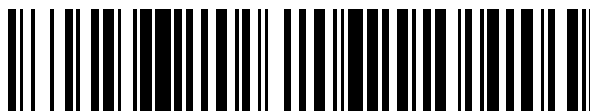


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 186**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2010 E 10150607 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2209006**

54 Título: **Uso para fines de cribado de activos anti-envejecimiento de formas solubles de la proteína del tipo desmogleína I**

30 Prioridad:

13.01.2009 FR 0950159
27.01.2009 US 202078 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2016

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR

72 Inventor/es:

DONOVAN, MARK;
SIMONETTI, LUCIE y
BERNARD, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 564 186 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 para fines de cribado de activos anti-envejecimiento de formas solubles de la proteína del tipo desmogleína I

- 5 [0001] La presente patente describe el uso de formas peptídicas solubles, complejadas o no, que derivan al menos en parte de la desmogleína I, para caracterizar la eficacia de activos potenciales con respecto a una epidermis que muestra uno o más signos de envejecimiento cutáneo.
- 10 [0002] Los epitelios son los tejidos cuyas células son contiguas y cohesivas las unas con respecto a las otras y descansan sobre una membrana basal. Forman un revestimiento bien externo, por ejemplo en la superficie de la piel, o la epidermis, bien interno, en la superficie de una mucosa. También pueden formar glándulas.
- 15 [0003] Más precisamente, estos epitelios son estructuras cuya homeóstasis es el resultado de la ejecución de un conjunto, finamente regulado, de señales intracelulares y extracelulares que actúan en todas las etapas de la proliferación, la migración, la diferenciación celular, así como la síntesis de diferentes componentes de la matriz extracelular. Estas señales pueden, especialmente, ser el resultado de la acción de factores producidos por los queratinocitos.
- 20 [0004] El mantenimiento de las buenas funciones fisiológicas de un epitelio implica especialmente la diferenciación epitelial terminal y/o la síntesis de proteoglicanos.
- 25 [0005] En lo que se refiere de forma más particular a la epidermis, se trata de un epitelio, convencionalmente dividido en una capa basal de queratinocitos que contienen, especialmente, células madre cutáneas y constituyen la capa germinativa de la epidermis, una capa llamada espinosa constituida por varias capas de células poliédricas dispuestas sobre la capa basal, una capa denominada granulosa que comprende de una a tres capas denominadas de células aplanadas que contienen inclusiones citoplásmicas independientes, los granos de queratohialina, y por último, un conjunto de capas superiores, denominadas capa córnea (o estrato corneo) constituida por queratinocitos en la fase terminal de su diferenciación llamados corneocitos.
- 30 [0006] El estrato corneo, la parte más externa de la piel que asegura la función barrera entre el organismo y el entorno, y el tallo capilar, parte emergente del folículo piloso que constituye el vello, representan ambos la culminación del proceso de diferenciación de los queratinocitos. La diferenciación epidérmica sigue un proceso de maduración en el que los queratinocitos de la capa basal se diferencian y migran para acabar en la formación de los corneocitos, células muertas totalmente queratinizadas. Esta diferenciación es el resultado de fenómenos perfectamente coordinados que
- 35 llevarán al mantenimiento de un espesor constante y asegurarán así la homeóstasis de la epidermis.
- [0007] Muchos trastornos o patologías cutáneas pueden producirse debido a una disfunción de la homeóstasis de la epidermis.
- 40 [0008] En el caso de la piel madura, esta disfunción se manifiesta habitualmente por la aparición de arrugas (microrrelieve y arrugas profundas), una pérdida de la elasticidad, un tacto rugoso y una sequedad. Histológicamente, se observa un aplastamiento de la unión dermoepidérmica y una disminución del espesor de la dermis y de la epidermis. El contenido de colágeno y de glicosaminoglicanos disminuye. La función barrera de la piel se altera. El conjunto de estos fenómenos se acrecenta por la exposición solar crónica.
- 45 [0009] Igualmente, esta disfunción se puede exacerbar en el caso de las mujeres durante la menopausia.
- [0010] Se sabe hoy en día que estas disfunciones pueden estar especialmente asociadas a una modulación diferente de la expresión y/o de la actividad biológica de ciertas proteínas expresadas en el estrato corneo. Este es en especial el
- 50 caso de la desmogleína I.
- [0011] La desmogleína I (también denominada DGI) es una glicoproteína transmembrana que comprende en su forma preproteína 1049 aminoácidos y presenta un peso molecular de aproximadamente 114 kDa a 150 kDa, según sea o no glicosilada. Además de los sitios de glicosilación sobre los residuos de asparagina en la posición 36,110 y 180, la secuencia de esta proteína comprende igualmente los sitios de enlace al calcio.
- 55 [0012] Esta proteína está relacionada con las cadherinas y pertenece a una familia de proteínas que comprende igualmente las desmogleínas II y III. La DGI se presenta únicamente en las desmosomas de cuya estructura es uno de los elementos principales.
- 60 [0013] El documento US 2004/0142335 señala, por medio de un análisis transcriptómico, un aumento de la expresión del ARNm que codifica para la proteína desmogleína I en una piel de un individuo maduro en comparación con la de un individuo joven. Este documento no menciona ninguna forma peptídica soluble de la desmogleína I.

[0014] El documento Haratake *et al.* (2006; Skin Pharmacol. Physiol. 19:275-282) muestra un aumento de la expresión de la desmogleína I, a nivel proteico, en la piel madura de un modelo murino.

[0015] Más recientemente, los inventores han constatado por su parte, un aumento significativo en la expresión de la desmogleína I, y por lo tanto una acumulación de esta última en el estrato corneo, a lo largo del envejecimiento cronológico de la epidermis. El nivel de expresión de la desmogleína I en el estrato corneo constituye por lo tanto un índice útil para caracterizar el estado fisiológico de la piel, particularmente en términos de envejecimiento.

[0016] La presente invención es el resultado, por su parte, de la caracterización por parte de los inventores, en un estrato corneo humano que ha sufrido un tratamiento de tipo exfoliación, de formas peptídicas solubles, distintas de la desmogleína I pero que derivan manifiestamente de ésta. Se puede pensar que las formas peptídicas caracterizadas por los inventores provienen al menos en parte de la proteólisis de la desmogleína I.

