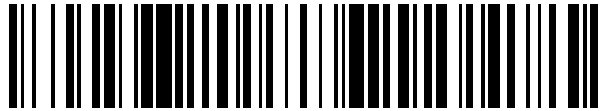


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 416**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09742231 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2271357**

54 Título: **Uso cosmético de proteínas de tipo anexina II para el tratamiento de la sequedad cutánea**

30 Prioridad:

04.04.2008 FR 0852281

30.04.2008 US 49004 P

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

25.05.2015

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)

**14, rue Royale
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BERNARD, DOMINIQUE;
SIMONETTI, LUCIE y
CASTIEL, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 536 416 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

Uso cosmético de proteínas de tipo anexina II para el tratamiento de la sequedad cutánea

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar el estado de sequedad de la superficie de un epitelio, particularmente de una epidermis, que comprende al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de la expresión y/o de la actividad biológica de un polipéptido conforme a la invención, es decir la anexina II, de uno de sus derivados o fragmentos.
- 10 [0002] La invención se refiere también a un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico que tiene el objetivo de suplir los signos de sequedad cutánea que comprenden al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de la expresión y/o de la actividad biológica de un polipéptido conforme a la invención, es decir de la anexina II, de uno de sus derivados o fragmentos.
- 15 [0003] La epidermis es un epitelio, convencionalmente dividido en una capa basal de queratinocitos que contienen, particularmente, células madre cutáneas y que constituyen la capa germinativa de la epidermis, una capa denominada espinosa constituida por varias capas de células poliédricas dispuestas sobre la capa basal, una capa denominada granulosa que comporta de una a tres capas de células aplanadas que contienen inclusiones citoplásmicas distintas, los granos de queratohialina, y finalmente, un conjunto de capas superiores, llamada capa córnea (o estrato corneo)
- 20 constituida por queratinocitos en la fase terminal de su diferenciación denominados corneocitos.
- [0004] El estrato corneo, por su solidez y su estructura estratificada compacta, asegura una función de barrera: evita particularmente la pérdida de agua transcutánea, también denominada "pérdida insensible de agua".
- 25 [0005] Así, una de las funciones del estrato corneo es captar y retener el agua contenida en la epidermis, y cualquier alteración de su estructura y/o de su función podrá traducirse en modificaciones de la hidratación cutánea.
- [0006] La hidratación es aportada a la piel por el agua de las capas profundas y por el sudor.
- 30 [0007] Un desequilibrio en la hidratación de la piel puede traducirse en profundas consecuencias tanto fisiológicas como cosméticas.
- [0008] Los trastornos de la hidratación cutánea, y particularmente una sequedad cutánea, a menudo se observan con la edad. Sin embargo, tales estados se pueden manifestar igualmente en sujetos jóvenes.
- 35 [0009] El estado de sequedad cutánea puede ser de origen adquirido o constitucional no patológico o puede tener un origen constitucional patológico.
- [0010] Numerosos factores exteriores pueden causar la sequedad de la piel o agravar este estado. Entre estos factores, se pueden citar condiciones climáticas tales como el frío o el viento, los rayos solares, la exposición a ciertos agentes químicos o terapéuticos.
- 40 [0011] En el plano fisiológico, una piel seca está a menudo asociada a una bajada en los índices de hidratación cutánea así como a una modificación del proceso de maduración del estrato corneo que tiene como signo más visible la aparición de escamas en la superficie cutánea.
- 45 [0012] En el plano sensorial, una piel seca se puede caracterizar por una sensación de tirantez y/o de tensión cutánea.
- [0013] Existen diferentes métodos para evaluar una piel seca.
- 50 [0014] Un primer tipo de valoración, efectuada desde un punto de vista estrictamente visual, se basa en un atlas fotográfico y utiliza una escala de 0 a 4 para registrar la puntuación. El valor 0 corresponde a una piel perfectamente normal mientras que el valor 4 corresponde a una piel muy seca. Este método de naturaleza subjetiva, presenta el inconveniente de que requiere la presencia de síntomas cutáneos visibles.
- 55 [0015] Un segundo tipo de valoración se basa en las medidas biofísicas.
- [0016] Estos métodos se basan en general en las propiedades eléctricas de la piel, es decir la capacidad, la conductancia y la impedancia cutánea. Es el caso, por ejemplo, de la medida del índice de hidratación de la capa córnea por corneometría, basada en la aptitud de la piel para conducir una corriente eléctrica. Esto puede efectuarse con diferentes aparatos comercializados, tales como el corneómetro de la empresa COURAGE & KHAZAKA.
- 60 [0017] Por último, otros tipos de evaluación, a veces denominadas técnicas "morfométricas", se refieren al análisis del microrelieve cutáneo o del estado de las células en la superficie cutánea, tal como la evaluación de la "descamación" al realizar las tomas por "stripping" con ayuda de adhesivo del tipo "D'squam" de la empresa CU-DERM.
- 65

[0018] Estos métodos tienen el inconveniente de que se deben combinar entre sí para poder dar una medida fiable del estado de sequedad de la piel.

5 [0019] Además, tienen también el inconveniente de que no dan indicios del origen de la piel seca y por lo tanto sobre los medios para corregirla.

[0020] En consecuencia, existe la necesidad de poder disponer de un nuevo marcador, particularmente un marcador biológico, propicio para dar una medida fiable de un estado del epitelio, y particularmente de un estado de sequedad.

10 [0021] Existe por lo tanto la necesidad de poder disponer de nuevas herramientas que permitan promover la integridad y la maduración del estrato corneo así como de evaluar su estado.

15 [0022] Existe también la necesidad de poder contar con nuevas herramientas y/o de nuevos objetivos cosméticos y/o dermatológicos que se puedan utilizar para prevenir y/o aliviar los signos fisiológicos y/o sensoriales relacionados con la sequedad del epitelio, y particularmente de la epidermis.

[0023] Existe también la necesidad de disponer de nuevos objetivos cosméticos o dermatológicos para el tratamiento del estado de sequedad de un epitelio y particularmente de una epidermis.

20 [0024] Existe también la necesidad de disponer de nuevas herramientas, particularmente de nuevas moléculas, para el tratamiento y/o la prevención de un estado de sequedad de un epitelio y particularmente de la epidermis.

[0025] La presente invención tiene como objetivo satisfacer estas necesidades.

25 [0026] La presente invención resulta de forma más particular de la caracterización por los inventores de un aumento del nivel de expresión de la proteína anexina II en el estrato corneo de una epidermis humana seca, en comparación con el nivel en un estrato corneo de una epidermis normal. Y más particularmente, la invención deriva de la observación de una expresión aumentada de la anexina II en una epidermis humana envejecida y seca con respecto a una epidermis joven o envejecida y con hidratación normal.

30 [0027] La anexina II es una proteína de 339 aminoácidos (SEC ID N° 2) que, para asegurar sus funciones, puede asociarse a la proteína S100A10 para formar un heterotetrámero compuesto por dos subunidades de cada una de las proteínas.

35 [0028] Pertenece a una familia de proteínas de enlace a los fosfolípidos calcio dependientes, lo que indica una localización de las anexinas en la membrana plásmica. Por esta localización particular, atribuimos a las anexinas una función en la organización de los eventos de fusión de membranas, de tipo exocitosis y endocitosis. Estas proteínas intervienen en diversas vías de señalización, particularmente en la del calcio.

