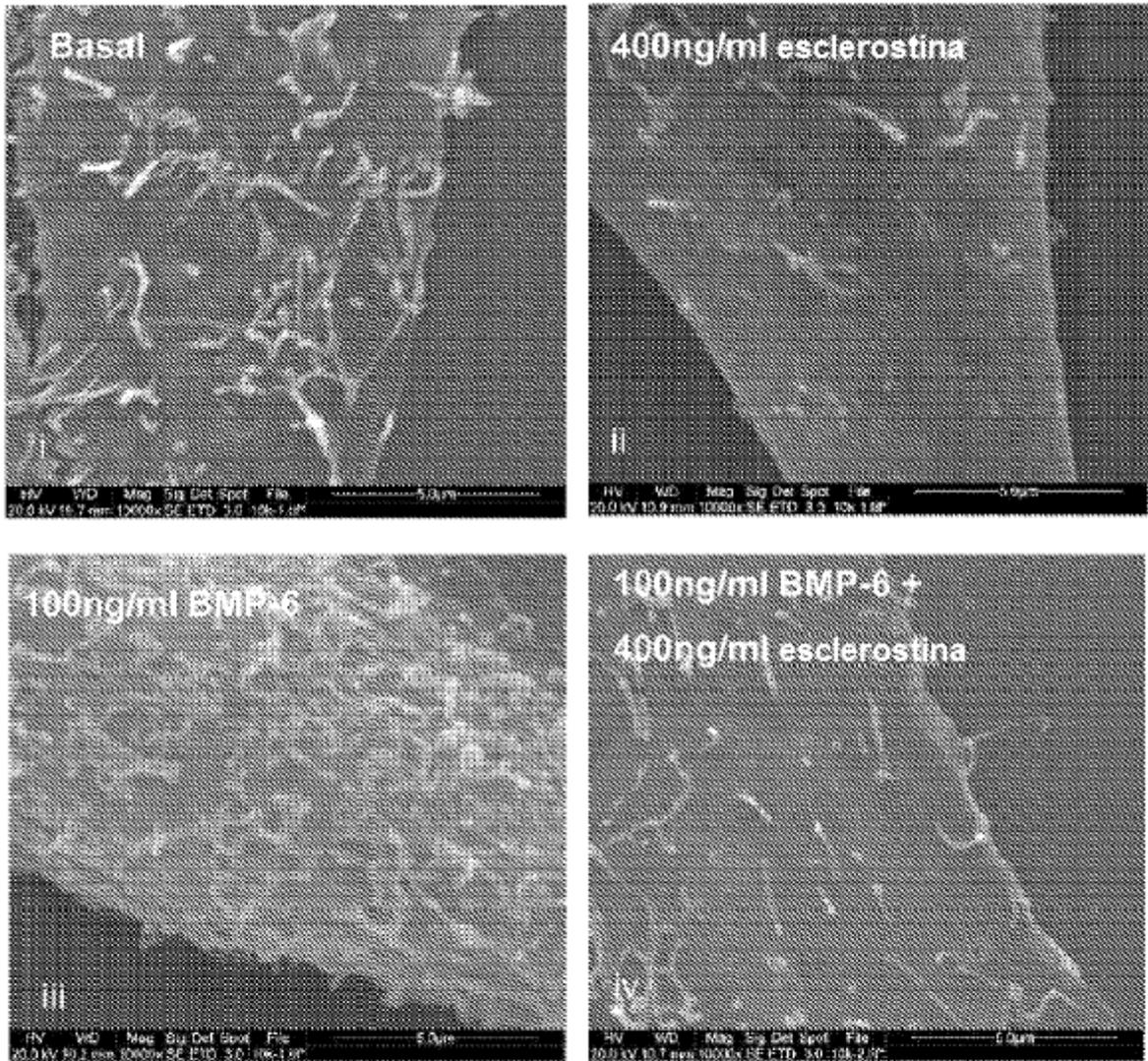
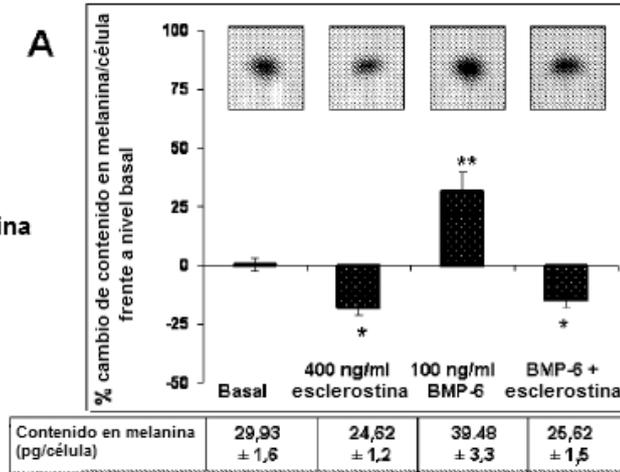