[0017] En particular, una forma peptídica soluble de la invención es diferente de la secuencia completa de la desmogleína I, a saber SEC ID N° 2.

[0018] El documento JP 2006/006143 describe el uso de péptidos resultantes de la proteólisis de la desmogleína I para cribar las actividades de tipo "toxinas exfoliativas".

[0019] Como se puede extraer de lo siguiente, estas formas peptídicas solubles, complejadas o no, de esta proteína han sido caracterizadas por los inventores gracias al desarrollo de una técnica de dosificación ELISA específica, particularmente descrita en el ejemplo 1, a continuación.

[0020] En consecuencia, estas formas solubles se divulgan como una herramienta particularmente interesante para cribar los activos anti-envejecimiento, incluso caracterizar la eficacia de un tratamiento para prevenir y/o tratar el envejecimiento cutáneo particularmente a través de una acción, probablemente de tipo degradación, con respecto a la acumulación de la desmogleína I en el estrato corneo, constatada por el envejecimiento cutáneo.

[0021] En ambos casos, la eficacia del activo o del tratamiento en cuestión se verifica mediante un aumento de la liberación de al menos una, incluso de varias de las formas solubles en cuestión según la invención.

[0022] La presente patente describe el uso de al menos una forma peptídica soluble, complejada o no, derivada al menos en parte de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por toda o parte de la SEC ID N° 1, o un análogo de ésta, como herramienta de criba de activos útiles para prevenir y/o tratar el envejecimiento cutáneo.

[0023] Según la invención, una forma peptídica soluble adecuada para la invención no está representada por la secuencia SEC ID N° 2.

[0024] Un aumento de la cantidad en estas formas peptídicas solubles es un índice de la eficacia de un tratamiento anti-envejecimiento.

[0025] En particular, una detección de una presencia o de un aumento de un contenido en dicha/dichas forma(s) peptídica(s) es indicativo de un activo dotado de propiedades útiles para prevenir y/o tratar el envejecimiento cutáneo.

[0026] La invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de criba de activos que incluye al menos las etapas que consisten en:

a) poner en contacto, al menos un tipo celular capaz de liberar al menos una forma soluble complejada o no, derivada de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2, con al menos un activo anti-envejecimiento que se va a evaluar, en condiciones propicias para una liberación de dicha forma peptídica soluble,

b) determinar un contenido de dicha forma peptídica soluble, y

c) comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma soluble determinada en ausencia del compuesto químico o biológico que se va a evaluar,

donde una detección o una caracterización de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho activo.

[0027] La invención se refiere también a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico, en un individuo, dirigido a prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo relacionados con el envejecimiento cronológico, que incluye al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de al menos una forma peptídica soluble complejada o no, derivada de la proteólisis del polipéptido que tiene secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2, donde una detección o una caracterización de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho tratamiento.

[0028] Ventajosamente, se puede realizar, además, tras la etapa c), una etapa de selección del activo o de los activos mediante el cual o los cuales se observa un aumento del contenido en forma(s) soluble(s).

[0029] La presente patente describe también un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico, en un individuo, dirigido a prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo relacionados con el envejecimiento cronológico, tal como las líneas de expresión y las arrugas, que incluye al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de al menos una forma peptídica soluble de la desmogleína I según la invención.

[0030] En particular, según el procedimiento de la invención, una detección o una caracterización de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica es indicativo de una eficacia de dicho activo o de dicho tratamiento.

[0031] Uno de los procedimientos previamente descritos puede comprender, además, tras la etapa de caracterización de al menos una forma peptídica soluble de la desmogleína I, al menos una etapa complementaria que consista en administrar al individuo evaluado, una composición de cuidado, particularmente cosmético, establecida o seleccionada según la información obtenida sobre dicha forma soluble. En particular, dicha etapa complementaria puede ser consecutiva a la etapa de caracterización.

[0032] Tal composición se puede seleccionar de entre una gama de composiciones, cada una adaptada a un tipo de información que se puede obtener tras la etapa de caracterización.

[0033] Así, se describe, por una parte, un procedimiento sencillo y rápido para caracterizar un estado fisiológico de un epitelio y en particular de la epidermis de la piel, y por otra parte, para ajustar en consecuencia un tratamiento adecuado para dicho epitelio o epidermis.

[0034] Por signos de envejecimiento cutáneo se entienden todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debidas al envejecimiento cronológico, como por ejemplo las líneas de expresión y las arrugas, la piel marchita, el falta de elasticidad y/o de tono de la piel, el adelgazamiento de la dermis y/o la degradación de las fibras de colágeno, lo que comporta la apariencia de piel blanda y arrugada.

[0035] Más precisamente, el procedimiento, no terapéutico, como se ha definido anteriormente, busca caracterizar la eficacia de un tratamiento susceptible de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo en un individuo, que incluye al menos las etapas que consisten en:

- i. disponer de al menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
- ii. cuantificar en dicha muestra, particularmente a través de una técnica de dosificación ELISA, en particular como se describe en el ejemplo 1 siguiente, al menos una forma peptídica soluble complejada o no, derivada al menos en parte de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2.
- iii. repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y
- iv. comparar los resultados obtenidos tras las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de obtener una información relativa a al menos un efecto del tratamiento,

donde la detección a la etapa iv) de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho tratamiento, y dichas primera y segunda muestras de superficie cutánea corresponden a estadios de tratamiento diferentes.

[0036] El valor o dato de referencia de la etapa ii. puede ser un dato obtenido a partir del epitelio, particularmente de la epidermis representativa del individuo objeto del tratamiento, antes de la administración de dicho tratamiento.

[0037] Según una forma de realización preferida, la primera muestra representa un estado pretratamiento y la segunda representa un estado durante el tratamiento o post-tratamiento.

[0038] Una detección en la etapa iv. de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble refleja una eficacia de dicho tratamiento.

[0039] Según otra forma más de realización, un procedimiento de la invención puede comprender, además, una etapa que consiste en ajustar en dicho individuo dicho tratamiento por administración de una composición de cuidado cosmético establecido o seleccionado con respecto a la información obtenida tras la etapa iv.

[0040] Según aún otro aspecto, la presente invención describe igualmente el uso de al menos una forma peptídica soluble conforme a la invención, como herramienta de criba de compuestos biológicos o químicos que pueden actuar frente a la desmogleína I y particularmente degradarla, y en consecuencia capaces de inducir y de favorecer la liberación de las formas solubles de la desmogleína I.