40 [0029] La anexina II es una proteína ubicua cuya expresión es particularmente abundante en la piel. Debido a una actividad del canal cálcico mostrada *in vitro*, se ha sugerido que en el momento de la diferenciación terminal de los queratinocitos, la anexina II pueda intervenir en la regulación del flujo cálcico.

45 [0030] En un estudio sobre el envejecimiento cutáneo, Gromov *et al.* no han observado variación de la expresión de la proteína anexina II con el edad (Mol. Coll Proteomics, 2003 Feb.; 2(2): 70-84).

[0031] Que los inventores sepan, la anexina II no se había identificado hasta ahora como una proteína cuya expresión varíe en función de la tipología de la piel, a saber un nivel de expresión aumentada en un estrato corneo humano seco con respecto al de un estrato corneo humano normal.

50 [0032] Así, contra todo pronóstico, la anexina II resulta ser igualmente un marcador potencial del estado fisiológico de la piel, particularmente en términos de sequedad. De hecho, como se desprende de las pruebas que figuran a continuación, los inventores han constatado de manera inesperada, por una parte una expresión de esta proteína en el nivel del estrato corneo, y por otra parte un aumento significativo de su expresión en un estrato corneo tomado sobre una piel seca, en comparación con un estrato corneo tomado sobre una piel normal.

55 [0033] Así, el presente texto describe un uso cosmético o incluso no terapéutico, de una cantidad eficaz de al menos un polipéptido derivado de la anexina II y, particularmente, de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada en todo o en parte por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de la misma o un fragmento de ésta, de al menos una secuencia nucleica que codifica para tal polipéptido o de al menos un agente modulador de la actividad, de la estabilidad o de la expresión de tal polipéptido, como agente útil, para prevenir y/o tratar los signos de sequedad cutánea, en particular para prevenir y/o tratar una deshidratación de una epidermis.

60 [0034] El presente texto describe también un uso de una cantidad eficaz de al menos un polipéptido derivado de la anexina II y, particularmente, de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada en todo o en parte por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de ésta o un fragmento

de ésta, de al menos una secuencia nucleica que codifica para tal polipéptido o de al menos un agente modulador de la actividad, de la estabilidad o de la expresión de tal polipéptido para la preparación de una composición, particularmente terapéutica, para prevenir y/o tratar los signos de sequedad cutánea, en particular para prevenir y/o tratar una deshidratación de una epidermis.

5

[0035] Por signos de sequedad cutánea, se entiende no sólo todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debidas particularmente a la deshidratación de la epidermis, tales como el aspecto rugoso y escamoso, así como la flexibilidad disminuida, sino también las sensaciones relacionadas con el fenómeno de sequedad, tales como los pruritos y/o la tirantez. Puede de hecho ocurrir que una persona experimente estas sensaciones sin que ningún síntoma visual sea necesariamente perceptible.

10

[0036] Tal uso puede estar destinado de forma más particular a prevenir y/o tratar los signos de sequedad cutánea adquirida o constitucional no patológica.

15

[0037] A los efectos de la presente invención, se entiende por "cantidad eficaz" la cantidad mínima necesaria para observar el efecto esperado, a saber un efecto cosmético o un efecto terapéutico, entendiéndose que las cantidades eficaces necesarias para la obtención de un efecto cosmético o de un efecto terapéutico pueden ser, en su caso, idénticas o diferentes.

20

[0038] En el contexto de la invención, se entiende por "uso cosmético" un uso destinado, principalmente, a procurar un efecto estético y/o de confort.

25

[0039] En el contexto de la invención, se entiende por "composición terapéutica" una composición para procurar un efecto profiláctico o curativo con respecto a trastornos epiteliales, y particularmente epidérmicos, reconocidos por traducir un estado patológico.

30

[0040] Por "profiláctico" o "preventivo" en el contexto de la invención, se entiende la disminución del riesgo de que se produzca un fenómeno, por ejemplo una patología.

35

[0041] Una composición descrita en el presente texto puede ser, en particular, para prevenir y/o tratar una sequedad de una epidermis, y particularmente un defecto de hidratación del estrato córneo.

[0042] Una composición descrita en el presente texto puede ser, en particular, para prevenir y/o tratar las sensaciones de pruritos y/o de tirantez de un epitelio seco.

40

[0043] El presente texto describe también el uso de al menos un polipéptido conforme a la invención, o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, a modo de herramienta de caracterización *in vitro* o *ex vivo* de un estado de sequedad de un epitelio, y particularmente de una epidermis.

45

[0044] Según uno de sus primeros aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar el estado de sequedad de la superficie de un epitelio, particularmente de una epidermis, que comprende al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de la expresión y/o de la actividad biológica de un polipéptido conforme a la invención, es decir la anexina II, de uno de sus derivados o fragmentos.

50

[0045] Más precisamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de caracterización de un estado de sequedad de un epitelio que comprende al menos las etapas que consisten en:

a) determinar en una muestra de dicho epitelio, un contenido de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de la misma que tiene al menos 85 % de homología de secuencia así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de la misma que comporta al menos 6 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido así como una actividad biológica de la misma naturaleza o de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, y

55

b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia.

[0046] El dato o valor de referencia se puede obtener por ejemplo a partir de al menos un epitelio, particularmente una epidermis, distinta de la que es objeto de la caracterización, y cuyo estado se conoce. Como epidermis de referencia, se puede tratar bien de una epidermis de un segundo sujeto que tiene una piel normal y distinta de un primer sujeto en el que se realiza la caracterización, bien de una región de la epidermis del mismo sujeto en el que se realiza la caracterización, pero elegida en una zona cutánea que presenta una hidratación fisiológica.

60

[0047] La presente invención se refiere según otro de sus aspectos a un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico que busca suplir los signos de sequedad cutánea que comporta al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de la expresión y/o de la actividad biológica de un polipéptido conforme a la invención, es decir de la anexina II, de uno de sus derivados o fragmentos.

65

[0048] Más precisamente, la presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para resaltar un efecto de un tratamiento que puede remitir los signos de sequedad de un epitelio, particularmente sensaciones de prurito y/o de tirantez, en un individuo, que incluye al menos las etapas que consisten en:

5 a) efectuar, antes del tratamiento, al menos una primera determinación, en una primera muestra de un epitelio tomada de dicho individuo, de una actividad biológica y/o de la expresión de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de ésta que tiene al menos 85 % de homología de secuencia así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de ésta que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido así como una actividad biológica de la misma naturaleza o de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido.

10 b) efectuar, después del tratamiento, al menos una segunda determinación, en una segunda muestra de un epitelio tomada de dicho individuo, de dicha actividad biológica y/o de dicha expresión de dicho polipéptido o de dicha expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos determinadas en la etapa a), y

15 c) comparar la primera y la segunda determinaciones, particularmente para deducir una información relacionada con un efecto al menos del tratamiento.

20 [0049] El valor o dato de referencia puede ser un dato obtenido a partir del epitelio, particularmente de la epidermis, que se va a someter al tratamiento, antes de la administración de dicho tratamiento o en un retraso cronológico más corto con respecto a la fecha de inicio de tratamiento.

25 [0050] Como es evidente a partir de la siguiente descripción, los procedimientos según la invención son particularmente ventajosos ya que su ejecución no requiere una operación invasiva.