Figura 8

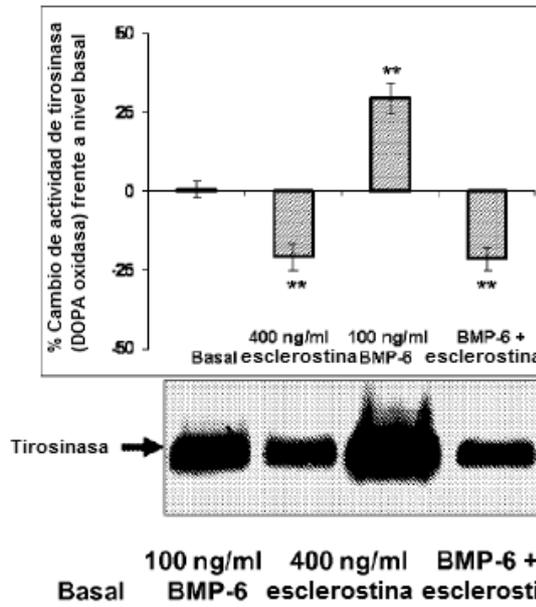
A

Análisis de melanina



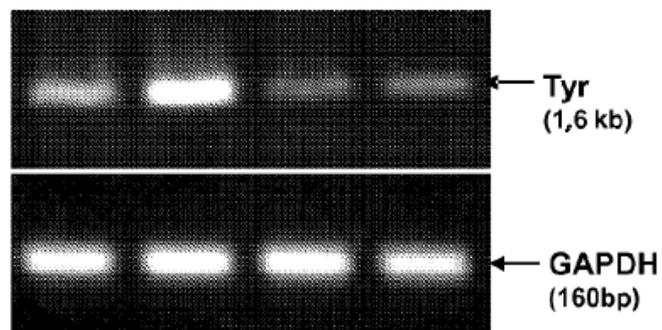
B

Análisis de DOPA oxidasa



C

RT-PCR



Transferencia Western

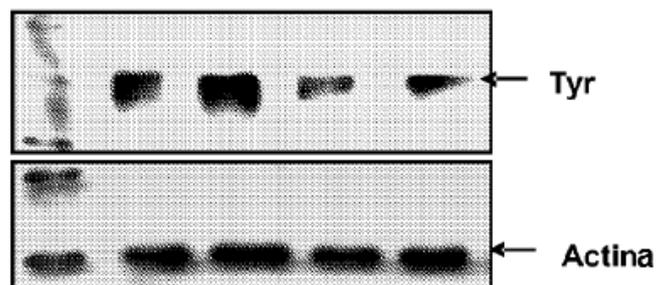
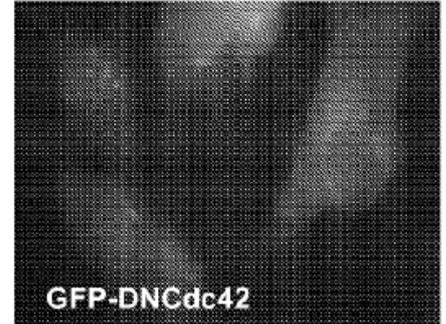
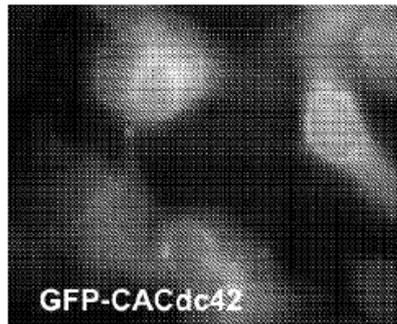
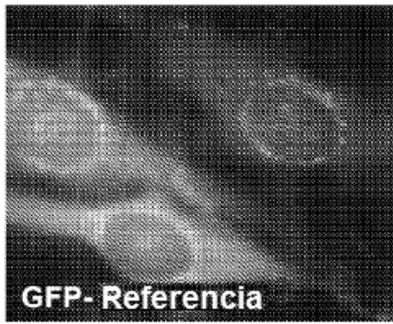


Figura 9



Suplemento-1