[0041] La caracterización de estas formas solubles puede igualmente ser útil para establecer un diagnóstico del estado de una epidermis.

[0042] Así, la presente patente describe el uso de una forma peptídica soluble según la invención, como herramienta de caracterización *in vitro* o *ex vivo* de un estado de un epitelio, particularmente de un estado de un envejecimiento

cronológico de un epitelio, la detección de una presencia o de una disminución de un contenido de dicha/dichas forma(s) peptídica(s) es indicativa de un estado de envejecimiento cronológico de un epitelio.

[0043] La presente patente describe, según otro de sus aspectos, un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar, particularmente *in vitro* o *ex vivo*, el estado cronológico de una epidermis, que incluye al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de formas peptídicas solubles de la desmogleína 1 según la invención.

[0044] Este procedimiento de caracterización de un estado de un epitelio incluye al menos las etapas que consisten en:
a) determinar en una muestra de superficie de dicho epitelio, particularmente a través de una técnica de dosificación ELISA, un contenido de al menos una forma peptídica soluble conforme a la invención, y
b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un dato de referencia.

[0045] Según una variante de realización, el dato o valor obtenido se puede apreciar comparativamente con un dato o dato de referencia, obtenido por ejemplo a partir de al menos un epitelio, particularmente una epidermis, distinta de la que hace objeto de la caracterización, y cuyo estado se conoce.

[0046] Los procedimientos de la invención se puede efectuar *in vitro* o *ex vivo*.

[0047] Como se puede inferir de la descripción siguiente, los procedimientos según la invención son particularmente ventajosos en tanto en cuanto su ejecución no requiere un procedimiento invasivo.

[0048] De hecho, la localización por los inventores de estos nuevos biomarcadores en el estrato córneo hace posible una caracterización cuantitativa o cualitativa de la expresión de éstos mediante una sencilla extracción tópica.

[0049] De manera ventajosa, se puede realizar sobre una muestra de estrato corneo del sujeto en cuestión, sencillamente tomada por "*stripping*". El método de extracción puede ser por ejemplo una técnica de tipo *stripping* que consiste en aplicar sobre el epitelio en cuestión, tal como una epidermis, una porción 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 continuación mediante una prueba ELISA tal y como se considera en la presente invención.

[0050] La presente patente describe igualmente el uso de una cantidad eficaz de forma(s) peptídica(s) soluble(s) según la invención, para la preparación y/o la mejora de un modelo celular pluriestratificado, en particular un modelo de piel reconstruida.

[0051] Para los fines de la presente descripción, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad mínima necesaria para obtener el efecto esperado.

[0052] Según otro aspecto más, la presente invención describe un procedimiento de preparación de una piel reconstruida aislada que incluye al menos la etapa que consiste en poner en contacto al menos una forma peptídica soluble según la invención con células susceptibles de generar una piel reconstruida aislada, y particularmente queratinocitos.

Definición de "formas solubles" de la desmogleína I

[0053] Para fines de la presente invención, el término "soluble" pretende calificar la facultad de la forma peptídica, complejada o no, y considerada según la invención, para solubilizarse en agua o en un medio acuoso sin sustancias desnaturizantes de las proteínas, tales como los agentes caotrópicos o los detergentes iónicos por ejemplo, por oposición a la desmogleína I nativa, únicamente extraíble en presencia de tales agentes.

[0054] Para fines de la presente invención, el término "complejada" se refiere a un conjugado soluble de una de las formas peptídicas según la invención, bien con una proteína diferenciada de la desmogleína I o un fragmento de esta proteína, bien con otra forma soluble de la proteína desmogleína I o uno de sus derivados.

[0055] Para fines de la presente invención, el término "derivado de la proteína desmogleína I" designa un fragmento de ésta o un análogo, como se define a continuación.

[0056] Estas formas complejadas solubles pueden ser el producto resultante de la asociación de la proteína desmogleína I o uno de sus fragmentos con una proteína anexa, también llamada proteína objetivo.

[0057] A modo ilustrativo de estas proteínas susceptibles de interactuar con la desmogleína I y/o uno de sus fragmentos, se pueden citar particularmente la desmocolina 2a (Dsc2), las placofilinas 1, 2 y 3, la placoglobina, la calicreína 5, la hormona del crecimiento 1 (GH1), la SSSCA1 (Centromeric Autoantigen 27 kD), la RuvB-like 1, la proteína C3orf10 y la VRK3 (Vaccinia related kinase 3).

[0058] Como se ha precisado previamente, las formas solubles conforme a la invención derivan, al menos en parte, de la proteólisis de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por toda o parte de la SEC ID N° 1, o un análogo de la misma.

5 [0059] Para fines de la presente invención, "fragmento de secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica en parte el polipéptido a partir del cual derivan las formas solubles conforme a la invención, o análogos de las mismas, y en particular una secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID N° 1 o un análogo de la misma.

10 [0060] "Análogo de una secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a toda secuencia de ácidos nucleicos, eventualmente resultante de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y que codifica en parte unas formas solubles de secuencia idéntica o análoga a las codificadas en parte por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

15 [0060] "Análogo de una secuencia de ácidos nucleicos", se refiere a toda secuencia de ácidos nucleicos, eventualmente resultante de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y que codifica en parte unas formas solubles de secuencia idéntica o análoga a las codificadas en parte por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

20 [0061] Las secuencias de ácidos nucleicos pueden provenir de cualquier origen posible, ya sea animal, en particular de origen mamífero y aún más particularmente humano, vegetal, bien de microorganismos (virus, fagos, bacterias entre otros) o incluso de hongos, sin perjuicio del hecho de que estén presentes de manera natural o no en dicho organismo de origen.

[0062] Las formas solubles según la invención derivan de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2.

25 [0063] Para fines de la presente invención, nos referimos de manera general, a menos que se indique lo contrario, con desmogleína I, a la secuencia (SEC ID N° 2) de la proteína con o sin modificaciones post-traduccionales, de tipo N-acetilglucosilación sobre los residuos de asparagina en las posiciones 36,110 o 180, susceptibles de modificar su peso molecular aparente o su punto isoelectrico.