30 [0051] Los procedimientos de la invención se pueden efectuar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

35 [0052] De hecho, la localización por los inventores del nuevo biomarcador de sequedad que es la anexina II, en el estrato corneo hace posible una caracterización cuantitativa o cualitativa de la expresión de esta proteína por simple muestreo tópico. El método de muestreo puede ser por ejemplo una técnica de tipo "stripping" que consiste en aplicar sobre el epitelio en cuestión, tal como una epidermis, una parte de cinta adhesiva. Al despegar esta cinta adhesiva, una fracción del epitelio, por ejemplo una fracción epidérmica, se toma. Después de la extracción proteica, ésta se analiza a través de métodos convencionales, tales como la dosificación inmunoenzimática o de forma más particular un análisis de Western-Blot.

40 Piel seca

[0053] Una piel seca aparece rugosa al tacto y aparece cubierta de escamas y se manifiesta esencialmente por una sensación de tirantez y/o de tensión.

45 [0054] La piel seca está de hecho acompañada de un trastorno de la descamación y presenta diferentes estadios en función de la severidad de esta descamación. Cuando la piel está ligeramente seca, estas escamas son abundantes pero poco visibles a simple vista, la eliminación se efectúa corneocito a corneocito. Son cada vez menos numerosas pero cada vez más visibles a simple vista cuando este desorden se agrava, los cúmulos pueden constar de varias centenas de corneocitos, representando así cúmulos más o menos grandes, denominados escamas.

50 [0055] La origen de esta sequedad cutánea puede ser de tipo constitucional o adquirido.

[0056] En el caso de la piel seca constitucional, se pueden distinguir dos categorías: las pieles patológicas y las pieles no patológicas.

55 [0057] Las pieles secas constitucionales patológicas están esencialmente representadas por la dermatitis atópica y las ictiosis. Son casi independientes de las condiciones exteriores y tienen origen en modificaciones genéticas conocidas o desconocidas. Entre las modificaciones genéticas conocidas que afectan a la hidratación cutánea se puede citar, por ejemplo, las modificaciones del gen de la Transglutaminasa 1 o las del gen de la Filagrina.

60 [0058] En el caso de las pieles secas constitucionales no patológicas, la severidad del estado de sequedad puede, por su parte, depender de factores exteriores. Entran en esta categoría de piel, la piel senil (caracterizada por una disminución general del metabolismo cutáneo con la edad), la piel frágil (muy sensible a los factores exteriores y a menudo acompañada de eritema y de rosácea) y la xerosis vulgar (de origen genético probable y que se manifiesta de forma prioritaria sobre la cara, las extremidades y el dorso de las manos).

[0059] En el caso de piel seca adquirida, la intervención de parámetros exteriores tales como la exposición a los agentes químicos, a condiciones climáticas difíciles, a rayos solares o también ciertos tratamientos terapéuticos (retinoides, por ejemplo) es determinante. Bajo estas influencias exteriores, la epidermis puede convertirse entonces momentánea y localmente en seca. Esto se puede aplicar a cualquier tipo de epidermis.

[0060] Sea cual sea el origen, una piel afectada de sequedad cutánea presenta, habitualmente, los siguientes signos, a saber, un aspecto rugoso al tacto y escamoso, así como una flexibilidad y una elasticidad disminuidas.

[0061] La piel seca, también denominada "xerosis", puede aparecer a cualquier edad, y no estar relacionada con una condición patológica. En este caso hablaremos de sequedad "adquirida".

[0062] Sin embargo, la xerosis se hace más frecuente y molesta con el edad, particularmente en las mujeres. Se habla entonces de xerosis senil. Además, las mujeres sufren habitualmente una agravación de la sequedad cutánea con la menopausia, probablemente debido al desajuste hormonal característico de este fenómeno. Las zonas más afectadas son la parte inferior de las piernas, la parte dorsal de los antebrazos y las manos.

[0063] Como se ha mencionado previamente, la sequedad adquirida puede sufrir la influencia de factores exteriores. Por ejemplo, la aparición de la piel seca se puede ver favorecida por un tiempo frío, seco e invernal. Se habla entonces de xerosis invernal. La sequedad cutánea puede ser también inducida por un estrés exógeno, de origen químico, por ejemplo de tipo detergente aniónico, o incluso de origen mecánico (rozamiento, raspadura).

[0064] Aunque ningún estudio haya demostrado una incidencia de la sequedad sobre el origen y la formación de las arrugas y las líneas de expresión que se atribuyen esencialmente al envejecimiento, en el plano visual, una piel seca las hace más aparentes.

[0065] Además, en el plano sensorial, la sequedad cutánea se caracteriza por una sensación de tirantez y/o de pruritos. Por razones evidentes, estas manifestaciones no son sólo fuente de incomodidad, incluso de dolor, sino también de una apariencia antiestética.

[0066] Así, sigue existiendo una necesidad de disponer de nuevos activos para ejercer una acción beneficiosa en el tratamiento de la sequedad cutánea no sólo sobre el plano terapéutico, sino también sobre el plano estético.

Definición de polipéptido

[0067] Según una forma de realización, un polipéptido conveniente para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos representada en totalmente o en parte por una secuencia representada por SEC ID N° 2, o un análogo de ésta, o un fragmento de ésta.

[0068] En el sentido de la presente invención, se quiere designar de manera general, excepto que se indique lo contrario, por la anexina II la secuencia (SEC ID N° 2) de la proteína que ha sufrido o no modificaciones postraduccionales.

[0069] Entre estas modificaciones postraduccionales, se pueden citar, en particular, las fosforilaciones sobre los aminoácidos de la posición 18, 19, 24, 26 y 30 de la proteína.

[0070] También se sabe que la secuencia primaria de un polipéptido, es decir, el encadenamiento de los aminoácidos, determina los sitios específicamente reconocidos por las enzimas de tipo proteasa, tales como la tripsina que, una vez se ha hecho efectivo el reconocimiento de estos sitios, inducirán la escisión del polipéptido por proteólisis. Esta proteólisis resulta en la generación de diversos péptidos, o fragmentos de proteólisis, de la anexina II.

[0071] Los inventores han detectado la presencia de tales péptidos en el estrato corneo.

[0072] En consecuencia, la invención se extiende igualmente a los fragmentos de proteólisis de la anexina II.

[0073] Así, según una forma de realización particular, un polipéptido conveniente para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos elegida entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 29, SEC ID N° 30, SEC ID N° 31, SEC ID N° 32, SEC ID N° 33, SEC ID N° 34, SEC ID N° 35, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, SEC ID N° 38, SEC ID N° 39, SEC ID N° 40, SEC ID N° 41, SEC ID N° 42 y SEC ID N° 43 y sus mezclas.

[0074] Por "análogo de un polipéptido", se pretende designar cualquier polipéptido que presente una homología de secuencia, en particular con respecto a una de las secuencias características de dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza.

[0075] Este compuesto puede ser un agente peptidomimético.

5 [0076] La homología es de al menos 85 %, y puede ser por ejemplo de al menos 90 %, y por ejemplo de al menos 95 %. La homología se puede determinar por comparación visual o mediante cualquier herramienta informática habitualmente utilizada en el dominio, tal como los programas BLAST disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov y utilizados con los parámetros configurados por defecto.

10 [0077] La homología de secuencia puede deberse a modificaciones resultantes de mutaciones o de variaciones en las secuencias de los péptidos según la invención a partir bien de la eliminación o de la inserción de uno o varios aminoácidos, bien de la sustitución de uno o varios aminoácidos en las secuencias características de un polipéptido según la invención.