30 [0064] También se sabe que la secuencia primaria de un polipéptido, es decir el encadenamiento de los aminoácidos, determina los sitios específicamente reconocidos a través de enzimas de tipo proteasa, tales como la tripsina que, una vez es efectivo el reconocimiento de estos sitios, inducirán la división del polipéptido por proteólisis. Esta proteólisis da como resultado la generación de diversos péptidos, o fragmentos de proteólisis que, cuando están bajo una forma soluble, son representativos de las formas peptídicas solubles de la desmogleína I en cuestión según la invención.

35 [0065] Se describe igualmente un polipéptido a partir del cual derivan las formas solubles que tienen 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, SEC ID N° 43, SEC ID N° 44, SEC ID N° 45, SEC ID N° 46, SEC ID N° 47, SEC ID N° 48, SEC ID N° 49, SEC ID N° 50, SEC ID N° 51, SEC ID N° 52, SEC ID N° 53, SEC ID N° 54, SEC ID N° 55, SEC ID N° 56, SEC ID N° 57, SEC ID N° 58, SEC ID N° 59, SEC ID N° 60, SEC ID N° 61, SEC ID N° 62, SEC ID N° 63, SEC ID N° 64, SEC ID N° 65, SEC ID N° 66, SEC ID N° 67, SEC ID N° 68, SEC ID N° 69, SEC ID N° 70, SEC ID N° 71, SEC ID N° 72, SEC ID N° 73, SEC ID N° 74, SEC ID N° 75, SEC ID N° 76, SEC ID N° 77, SEC ID N° 78, SEC ID N° 79, SEC ID N° 80, SEC ID N° 81, SEC ID N° 82, SEC ID N° 83, SEC ID N° 84 y SEC ID N° 85 y sus mezclas.

50 [0066] "Análogo de un polipéptido", se refiere a todo polipéptido que presenta una homología de secuencia, en particular con respecto a una de las secuencias características de dicho polipéptido, al igual que una actividad biológica de la misma naturaleza. Este análogo puede ser un agente peptidomimético.

55 [0067] La homología puede ser de al menos 85%, por ejemplo de al menos 90% y por ejemplo de al menos 95 %. La homología puede determinarse por comparación visual o mediante cualquier herramienta informática que se use habitualmente en el campo, tales como los programas BLAST, disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov, y utilizados con los parámetros configurados por defecto.

60 [0068] La homología de secuencia puede producirse por modificaciones originadas por mutación o variación en las secuencias de los péptidos según la invención, que provienen bien de la eliminación o de la inserción de uno o más aminoácidos, bien de la sustitución de uno o más aminoácidos en las secuencias características de un polipéptido según la invención.

65 [0069] "Fragmento" se refiere a cualquier porción peptídica, que incluya al menos 4, al menos 6, en particular al menos 8, y particularmente al menos 12 aminoácidos consecutivos de la desmogleína I, y una actividad biológica

considerablemente similar. De manera general, los análogos polipeptídicos pueden comprender sustituciones conservadoras con respecto a la secuencia de aminoácidos natural.

[0070] Varias de estas modificaciones se pueden combinar.

[0071] Como ejemplo de mutaciones que se pueden tener en cuenta en la presente descripción, se pueden mencionar, de manera no exhaustiva, el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos que tienen un índice hidropático similar sin que afecte de manera sensible a las propiedades biológicas nativas de la desmogleína I.

[0072] 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).

[0073] Las formas solubles también consideradas en la presente descripción pueden derivar de polipéptidos que hayan sufrido una o varias modificación(es) post-traduccionales(es).

[0074] "Modificación(es) post-traduccionales(es)", engloba(n) el conjunto de las modificaciones que un péptido o una proteína puede sufrir tras su síntesis en una célula, tal y como por ejemplo una o más fosforilación(es), una o más tiolación(es), una o más acetilación(es), una o más glicosilación(es), una o más lipidación(es), 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.

[0075] El análogo presenta, además, considerablemente la misma actividad biológica que el polipéptido natural.

[0076] Según una forma de realización, las formas solubles adecuadas para la realización de la invención pueden ser también polipéptidos naturales o sintéticos, obtenidos después de la lisis enzimática o química de la forma nativa de la desmogleína I o por síntesis química o biológica o por extracción a partir de un tejido biológico, como por ejemplo la piel, que expresa naturalmente estas formas solubles, así como las diferentes formas post-traduccionales de los mismos.

[0077] Según una forma de realización, una forma soluble complejada conforme a la invención puede derivar de la asociación de la desmogleína I o uno de sus fragmentos bien con otra proteína desmogleína I o uno de sus fragmentos, bien con una proteína objetivo.

[0078] Un proteína de objetivo se puede elegir particularmente de entre la desmocolina 2a (Dsc2), las placofilinas 1, 2 y 3, la placoglobina, la calicreína 5, la hormona del crecimiento 1 (GH1), la SSSCA1 (Centromeric Autoantigen 27 kD), la RuvB-like 1, la proteína C3orf10, y la VRK3 (Vaccinia related kinase 3).

[0079] El experto en la técnica puede obtener las formas solubles según la invención mediante procedimientos a base de ADN recombinante, como por ejemplo, los descritos en el manual "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2ª edición), Sambrook *et al.*, 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY, (Sambrook).

[0080] Según otra forma de realización, las formas solubles adecuadas para la realización de la invención pueden igualmente presentarse bajo una forma fusionada con otro polipéptido distinto de los identificados previamente, un agente de cribado hidrofílico o hidrófobo, un precursor de bioconversión, un agente de marcación luminiscente, radioactivo o colorimétrico.

[0081] De manera no limitativa, se pueden citar como ejemplo de compuestos susceptibles de ser acoplados con las formas solubles según 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®, compuestos fosforescentes, elementos radioactivos, tales como ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{121}I o ^{125}I , o agentes de marcación colorimétrica tales como los sustratos cromógenos sensibles a la acción de la galactosidasa, de la peroxidasa, del cloranfenicol acetiltransferasa, de la luciferasa o de la fosfatasa alcalina.

[0082] Según la naturaleza de los compuestos que se pueden acoplar con las formas solubles según la invención, el acoplamiento se puede realizar a través de procedimientos químicos, particularmente mediante funciones químicas reactivas o a través de procedimientos de biología molecular conocidos por el experto en la técnica.