15 [0078] En el contexto de la invención, se pretende designar por "fragmento de polipéptido" a cualquier parte de un polipéptido conforme a la invención que conste de al menos 6, en particular al menos 8, y particularmente al menos 12 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido, y una actividad biológica sensiblemente similar.

20 [0079] Por "secuencia característica del polipéptido", se quiere apuntar particularmente con respecto a la anexina II, a la secuencia representada por SEC ID N° 2.

[0080] De manera general, los análogos polipeptídicos pueden comprender sustituciones conservadoras con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural.

25 [0081] Varias de estas modificaciones pueden ser combinadas.

[0082] Como ejemplo de mutaciones que se pueden considerar en la presente invención, se puede mencionar, de manera no exhaustiva, el reemplazo de uno o varios residuos de aminoácidos a través de residuos de aminoácidos que tengan un índice hidropático similar sin que sin embargo afecte de manera sensible a las propiedades biológicas del polipéptido, y particularmente su actividad biológica, tal y como su actividad de estímulo de la proliferación y/o de la migración y/o de la diferenciación terminal de los queratinocitos o del estímulo de la síntesis de los proteoglicanos en un epitelio, y en particular la epidermis.

30 [0083] El índice hidropático es un índice atribuido a los aminoácidos en función de su hidrofobicidad y de su carga (Kyte *et al.* (1982), *J. Mol. Biol.*, 157: 105).

35 [0084] Un polipéptido o análogo igualmente cubierto por la presente invención puede ser un polipéptido que haya sufrido una o varias modificaciones postraduccionales.

40 [0085] Por "modificaciones postraduccionales" nos referimos al conjunto de las modificaciones que un péptido o una proteína puede sufrir tras su síntesis en una célula, tales como, por ejemplo, una o más fosforilaciones, una o más tiolaciones, una o más acetilaciones, una o más glicosilaciones, una o más lipidaciones, tales como una farnesilación o una palmitoilación, una nueva disposición estructural de tipo formación de puentes disulfuros y/o de tipo división dentro de la secuencia peptídica.

45 [0086] El análogo presenta, además, sensiblemente la misma actividad biológica que el polipéptido natural.

[0087] Según una forma de realización de un polipéptido según la ejecución de la invención puede también ser un polipéptido natural o sintético, en su caso susceptible de ser obtenido después de lisado enzimático o químico de la anexina II o por síntesis química o biológica o por extracción de un tejido biológico, como por ejemplo la piel, expresando naturalmente este polipéptido o después de la transfección de éste, así como las diferentes formas postraduccionales de éste, o incluso cualquier polipéptido natural o sintético cuya secuencia comprenda totalmente o parcialmente (en todo o en parte) una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, por ejemplo las variantes y los análogos.

50 [0088] El experto en la técnica puede obtener un polipéptido conforme a la invención mediante procedimientos a base de ADN recombinante, como por ejemplo, los descritos en el manual "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (Segunda edición), Sambrook *et al.*, 1989, Vol. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook)".

60 [0089] Según otra forma de realización, un polipéptido adecuado para la ejecución de la invención puede ser también un polipéptido tal y como se ha definido previamente en el que un residuo al menos ha sido reemplazado por un residuo de aminoácido de índice hidropático similar, como se ha definido previamente.

65 [0090] Según otra forma de realización, un polipéptido adecuado para la ejecución de la invención puede ser también un polipéptido tal y como se ha definido previamente, fusionado con otro polipéptido, un agente de focalización hidrófila o hidrófoba, un precursor de bioconversión, un agente de marcaje luminiscente, radioactivo o colorimétrico.

5 [0091] De manera no limitativa, se pueden citar como ejemplo de compuestos susceptibles de ser acoplados con un polipéptido conforme a la invención las proteínas fluorescentes tales como la "Green Fluorescent Protein", los compuestos químicos fluorescentes tales como la rodamina, la fluoresceína o el Texas Red®, los compuestos fosforescentes, los elementos radioactivos, tales como ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²¹I o ¹²⁵I, o los agentes de marcaje colorimétrico tales como los sustratos cromogénicos sensibles a la acción de la galactosidasa, de la peroxidasa, del cloranfenicol acetiltransferasa, de la luciferasa o de la fosfatasa alcalina.

10 [0092] Según la naturaleza de los compuestos que se pueden acoplar con un polipéptido conforme a la invención, el acoplamiento se puede realizar mediante procedimientos químicos, particularmente mediante funciones químicas reactivas o mediante procedimientos de biología molecular conocidos por el experto en la técnica.

Definición de secuencias de ácidos nucleicos

15 [0093] Según una forma de realización, la presente invención se refiere también a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de la invención y su ejecución en los diferentes procedimientos conforme a la invención.

20 [0094] Así, el presente texto describe también el uso de secuencias de ácidos nucleicos, particularmente de ácidos desoxirribonucleicos, o de ácidos ribonucleicos que codifican para un polipéptido conforme a la invención, particularmente las secuencias correspondientes al menos a una secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID N° 1, los análogos de ésta o un fragmento de ésta para la preparación de una composición descrita en el presente texto.

25 [0095] En el sentido de la presente invención, se entiende que "fragmento de secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para todo o parte de un polipéptido conforme a la invención, o un análogo de ésta, y en particular una secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID N° 1 o un análogo de ésta.

30 [0096] Por "análogo de una secuencia de ácidos nucleicos", se entiende que se designa cualquier secuencia de ácidos nucleicos, eventualmente a partir de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y que codifica para un polipéptido de secuencia idéntica o análoga a la del polipéptido codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

35 [0097] Las secuencias de ácidos nucleicos pueden tener cualquier origen posible, a saber, bien animal, en particular de mamíferos e incluso de forma más particular de humano, bien vegetal, bien de microorganismos (virus, fagos, bacterias entre otros) o incluso hongos, independientemente del hecho de que estén presentes de manera natural o no en dicho organismo de origen.

40 [0098] En este caso, el presente texto describe también el uso de fragmentos de ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican para los polipéptidos considerados según la invención.

[0099] Una secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención puede constar de una secuencia sentido, anti-sentido o interferencial correspondiente a una secuencia que codifica para un polipéptido conforme a la invención.

45 [0100] Así, el presente texto describe igualmente el uso de secuencias de ácidos nucleicos, particularmente de ácidos desoxirribonucleicos, o de ácidos ribonucleicos, que codifican para un polipéptido conforme a la invención.

[0101] Las secuencias de ácidos nucleicos según la invención se pueden utilizar particularmente para preparar las secuencias de ácidos ribonucleicos correspondientes, sentido o anti-sentido.

50 [0102] El presente texto describe igualmente el uso de cualquier polinucleótido, de secuencia de ácidos ribonucleicos o desoxirribonucleicos, que comprende una secuencia sentido o anti-sentido, particularmente "Small interfering RNA" (SIRNA) correspondiente al menos a la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID N° 1 o un análogo de ésta.

Agente modulador

55 [0103] El presente texto describe el uso de un agente modulador de la expresión y/o de la estabilidad y/o de la actividad de un polipéptido conforme a la invención.

60 [0104] En el contexto de la invención, se entiende por "modular", con respecto a un efecto dado, la acción de estimular o inhibir este efecto.

65 [0105] En el sentido de la presente invención, se entiende por la expresión "agente modulador o compuesto químico o biológico apto para modular la actividad biológica y/o la expresión" cualquier compuesto que pueda actuar, directa o indirectamente, sobre al menos un polipéptido conforme a la invención, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para éste, o sobre un elemento de una vía de señalización intra o extracelular, o de una vía metabólica, que implica dicho polipéptido, o sobre un elemento implicado en la regulación de la transcripción y/o de la traducción de una

secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, así como en la regulación de la estabilidad del mismo.