[0083] Como 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 poliácridamida por un colorante a base de plata, por el azul de Coomassie o por el SYPRO, la inmunofluorescencia, la absorción 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 en resolución de tiempo), los métodos de FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy/conjunto de imágenes por microscopía del tiempo de fluorescencia), los métodos de FSPIM (fluorescence spectral imaging microscopy/conjunto de imágenes por microscopía en espectro de fluorescencia), los métodos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching/recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo), los métodos por gen portador, 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 en flujo, los métodos de biosensores, los métodos de radioinmuno ensayos (RIA), los métodos de focalización isoelectrica y las pruebas enzimáticos, los métodos que utilizan chips de péptidos, los chips de azúcar, los chips de anticuerpos, los métodos de espectrometría de masa, los métodos de espectrometría de tipo SELDI-TOF (Ciphergen).

[0084] Como se desprende de lo anterior, las formas solubles consideradas según la invención son ventajosamente caracterizadas por un método ELISA y particularmente por el descrito en el ejemplo 1 a continuación.

Uso de las formas solubles según la invención, con el fin de cribar activos anti-envejecimiento y/o de caracterizar la eficacia de un tratamiento contra los signos del envejecimiento cutáneo.

[0085] Como se ha precisado previamente, la presente descripción describe según uno de sus aspectos, procedimientos no invasivos para caracterizar, particularmente de manera *in vitro* o *ex vivo*, la eficacia de un activo anti-envejecimiento o de un tratamiento cosmético o terapéutico a través del análisis de forma cualitativa o cuantitativa de las formas solubles según la invención.

[0086] 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.

[0087] Los procedimientos según la invención, descritos a continuación, se pueden efectuar sobre una muestra, por ejemplo aislada, de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un individuo.

[0088] Los procedimientos según la invención se pueden realizar también sobre una muestra de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un modelo celular epitelial, y particularmente epidérmico, o de una piel aislada reconstruida con el fin de calificar el estado.

[0089] Un extracto de la epidermis se puede obtener así por simple *stripping* y directamente analizarse por el método ELISA tal y como se describe en el ejemplo 1, a continuación.

[0090] La técnica de *stripping* consiste en aplicar una superficie adhesiva a la superficie de la epidermis como el Blenderm® de 3M, el D'squam (adhesivo comercial de CuDERM), el pegamento cianoacrilato. Gracias a estos *strippings*, los corneocitos se adhieren y el contenido de sus espacios intercelulares se puede tomar y someter después a una extracción que permite tener acceso al contenido proteico.

[0091] La extracción de una muestra adecuada para el procedimiento se puede efectuar también de manera más directa por "lavado(s)" de la superficie cutánea por medio por ejemplo de accesorios de tipo turbina de aleta, de tipo célula de espiral (tal y como se describe en la patente FR 2 667 778) asociada a un circuito fluídico, o sencillamente por adición/extracción de una gota de tampón a la superficie de la piel.

[0092] A título indicativo, como otros métodos de extracción adaptados para la ejecución de la invención se pueden mencionar los métodos por raspado de la parte superior del estrato corneo a través de un sistema de biláminas o por biopsia por raspado. Esta técnica permite recoger las escamas que se pueden a continuación analizar directamente por diferentes técnicas para determinar los índices de minerales, aminoácidos o lípidos.

[0093] Tras la extracción, la muestra se caracteriza por el método ELISA considerado en el ejemplo 1, a continuación.

[0094] Este método se basa particularmente en la utilización de anticuerpos apropiados para la detección de formas solubles consideradas según la invención.

[0095] Un anticuerpo que puede ser utilizado como herramienta de valoración 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 anticuerpos utilizados pueden ser anticuerpos recombinantes tales como los desarrollados por la empresa Antibodies-by-design (AbD).

[0096] Tal y como se describe en el ejemplo 1 a continuación, el método de detección de las formas solubles de la desmogleína I precisa particularmente el uso de dos anticuerpos, a saber un anticuerpo de captura desarrollado con la tecnología HuCAL (AbD clon AbyD03984) y un anticuerpo de detección marcado en el "sulfo-tag" según las indicaciones MSD (anticuerpo monoclonal, clon 129204, R&D systems).

Cribado de compuestos biológicos o químicos.

[0097] También se describe un procedimiento de cribado de compuestos biológicos o químicos, incluso de activos anti-envejecimiento, o de factores físico-químicos, susceptibles de actuar en la desmogleína I, y en consecuencia de influir sobre la liberación de las formas solubles según la invención, que incluye al menos las etapas que consisten en:

a) poner en contacto, con al menos un compuesto químico o biológico que se vaya a evaluar, al menos un tipo celular capaz de liberar al menos una forma peptídica soluble conforme a la invención, en condiciones propicias para la liberación de dicha forma peptídica soluble.

b) determinar un contenido de dicha forma peptídica soluble, y

c) comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma soluble determinada en ausencia de compuesto químico o biológico que se vaya a evaluar.

[0098] Ventajosamente, se puede realizar, además, después de la etapa c), una etapa de selección del activo o de los activos para el cual o los cuales se observa un aumento del contenido en forma(s) soluble(s).

[0099] La comparación efectuada en la etapa c) puede permitir deducir una información en cuanto a la propiedad de dicho compuesto testado para modificar la desmogleína I, y por lo tanto influir sobre la liberación de las formas solubles según la invención.

[0100] Por ello, un compuesto que presenta una eficacia con respecto a la desmogleína I, que se acumula con la edad en el estrato corneo, induce la liberación de formas solubles de la desmogleína I según la invención.

[0101] Una detección de la presencia o un aumento del contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de un compuesto químico o biológico capaz de actuar en la desmogleína I.

[0102] De una forma más particular, el procedimiento útil para caracterizar la eficacia de un tratamiento susceptible de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo en un individuo, puede comprender al menos las etapas que consisten en:

i. disponer de al menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,

ii. cuantificar en dicha muestra particularmente a través de una técnica de dosificación ELISA al menos una forma soluble considerada en la presente invención,

iii. repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y

iv. comparar los resultados obtenidos tras las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de deducir una información relativa a al menos un efecto del tratamiento,

dichas primera y segunda muestras de superficie cutánea corresponden a estadios de tratamiento diferentes.