5 [0106] Por "actividad biológica", se quiere designar particularmente con respecto a la anexina II, la actividad biológica de la proteína representada por la secuencia SEC ID N° 2.

[0107] Este agente modulador puede ser un agente activador o inhibitorio de la expresión de un polipéptido de la invención, o incluso un agente de regulación de la estabilidad de dicho polipéptido.

10 [0108] A título ilustrativo y no limitativo, entre los agentes que regulan la estabilidad, se pueden citar particularmente los compuestos que estimulan el deterioro proteolítico, tales como de las proteasas, los agentes quelantes de iones, los derivados sulfónicos, los derivados de urea, los agentes reductores, los alfa o beta-hidroxiácidos, el ácido ascórbico o la nicotinamida.

15 [0109] De una forma más particular, el agente modulador puede ser un inhibitorio de la expresión de los polipéptidos según la invención.

[0110] El agente modulador puede ser un agente que disminuya la estabilidad de los polipéptidos conforme a la invención, estimulando su deterioro proteolítico.

20 [0111] Se entiende que el conjunto de las composiciones cosméticas o terapéuticas consideradas descritas en el presente texto utilizan un medio fisiológicamente aceptable.

25 [0112] En el sentido de la presente invención, se entiende por "medio fisiológicamente aceptable", un medio conveniente para la aplicación de una composición sobre un epitelio o una materia queratinosa, tal como la piel, el cuero cabelludo, los labios, las mucosas y las fibras queratínicas tales como el cabello, las uñas y el vello, o en su caso por vía oral o parenteral.

30 [0113] En el sentido de la presente invención, se entiende por "terapéutica" una composición que se puede utilizar en el marco de un tratamiento profiláctico y/o curativo, o de un método de evaluación de un estado de sequedad de un epitelio, y particularmente de la epidermis.

[0114] Una composición cosmética o terapéutica según el presente texto puede comprender, además, al menos un agente activo cosmético y/o terapéutico.

35 [0115] Como ejemplos de agentes activos utilizables, se pueden mencionar aceites cosméticos, tales como los aceites de silicona, los aceites vegetales de tipo triglicéridos, los aceites hidrocarbonados tales como el aceite de Parleam y los ésteres de ácidos grasos y de alcohol graso.

40 [0116] También es posible utilizar otros agentes activos que permitan mejorar el estado de la piel, tales como los activos hidratantes o humidificantes o los agentes activos que permitan mejorar la barrera lipídica natural, tales como las ceramidas, los sulfatos de colesterol y/o los ácidos grasos y sus mezclas.

45 [0117] También es posible utilizar enzimas que tengan una actividad sobre la piel, tales como las proteasas, las lipasas, las glucosidasas, las amidasas, las cerebrosidasas y/o las melanasas y sus mezclas.

[0118] Como otros ejemplos de agentes activos convenientes figuran: los activos analgésicos, los activos antilevaduras, los activos antibacterianos, los activos antiparasitarios, los activos antifúngicos, los activos antivirales, los activos antiinflamatorios esteroideos, los activos anestésicos, los activos antipruriginosos, los activos queratolíticos, los activos antiradicales libres, los activos antiseborreicos, los activos anticaspa, los activos antiacné, los activos que dirigidos a prevenir el envejecimiento de la piel y/o a mejorar su estado, los activos antidermatitis, los activos antiirritantes, los activos inmunomoduladores, los activos para el tratamiento de la piel seca, los activos antitranspirantes, los activos antipsoriásicos, los activos protectores contra los UV, los activos antihistamínicos, los activos cicatrizantes, los activos autobronceantes, los antioxidantes tales como el té verde o las fracciones activas de éste, la glicerina, la laponita, la cafeína, los aceites esenciales aromáticos, los colorantes, los activos despigmentantes, los liporreguladores, los activos suavizantes, refrescantes, desodorantes, insensibilizantes, blanqueantes, nutrientes, los activos que disminuyen la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea y sus mezclas.

60 [0119] En general, cualquier composición descrita en el presente texto se puede aplicar sobre la piel (sobre cualquier zona cutánea del cuerpo) o sobre las mucosas (bucal, de la mejilla, gingival, genital, conjuntival...).

[0120] De manera conocida, una composición cosmética puede contener igualmente adyuvantes habituales en el dominio cosmético, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los aditivos hidrófilos o lipófilos, los conservantes, los antioxidantes, los solventes, los perfumes, las cargas, los filtros, los absorbentes de olores y las materias colorantes.

65

[0121] Las cantidades de los diferentes componentes de las composiciones descritas en el presente texto son las habitualmente utilizadas en los campos en cuestión.

5 [0122] La cantidad de compuesto químico o biológico o de polipéptido, de secuencia de ácidos nucleicos o de agente modulador contenida en una composición del presente texto, denominada "cantidad eficaz", es, por supuesto, en función de la naturaleza del compuesto y del efecto deseado y puede por lo tanto variar en gran medida.

10 [0123] Para dar un orden de magnitud, una composición puede contener un agente modulador o un polipéptido en una cantidad que representa de 0,00001 % a 50 % del peso total de la composición, en particular en una cantidad que representa de 0,001 % a 10 % del peso total de la composición, y particularmente en una cantidad que representa de 0,1 % a 1 % del peso total de la composición.

15 [0124] Una composición como se describe en el presente texto se puede de forma más particular dedicar a la reducción y/o al tratamiento de un defecto de hidratación, y particularmente una sequedad, que puede deteriorar el estado de un epitelio, y particularmente de una epidermis.

20 [0125] El presente texto describe también el uso de al menos un polipéptido conforme a la invención o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, como herramienta de caracterización *in vitro* o *ex vitro* de un estado de sequedad de un epitelio, y particularmente de una epidermis.

25 [0126] Así, la presente invención se refiere según uno de sus aspectos a procedimientos no invasivos para caracterizar el estado de sequedad de la superficie de una epidermis no patológica o incluso la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico dirigido a caracterizar cualitativamente o cuantitativamente la expresión de la anexina II, de uno de sus derivados o fragmentos.

30 [0127] Estos procedimientos son particularmente ventajosos en la medida en que su ejecución no necesita recurrir obligatoriamente a una técnica operatoria para proceder a tal caracterización. Una muestra de la epidermis se puede obtener de este modo por simple "stripping" y se puede analizar directamente por una técnica de análisis convencional particularmente tal y como se describe previamente.

[0128] Un procedimiento de caracterización de un estado de sequedad de un epitelio, por ejemplo una epidermis, comprende al menos las etapas que consiste en:

35 a) determinar, en una muestra de dicho epitelio, un contenido de un polipéptido conforme a la invención, o de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, y

b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia.

40 [0129] Ventajosamente, un procedimiento de la invención es no invasivo.

[0130] Un procedimiento de la invención se efectúa ventajosamente sobre una muestra aislada.

45 [0131] Según una forma de realización, un procedimiento según la invención se puede efectuar sobre una muestra de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un individuo.

[0132] Un procedimiento según la invención se puede efectuar igualmente sobre una muestra de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un modelo celular epitelial, y particularmente epidérmico, o de una piel aislada reconstruida para calificar su estado.