[0103] Asumiendo que una medida de valor de referencia se efectúe antes de la aplicación del compuesto biológico o químico, o de un activo anti-envejecimiento, o del factor fisicoquímico que se va a evaluar, el método según la invención puede permitir además, en su caso, evaluar la eficacia potencial de dicho compuesto.

[0104] La liberación de forma(s) soluble(s) según la invención puede no verse afectada por la presencia de dicho compuesto o, por el contrario, se puede ver estimulada.

[0105] Suponiendo que se constata un efecto estimulador, el compuesto testado se puede utilizar, por ejemplo, como activo anti-envejecimiento.

[0106] Se puede realizar un procedimiento según la invención sobre una muestra celular aislada.

[0107] La determinación de un contenido de las formas solubles según la invención se efectúa mediante el método ELISA específico, tal y como se describe en el ejemplo 1, a continuación.

[0108] La presente patente describe también el uso de una cantidad eficaz de formas solubles según la invención para preparar y/o mejorar un modelo celular pluriestratificado, particularmente del tipo epidérmico o mucoso, y en particular un modelo de piel reconstruida.

[0109] Tal como se define en la descripción, se entiende por "modelo de piel reconstruida", un modelo en el que están asociados diferentes tipos celulares, tales como particularmente los componentes naturales de la piel, como por ejemplo los queratinocitos, los fibroblastos, las células de Langerhans y los melanocitos.

[0110] Las células de tipo fibroblastos se pueden irradiar o no.

[0111] Tales modelos y su preparación son conocidos por el experto en la técnica.

[0112] Así, la presente patente describe también un procedimiento de preparación de una piel reconstruida aislada, que incluye al menos la etapa que consiste en poner en contacto al menos una forma soluble según la invención con células susceptibles de generar una piel reconstruida aislada, y particularmente los queratinocitos.

[0113] Para los fines de la presente descripción, según otro de sus aspectos, las formas solubles de la desmogleína I tales como las descritas previamente se pueden utilizar en una composición cosmética o terapéutica.

[0114] Se entiende que el conjunto de las composiciones cosméticas o terapéuticas consideradas según la invención utilizan un medio fisiológicamente aceptable.

[0115] Para fines de la presente invención, se entiende por “medio fisiológicamente aceptable”, un medio adecuado 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 queratinicas como el cabello, las uñas y el vello, o en su caso por vía oral o parenteral.

[0116] Por ejemplo, se puede describir una composición cosmética o terapéutica.

[0117] Una composición según la descripción puede comprender, además de la (o las) forma(s) soluble(s), al menos un agente activo cosmético y/o terapéutico.

[0118] Como ejemplos de agentes activos que se pueden utilizar en el marco de la presente descripción, 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.

[0119] Otros agentes activos que permiten mejorar el estado de la piel se pueden utilizar igualmente, tales como los activos hidratantes o los agentes activos que permiten mejorar la barrera lipídica natural, tales como las ceramidas, los sulfatos de colesterol y/o los ácidos grasos y sus mezclas.

[0120] También se pueden utilizar las enzimas que tienen una actividad sobre la piel, tales como las proteasas, las lipasas, las glucosidasas, las amidasas, las cerebrosidasas y/o las melanasas, y sus mezclas.

[0121] En general, cualquier composición conforme a la invención se puede aplicar sobre la piel (sobre cualquier zona cutánea del cuerpo) o sobre las mucosas (bucal, oral, gingival, genital, conjuntival...).

[0122] De manera conocida, una composición cosmética puede contener igualmente adyuvantes habituales en el ámbito 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.

[0123] Las cantidades de los diferentes componentes de las composiciones descritas son las habitualmente utilizadas en los campos considerados.

[0124] Según otro aspecto, la presente invención describe un procedimiento de tratamiento cosmético de los signos de envejecimiento cutáneo que incluye al menos una etapa que consiste en aplicar sobre una parte al menos de la piel, las mucosas y/o las fibras queratinicas, al menos una composición cosmética según la invención.

[0125] Según otro aspecto, la invención describe igualmente el uso, particularmente cosmético y/o terapéutico, de formas peptídicas solubles de la desmogleína I, o de análogos de ésta, o de un agente modulador de la actividad, de la expresión y/o de la estabilidad de tal polipéptido, particularmente para prevenir los signos del envejecimiento cutáneo, particularmente para prevenir y/o tratar las pieles maduras.

[0126] La invención describe el uso de un agente modulador de las formas solubles según la invención.

[0127] Para fines de la descripción, se entiende por “modular”, con respecto a un efecto dado, la acción de estimular o inhibir este efecto.

[0128] Para los fines de la presente descripción, se entiende por la expresión “agente modulador o compuesto químico o biológico capaz de modular la actividad biológica y/o la expresión” cualquier compuesto capaz de actuar, directa o indirectamente, sobre las formas solubles según la invención, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica en parte éstas, o sobre un elemento de una ruta de señalización intra o extracelular, o de una ruta metabólica, que implica dichas formas solubles, 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 dichas formas solubles, así como en la regulación de la estabilidad de éstas.

[0129] Este agente modulador puede ser un agente inhibitorio o activador de la expresión de las formas solubles de la invención, o incluso un agente que regula la estabilidad de dichas formas solubles.

[0130] De una forma más particular, el agente modulador puede ser un activador de la expresión de las formas solubles según la invención.

[0131] Por ejemplo, el agente modulador es un agente que favorece la estabilidad de las formas solubles según la invención, inhibiendo su degradación proteolítica.

[0132] Los ejemplos que aparecen a continuación se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Figura 1: ilustra la eficacia de la prueba ELISA de alta sensibilidad conforme a la invención en el seguimiento de activos que actúan sobre la degradación de la desmogleína I.

Figura 2: ilustra los efectos de un suero compuesto por 10 % de Bifidiobiotic (complejo CLR) y 0,002 % de fitesfingosina-SLC (tratamiento "G") sobre la cantidad en formas peptídicas solubles según la invención.

Ejemplo 1:

Desarrollo de una prueba ELISA de alta sensibilidad que permite la dosificación de formas solubles de la desmogleína I según la invención:

[0133] Placas de 96 pocillos específicas "desmogleína" se desarrollaron a medida con la tecnología de la empresa MesoScale Discovery (MSD).