50 [0133] La toma de una muestra de epitelio puede hacerse por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0134] Un procedimiento según la invención se puede efectuar *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

55 [0135] Un valor de referencia puede ser, por ejemplo, un contenido en polipéptido o en secuencia de ácidos nucleicos determinado sobre una muestra de epidermis tomada sobre un epitelio, y particularmente una piel normal, es decir, satisfactorio en el plano fisiológico, a la imagen por ejemplo de una piel hidratada.

[0136] La medida de un valor de referencia se puede efectuar paralelamente o secuencialmente para la determinación de dicho contenido de un polipéptido o de una secuencia de ácidos nucleicos.

60 [0137] Una comparación de un contenido determinado con un valor de referencia puede permitir evaluar una desviación con respecto a este valor.

65 [0138] El análisis de la intensidad y/o de la naturaleza de esta desviación (negativa o positiva) puede informar del estado de la epidermis.

[0139] La caracterización de un estado de sequedad de una epidermis puede ser indicativa de un eventual trastorno cutáneo que se puede corregir con el uso de compuestos que puedan modular la expresión de un polipéptido de la invención.

5 [0140] Según una forma de realización, un procedimiento según la invención se puede utilizar en un procedimiento de diagnóstico *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* de sequedad de un epitelio, y particularmente de la epidermis, de un individuo.

[0141] Un polipéptido adecuado para la ejecución de un procedimiento según la invención puede ser ventajosamente la anexina II.

10 [0142] La determinación de un contenido en polipéptido conforme a la invención o en ácidos nucleicos conforme a la invención en una muestra de epidermis se puede efectuar por cualquier protocolo conocido por el experto en la técnica.

15 [0143] La expresión de una secuencia de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, mediante sondas oligonucleótidas, por cualquier protocolo conocido por el experto en la técnica.

[0144] Como ejemplos de métodos de detección de secuencia de ácidos nucleicos, se pueden mencionar la reacción de polimerización en cadena, cuantitativa (Q-PCR) o no (PCR), en presencia (RT-PCR o Q-RT-PCR) o no de la transcriptasa inversa, el Northern blot, del método "ribonuclease protection assay", los métodos con chips de ADN, los métodos con chips transcriptómicos, los métodos con chips de oligonucleótidos, los métodos de hibridación *in situ*.

[0145] Como ejemplo de agentes convenientes para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos, y en particular de ARNm, se pueden mencionar sondas de ácidos nucleicos marcadas que se pueden hibridar con ayuda de dicha secuencia.

25 [0146] Tal sonda de ácido nucleico se puede obtener fácilmente por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0147] Así, las secuencias de ácidos nucleicos conforme a la invención se pueden utilizar para realizar los cebadores de oligonucleótidos sentido y/o anti-sentido, que se hibridan en condiciones de fuerte astringencia en la secuencia SEC ID N° 1 o un análogo de ésta.

[0148] La expresión de una secuencia de ácido nucleico conforme a la invención se puede comparar con un valor de referencia obtenido, por ejemplo, efectuando un procedimiento conforme a la invención en ausencia de compuesto para probar.

[0149] La expresión de una secuencia de ácido nucleico se puede determinar igualmente, de manera indirecta, por la determinación de la expresión del polipéptido codificado por dicha secuencia, mediante cualquier técnica conocida en el dominio, tal como Western-Blot, ELISA, el método de Bradford o de Lowry, o como se indica a continuación.

40 [0150] Una secuencia de ácido nucleico conveniente para la puesta en práctica de un procedimiento según la invención puede ser ventajosamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifique para la anexina II, por ejemplo de tipo ARNm.

45 [0151] La determinación de un contenido de un polipéptido conforme a la invención se puede efectuar mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0152] Como ejemplos de métodos de detección de un polipéptido, se pueden mencionar el Western-blot, el Slot-blot, el Dot-blot, los métodos ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) de tipo singleplex o multiplex, los métodos de proteómico o de glicómico, de coloración de polipéptidos en un gel de poliacrilamida por un colorante a base de plata, por el azul de Coomassie o por el SYPRO, la inmunofluorescencia, la absorción de UV, métodos inmunohistoquímicos en microscopía tradicional, electrónica o confocal, de FRET (fluorescence resonance energy transfer/transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), los métodos de TR-FRET (time resolved FRET/FRET con resolución temporal), los métodos de FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy/microscopía de fluorescencia de tiempo de vida), los métodos de FSPIM (fluorescence spectral imaging microscopy/microscopía espectral de fluorescencia), los métodos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching/recubrimiento de fluorescencia después de fotoblanqueamiento), los métodos por gen reportero, los métodos de AFM (atomic force microscopy/microscopía por fuerza atómica), los métodos de resonancia plasmónica de superficie, los métodos de microcalorimetría, los métodos de citometría de flujo, los métodos de biosensores, los métodos de radioinmunoensayos (RIA), los métodos de focalización isoelectrónica, y las pruebas enzimáticas, los métodos que utilizan chips a péptidos, los chips de azúcar, los chips de anticuerpos, los métodos de espectrometría de masa, los métodos de espectrometría de tipo SELDI-TOF (Ciphergen).

60 [0153] Los procedimientos conforme a la invención se pueden efectuar sobre una muestra, por ejemplo aislada, de epitelio, particularmente de epidermis, obtenida a partir de una biopsia cutánea o de un modelo celular epitelial, por ejemplo epidérmico o más ventajosamente de un muestreo de superficie no invasivo, particularmente por adhesivo ("tape stripping") del estrato corneo o por simple lavado.

[0154] Una toma de una muestra de epidermis se puede hacer por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

5 [0155] Estos métodos se pueden efectuar por técnicas denominadas "stripping".

[0156] Estos *strippings* son superficies adhesivas aplicadas a la superficie de la epidermis como el Blenderm[®] de 3M, el D'squam (adhesivo comercial de CuDERM), el pegamento cianoacrilato o el método del esmalte de "stripping". Gracias a estos "stripping", los corneocitos se adhieren y el contenido de sus espacios intercelulares se pueden tomar y someter después a una extracción que permite tener acceso al contenido proteico.

10 [0157] La toma de una muestra conveniente para el procedimiento se puede efectuar también de manera más directa por "lavados" de la superficie cutánea, mediante por ejemplo accesorios de tipo turbina de aleta, de tipo célula de espiral (como se describe en la patente FR 2 667 778) asociada a un circuito fluidoico, o sencillamente por adición/extracción de una gota de tampón en la superficie de la piel.

15 [0158] A título indicativo, otros métodos de toma adaptados para la realización de la invención se pueden mencionar, tales como los métodos por raspado de la parte superior del estrato corneo a través de un sistema de biláminas. Esta técnica permite recoger las escamas que se pueden analizar a continuación directamente por diferentes técnicas para determinar los índices de minerales, aminoácidos o lípidos.

[0159] Igualmente, se puede considerar detectar la presencia de un polipéptido conforme a la invención a través de un anticuerpo, en su caso bajo una forma marcada.

20 [0160] Un anticuerpo que se puede utilizar como herramienta de evaluación de un estado de una epidermis se puede obtener por cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, como se describe en "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). De manera ventajosa, los anticuerpo utilizados pueden ser anticuerpos recombinantes, tales como los desarrollados por la empresa Antibodies-by-design.