[0134] El anticuerpo recombinante de captura (clon AbyD03984), dirigido contra un dominio extracelular de la desmogleína se desarrolló con la tecnología HuCAL (Empresa: Antibodies by Design) mediante un cribado efectuado con una desmogleína recombinante (recombinante R&D systems).

[0135] El anticuerpo de captura se depositó a una concentración de 200 µg/ml sobre una placa estándar de 96 pocillos de tipo "small spot" (MesoScale).

[0136] Una curva de referencia (400 a 6 ng/ml) se estableció utilizando una proteína recombinante desmogleína. Cada placa se bloqueó por un tampón de bloqueo (MesoScale) durante 1 hora a temperatura ambiente. 25 µl de cada muestra y de estándares se depositó por triplicado y se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó entonces 4 veces en el tampón Tris (MesoScale). Las placas se incubaron entonces con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con 25 µl de anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal, clon 129204, R&D Systems) marcado con "sulfo-tag" según las indicaciones de MSD en una concentración de 1 µg/ml. Las placas se lavaron 4 veces con un tampón de Tris (MesoScale) antes de añadir 150 µl de 1 X read buffer T (MesoScale). Las placas se leyeron con ayuda del "Sector Imager 6000". Los datos se estandarizaron en términos de ng de desmogleína por µg de proteína total medida por un kit Bradford (Bio-Rad).

Ejemplo 2:

Uso de la prueba ELISA de alta sensibilidad para la criba de activos que actúan sobre la degradación de la desmogleína 1.

Protocolo:

[0137] 6 mg de estrato corneo plantar (SCP) finamente triturado se distribuyó en cada pocillo de una placa 96 pocillos Multiscreen filtration system 0,22 µm (Millipore). Cada prueba se triplicó.

[0138] 100 µl de EDTA a 0,2 y 2 % en tampón Tris 0,1M pH8 se agregó al SCP. La placa se incubó 10 min a temperatura ambiente. La placa se filtró a continuación, los pocillos se enjuagaron 5 veces con 200 µl de tampón PBS. 200 µl de tampón Tris 0,1M pH8 se agregaron a cada pocillo. La placa se incubó 2h con agitación a 30 °C luego se filtró en una placa de recepción. Cada medio reactivo se recogió de este modo.

[0139] La dosificación de los péptidos de la desmogleína 1 se realizó sobre una placa Mesoscale MA6000 DB016 cuyo desarrollo se ha descrito previamente.

[0140] Cada dosificación se realizó directamente con 25 µl de medio reactivo. Una gama de calibración se realizó en las mismas condiciones con la desmogleína recombinante (R&D system). Los resultados se pueden expresar bien en UA (unidades arbitrarias = señal obtenida sobre el "sector imager 6000" o en ng de desmogleína 1 por µg de proteínas totales).

[0141] La figura 1 permite efectivamente seguir la liberación de formas solubles de la desmogleína 1 inducida por un tratamiento que favorece la degradación del corneodesmosoma, tal como un tratamiento por queladores de la familia del EDTA.

[0142] La prueba se adapta por lo tanto a la evaluación de un efecto estimulante de degradación de la desmogleína 1 por medida de las formas solubles liberadas *in vitro*.

[0143] Esta prueba está por lo tanto indicada para controlar el efecto de las moléculas o de las fórmulas cosméticas, en particular de los activos anti-envejecimiento, que permiten compensar la acumulación anormal de desmogleína 1 observada en el estrato corneo maduro.

Ejemplo 3:

Caracterización del contenido de formas solubles de la desmogleína I en diferentes muestras tomadas por *stripping*.

[0144] Esta caracterización se realizó con ayuda de la prueba ELISA descrita en ejemplo 1.

[0145] Un estudio de producto se realizó durante 56 días, es decir 2 meses (1 grupo de 24 sujetos femeninos, piel caucásica, con edades comprendidas entre los 40 y los 45 años) con tomas de muestras efectuadas en el antebrazo.

[0146] El producto es un suero compuesto por 10 % de Bifidiobiotic (complejo CLR) y 0,002 % de fitosfingosina-SLC (tratamiento "G").

[0147] El complejo CLR se refiere a un lisado registrado bajo el nombre INCI: Bifidat ferment Lysate, bajo el nombre EINECS: *Bifidobacterium longum*, bajo el N° EINECS: N° 306-168-4 y bajo el N° caso: N° 96507-89-0.

[0148] Tal lisado se comercializa particularmente con la denominación Repair Complex CLR® por la empresa K. RICHTER GmbH. El derivado fitosfingosina-alcilate es el comercializado por la empresa EVONICK GOLDSCHMIDT con la denominación Fitosfingosina SLC.

[0149] Para este estudio, las tomas de muestras D-Squame se hicieron en el antebrazo (cara posterior).

a) Extracción de proteínas de los discos córneos D-Squame:

[0150] El disco córneo se colocó en un tubo Eppendorf 2 ml, cara adhesiva hacia adentro, al cual se agregó 550 µl de tampón de extracción denominado "Native+" (TBS, 1 % Triton X-100, 1M NaCl) y una bola de acero inoxidable por tubo. El tubo se colocó a continuación en los portadores de la trituradora de vibración MM400 (Retsch). La extracción se hace por trituración por vibración durante un ciclo de 2 min a 30 Htz. El medio se recuperó a continuación y se filtró sobre columna Millipore Ultrafree de 0,45 µm seguido de una centrifugación a 5.000 g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se conserva a -20 °C a la espera de ser analizado.

b) Análisis estadístico

[0151] El análisis, para el efecto tratamiento, se realizó con ayuda de un modelo mixto de análisis de la variación sobre las diferencias emparejadas Activo - Placebo con el factor tiempo, de hecho fijo, y el factor sujeto de hecho aleatorio.

[0152] El efecto tratamiento en D0 y D56 se testó con ayuda de contrastes.

[0153] Las variables fueron, cuando fue necesario, previamente log transformadas para hacer su distribución más Gaussiana.

[0154] Se utilizó el software SPSS versión 14 para los análisis descriptivos (gráficos de los medias y diagramas de cajas), y el software SAS Enterprise Guide versión 3 para la parte interferencial.

[0155] El riesgo alfa de primera especie se fijó en 5 % en un acercamiento bilateral.

[0156] Los resultados de este estudio están ilustrados en la figura 2.