30 [0161] La presente invención se refiere también a un procedimiento, no terapéutico, para resaltar un efecto de un tratamiento que puede remitir los signos de sequedad de un epitelio, particularmente las sensaciones de pruritos y/o de tirantez, de un individuo, que comprende al menos las etapas que consisten en:

35 a) efectuar, antes del tratamiento, al menos una primera determinación, en una primera muestra de un epitelio tomado de dicho individuo, de una actividad biológica y/o de la expresión de un polipéptido conforme a la invención, o de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido,

40 b) efectuar, después del tratamiento, al menos una segunda determinación, en una segunda muestra de un epitelio tomado de dicho individuo, de dicha actividad biológica y/o de dicha expresión de dicho polipéptido o de dicha expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos determinados en la etapa a), y

c) comparar las primera y las segundas determinaciones, particularmente para deducir una información relativa a un efecto al menos del tratamiento.

45 [0162] Tal tratamiento puede ser en particular un tratamiento cosmético.

[0163] En particular, el tratamiento cuyo efecto se va a evaluar puede ser un tratamiento para aliviar o reducir los signos de sequedad cutánea.

50 [0164] La actividad biológica de un polipéptido conocido por el experto en la técnica, por ejemplo y de manera no limitativa, se pueden mencionar los métodos de cultivo celular seguidos de una caracterización de marcadores de diferenciación, tales como por ejemplo la queratina 10, la filagrina o marcadores de proliferación tales como por ejemplo KI 67 y PCNA.

55 [0165] Ventajosamente, un polipéptido utilizado en un procedimiento según la presente invención puede ser la anexina II.

[0166] La expresión de un polipéptido se puede determinar como se indica anteriormente.

60 [0167] El presente texto describe un procedimiento de tratamiento cosmético de los signos de sequedad cutánea que consta al menos de una etapa que consiste en aplicar sobre una parte al menos de la piel, las mucosas y/o las fibras queratínicas, al menos una composición cosmética descrita en el presente texto.

65 [0168] En el sentido de la presente invención, "uno" debe entenderse, excepto si se indica lo contrario, en el sentido de "al menos uno".

[0169] Los ejemplos que figuran a continuación se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Ejemplo I

5

Análisis de la expresión de la anexina II en un estrato corneo seco vs. un estrato corneo normalmente hidratado

[0170] Los análisis se realizan a partir de muestras tomadas por esmaltes de "strippings" efectuados sobre las piernas de diferentes individuos.

10

[0171] Los sujetos que se prestan al estudio se reagrupan en 4 grupos.

[0172] El grupo AS corresponda al grupo 1: menopáusicas secas n=15.

15

[0173] El grupo AN corresponde al grupo 2: menopáusicas normales n=13.

[0174] El grupo JS corresponde al grupo 3: jóvenes secas n=16.

20

[0175] El grupo JN corresponde al grupo 4: jóvenes normales n=14.

[0176] La selección de los sujetos en uno o en otro grupo se hace sobre la base a la valoración visual, por un experto, del estado de sequedad cutánea de cada individuo en las piernas.

25

[0177] La comparación con un atlas fotográfico ha permitido atribuir a cada individuo un marcador clínico de sequedad cutánea según el calificador y la escala siguientes:

- marcador 0: piel normal; la piel presenta un relieve cutáneo regular y un aspecto liso,

30

- marcador 1: piel deshidratada; la piel presenta un relieve cutáneo estriado y un aspecto bastante áspero,

- marcador 3: piel muy seca; la piel presenta numerosas escamas y algunas costras, así como un aspecto rugoso, y

35

- marcador 4: piel extremadamente seca; la piel presenta muchas costras y un aspecto muy rugoso.

1: Preparación de polvos acetónicos

40

[0178] Dos esmaltes de "strippings" (B. Meuhl *et al.*, J Biol Chem 2000, Apr 28; 275(17): 12841-7) de 10 cm² se introducen en 20 ml de acetona. Los corneocitos se despegan. La mezcla se filtra sobre la membrana de nilón de 40 µm. Tres aclarados sucesivos se realizan con el mismo volumen de acetona. La suspensión se filtra finalmente con bomba de vacío. Se obtienen polvos acetónicos de estrato corneo en forma seca.

2: Extracción de las muestras

45

[0179] Se procede a una extracción en condiciones desnaturalizantes. Para ello, se realiza un prelavado con un volumen (100 µl) de tampón PBS (Phosphate Buffer Saline) +0,1 % de Triton X100 que se agrega por mg de polvos acetónicos. La mezcla se tritura en el potter y se centrifuga. El sedimento de corneocitos se recoge. Se extrae con un mismo volumen (100 µl/mg) de tampón Laemmli 0,0625 mM Tris pH 6,8, 200 mM de DIT, 2 % de SDS, 10 % de glicerol. La mezcla se lleva a ebullición durante 10 minutos, luego se tritura y centrifuga 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante se recoge. Una dosificación de proteínas se realiza según la técnica de Bradford con el reactivo Bradford (Bio-Rad Protein assay). Las muestras se ajustan a 1 mg/ml.

50

3: Análisis de las proteínas por Western-blot

55

[0180] Las proteínas se separan por electroforesis SDS-PAGE. Después de la transferencia semi seca sobre membrana de PVDF (Immobilon-P Milipore) según un protocolo estándar, las proteínas se incuban con el anticuerpo primario antianexina II (BD Biosciences, 610068) toda la noche a 4 °C. Luego la segunda incubación tiene lugar con el anticuerpo secundario (Goat anti mouse IgG-HRP conjugate; Bio-Rad) dirigido contra el anticuerpo primario 1h30 a temperatura ambiente. La presencia de la anexina II sobre la membrana se revela por inmunodetección con ayuda del kit ECL plus (Amersham). La membrana se colorea a continuación colorada con Amidoblack para detectar las proteínas totales presentes en la membrana. La imagen es adquirida en el FluorSmax (Biorad) y las bandas son cuantificadas con ayuda del software Quantity-one (Biorad).

60

4: Resultados

65

[0181] Los resultados se expresan en delta cnt*mm² de la proteína de interés/delta cnt*mm² de las proteínas totales.

Metodología:

[0182]

5 - análisis de variación a 2 factores Edad y Tipo de piel que tienen en cuenta la interacción de estos dos factores + análisis de variación de 1 factor (grupo) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las condiciones de normalidad y de homocedasticidad no se verifican, el análisis se realizó después de la transformación logarítmica.

[0183] El análisis estadístico se efectuó con los programas SAS versión 8.2 y SPSS versión 12.

10

[0184] Todas las pruebas se realizaron en el umbral bilateral del 5 %.

[0185] La siguiente tabla retoma los resultados promediados así como sus desviación estándar de la media (sem).

15

grupo	anexina II	sem anexina II
AS	441	165
AN	154	21
JS	221	55
JN	135	29

[0186] Cabe destacar una variación significativa de la expresión de la anexina II según la tipología de la piel: de hecho, su expresión aumenta significativamente en los grupos "pieles secas" (JS y AS), en comparación con los grupos "pieles normales" (JN y AN) ($p = 0,006$).

20

Lista de Secuencias

25

[0187]

SEC ID N° 1

1 gggacgctct cagctctcgg cgcacggccc aggttatctt gtagcatage aacttcggat
61 ttcactctac ccggagagtt tcccgcttgg ttgaacacat tggcctcagg aagcttcctt
121 caaaatgtct actgttcacg aaatcctgtg caagctcagc ttggagggtg atcactctac
181 accccaagt gcatatgggt ctgtcaaagc ctatactaac tttgatgctg agcgggatgc
241 tttgaacatt gaaacagcca tcaagaccaa aggtgtggat gaggtcacca ttgtcaacat
301 tttgaccaac cgcagcaatg cacagagaca ggatattgcc ttcgcctacc agagaaggac
361 caaaaaggaa cttgcatcag cactgaagtc agccttatct ggccacctgg agacggtgat
421 tttgggccta ttgaagacac ctgctcagta tgacgcttct gagctaaaag cttccatgaa
481 ggggctggga accgacgagg actctctcat tgagatcatc tgctccagaa ccaaccagga
541 gctgcaggaa attaacagag tctacaagga aatgtacaag actgatctgg agaaggacat
601 tatttcggac acatctgggt acttccgcaa gctgatgggt gccctggcaa agggtagaag
661 agcagaggat ggctctgtca ttgattatga actgattgac caagatgctc gggatctcta
721 tgacgctgga gtgaagagga aaggaactga tgttcccaag tggatcagca tcatgaccga
781 gcggagcgtg ccccacctcc agaaagtatt tgataggtac aagagttaca gcccttatga
841 catggttgaa agcatcagga aagaggttaa aggagacctg gaaaatgctt tcctgaacct
901 ggttcagtg c attcagaaca agcccctgta ttttgctgat cggctgtatg actccatgaa
961 gggcaagggg acgcgagata aggtcctgat cagaatcatg gtctcccgca gtgaagtgga
1021 catggtgaaa attaggtctg aattcaagag aaagtacggc aagtccctgt actattatat
1081 ccagcaagac actaagggcg actaccagaa agcgcctgctg tacctgtgtg gtggagatga
1141 ctgaagcccg acacggcctg agcgtccaga aatgggtgctc accatgcttc cagctaacag
1201 gtctagaaaa ccagcttgcg aataacagtc cccgtggcca tccctgtgag ggtgacgtta
1261 gcattacccc caacctcatt ttagttgcct aagcattgcc tggccttctt gtctagtctc
1321 tcctgtaagc caaagaaatg aacattccaa ggagttggaa gtgaagtcta tgatgtgaaa
1381 cactttgcct cctgtgtact gtgtcataaa cagatgaata aactgaattt gtactttaaa
30 1441 aaaaaaaaa aaaaaa

SEC ID N° 2

1 MSTVHEILCK LSLEGDHSTP PSAYGSVKAY TNFDAERDAL NIETAIKTKG VDEVTIVNIL
61 TNRSNAQRQD IAFAYQRRTK KELASALKA LSGHLETVIL GLLKTPAQYD ASELKASMKG
121 LGTDEDSLIE IICSR TNQEL QEINRVYKEM YKTDLEKDII SDTSGDFRKL MVALAKGRRRA
181 EDGSVIDYEL IDQDARDLYD AGVKRKGTDV PKWISIMTER SVPHLQKQVFD RYKSYSPYDM
241 LESIRKEVKG DLENAFLNLV QCIQNKPLYF ADRLYDSMKG KGTRDKVLIR IMVSRSEVDM
301 LKIRSEFKRK YGKSLYYYIQ QDTKGDYQKA LLYLCGGDD

5

SEC ID N° 3
AEDGSVIDYELIDQDAR

10 SEC ID N° 4
AYTNFDAER

SEC ID N° 5
AYTNFDAERDAL

15 SEC ID N° 6
DAERDALNIET

20 SEC ID N° 7
DALNIETAIK

SEC ID N° 8
DALNIETAIKTK

25 SEC ID N° 9
DIISDTSGDFR

SEC ID N° 10
DLYDAGVK

30 SEC ID N° 11
DLYDAGVKR

SEC ID N° 12
EGDHSTPPSAYGSVK

35 SEC ID N° 13
ELASALK

40 SEC ID N° 14
ELIDQDARDL

SEC ID N° 15
GDLENAFLNLVQCIQNKPLYFADR

45 SEC ID N° 16
GLGTDEDSLIEIICSR

SEC ID N° 17
GTDEDSLIEIICSR

50 SEC ID N° 18
GVDEVTIVNI

55 SEC ID N° 19
GVDEVTIVNIL

SEC ID N° 20
GVDEVTIVNILTNR

- SEC ID N° 21
HSTPPSAYGSVKA
- 5 SEC ID N° 22
HSTPPSAYGSVKAY
- SEC ID N° 23
LMVALAK
- 10 SEC ID N° 24
LSLEGDHSTPPSAYGSVK
- SEC ID N° 25
NKPLYFADR
- 15 SEC ID N° 26
QDIAFAYQR
- SEC ID N° 27
RAEDGSVIDYELIDQDAR
- 20 SEC ID N° 28
SALSGHLETVIL
- SEC ID N° 29
SALSGHLETVILGLLK
- 25 SEC ID N° 30
SEVDMLK
- 30 SEC ID N° 31
SLYYYIQQDTK
- SEC ID N° 32
SLYYYIQQDTKGDYQK
- 35 SEC ID N° 33
STPPSAYGSVKAY
- SEC ID N° 34
STPPSAYGSVKAYTNF
- 40 SEC ID N° 35
STVHEILCK
- 45 SEC ID N° 36
SYSPYDMLESIR
- SEC ID N° 37
TDLEKDIISDTSGDFR
- 50 SEC ID N° 38
TNFDAERDALNIETAIKTK
- SEC ID N° 39
TNQELQEINR
- 55 SEC ID N° 40
TPAQYDASELK
- 60 SEC ID N° 41
WISIMTER
- SEC ID N° 42
YTNFDAER
- 65

ES 2 536 416 T3

SEC ID N° 43
YIQQDTKGDYQKAL

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para caracterizar un estado de sequedad de un epitelio que consta al menos de las etapas que consisten en:

5

a) determinar en una muestra de dicho epitelio un contenido de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de ésta que tiene al menos 85 % de homología de secuencia así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de ésta que consta al menos de 6 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido así como una actividad biológica de la misma naturaleza o de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido, y

10

b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia.

15

2. Procedimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado por el hecho de que** no es invasivo.

3. Procedimiento, no terapéutico, para mostrar un efecto de un tratamiento que puede provocar una regresión de los signos de sequedad de un epitelio, particularmente las sensaciones de pruritos y/o de tirantez, en un individuo, que consta al menos de las etapas que consisten en:

20

a) efectuar, antes del tratamiento, al menos una primera determinación, en una primera muestra de un epitelio tomada de dicho individuo, de una actividad biológica y/o de la expresión de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia representada por SEC ID N° 1, un análogo de la misma que tiene al menos 85 % de homología de secuencia así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de ésta que consta de al menos 6 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido así como una actividad biológica de la misma naturaleza o de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido,

25

b) efectuar, después del tratamiento, al menos una segunda determinación, en una segunda muestra de un epitelio tomada de dicho individuo, de dicha actividad biológica y/o de dicha expresión de dicho polipéptido o de dicha expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos determinados en la etapa a), y

30

c) comparar la primera y la segunda determinaciones, particularmente para deducir una información relacionada con un efecto al menos del tratamiento.

35

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia representada por SEC ID N° 2, un análogo de ésta que tiene al menos 85 % de homología de secuencia así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de ésta que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido así como una actividad biológica de la misma naturaleza.

40

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 29, SEC ID N° 30, SEC ID N° 31, SEC ID N° 32, SEC ID N° 33, SEC ID N° 34, SEC ID N° 35, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, SEC ID N° 38, SEC ID N° 39, SEC ID N° 40, SEC ID N° 41, SEC ID N° 42 y SEC ID N° 43.

45