[0157] La figura 2 revela el efecto del producto testado sobre la cantidad en formas solubles. Se constata un aumento significativo de la liberación de formas solubles de la desmogleína I, lo que demuestra el efecto estimulador de este producto sobre la liberación de la desmogleína I.

[0158] El producto testado presenta por lo tanto un efecto real anti-envejecimiento ya que permite contrarrestar la acumulación de desmogleína I con la edad.

Listado de secuencias

[0159]

<110> L'OREAL

<120> Uso para fines de cribado de activos anti-envejecimiento de formas solubles de la proteína de tipo desmogleína I

<130> BR87469/96082/KLP/PLC/cf

<160> 85

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 4512
5 <212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 1

```

cccagcccaa gtttttaggg tggggatcca gactgggttat acgtaccttc agtccttctc      60
ccagaggaag gcagaaacac ctcaaagcct gcatgtaaga acatctactg agaaattatt      120
ttaatcagac accagctgag tgggagaaag gaaaagaaca gagaagaaca aacaaaactc      180
ccttgggtctt ggatgtaaga gaatccagca gagatggact ggagtttctt cagagtagtt      240
gcagtgcgtg tcatttttct ggtgggtgga gaagttaaca gtgaattccg aatccaggta      300
agagattata acactaaaaa tggcaccatc aaatggcatt caatccgaag gcagaaacgt      360
gaatggatca agttcgcagc agcctgtcgt gaaggtgaag acaactcaaa gaggaacca      420
atcgccaaaa ttcactcaga ttgtgctgca aaccagcaag ttacataccg catctctgga      480
gtaggaattg atcagccacc atatggggtc tttgtcatta atcagaaaac tggtgaaatt      540
aatataacat ccatagttga tcgagaggtc actcctttct tcattatcta ctgccgagct      600
ctgaactcaa tgggccaaaga tttagagagg cctctagagc tcagagtcag ggttttggat      660
ataaatgaca accctccagt gttttcaatg gctacatttg caggacaaat agaagaaat      720
tctaattgaa atacactggt gatgatactc aatgctactg acgcagatga accgaacaat      780
ttgaactcaa aaatagcctt caagattata agacaagaac cttcagattc accaatgttt      840
attatcaaca gaaatactgg agaaattcga acgatgaata attttctaga cagagagcaa      900
tacggccagt atgctcttgc tgtaagaggc tctgaccgag atggtggggc agatggcatg      960
tcagcggaat gtgagtgcaa cattaaaatc ctcgatgtca atgataatat cccttacatg     1020
gaacagtctt catataccat agaaattcaa gaaaatactc taaattcaaa tttgctcgag     1080
attagagtaa ttgatttggg tgaagagttc tcagctaact ggatggcagt aattttcttt     1140
atctctggaa atgaaggaaa ttggtttgag atagaaatga atgaagaac aaatgtggga     1200
attttaaagg ttgttaagcc cttagattat gaagctatgc agagtctgca actcagtatt     1260
ggtgtcagaa ataaagctga atttcatcat tcaattatgt ctcaatataa actgaaagca     1320
tctgcaattt ctgtgactgt gttaaatgta attgaaggcc cagtgtttcg tccagggttca     1380
aagacatatg ttgtaactgg taatatggga tcaaatgata aagtgggaga ctttgtagct     1440
actgacctgg acacaggtag accttcaacg actgttaggt atgtaatggg aaataatcca     1500

```

gctgacctgc tagctgttga ttcaagaaca ggcaaaactca ctttgaaaaa taaagttacc 1560
 aaggaacagt acaatatgct cggaggaaaa taccaaggaa cgattctctc tatagatgat 1620
 aatcttcaaa gaacttgcac tggtagaatt aatattaaca ttcaaagttt tggtaatgac 1680
 gacaggacta atacagagcc gaacactaaa attactacca atactggcag acaagaaagt 1740
 acttcttcca ctaactatga taccagcaca acttctactg actctagcca agtatattct 1800
 tctgaacctg gaaacggagc caaagatttg ttatcagaca atgtacattt tggctctgct 1860
 ggcattggac tcctcatcat gggattcttg gtcttaggat tgggtccatt tttgatgac 1920
 tgttgtgatt gtggagggtg tcctcgtagt gcagctggct ttgagcctgt tcccgaatgt 1980
 tcagatggag caattcattc atgggcagta gaaggaccac agcctgaacc cagggatata 2040
 accactgtca taccacaaat accacctgat aacgcaaata taattgaatg cattgacaac 2100
 tcaggagtgt atacaaatga gtatggtggc agagaaatgc aagatctggg aggaggagag 2160
 agaatgacag gatttgaact aacagaggga gttaaaactt caggaatgcc tgagatatgt 2220
 caagaatact ctggaacatt aagaagaaat tctatgaggg aatgtagaga aggaggtctg 2280
 aatatgaatt tcatggaaag ctacttctgt cagaaagcat atgcttacgc agatgaagat 2340
 gaaggacgcc catctaata ctgtttgctc atatatgaca tcgaagggtg aggttcccc 2400
 gctggctctg tgggtgtgtg tagcttcatt ggagaagacc tggatgacag cttcttggat 2460
 accctgggac ctaaatttaa gaagtgggca gacatcagcc taggaaaaga atcatatcca 2520
 gaccttgatc cttcttggcc accacaaagc actgaaccag tttgccttcc tcaggaaaca 2580
 gagcccggtg ttagtgagca cccaccaatc tccccacatt tcggcactac cacagtaatt 2640
 tctgagagca cctatccctc gggacctggt gtactgcac ctaagcctat tctcgatcct 2700
 ctgggctatg gtaatgtcac tgtgaccgag tcttacacca cctctgacac tctgaagccc 2760
 tctgtgcacg ttcacgataa ccgaccagca tcaaacgtgg tagtgacaga gagagtggc 2820
 ggcccaatct ctggcgctga tttgcatgga atgttagaga tgcctgactt gcgagatggg 2880
 tcgaatgtta tagtgacaga aagggttaata gcaccaagct ctagtctacc cacctctctg 2940
 actatccatc atcctagaga gtcttcaaat gtggtagtga cagaaagagt aatccaacca 3000
 acttccggca tgataggtag tctgagtatg cccccgagt tagccaatgc ccacaatgtc 3060
 attgtgacag agaggggtgt ttctggtgct ggcgtaactg gaattagtgg caccactggg 3120
 atcagcgggtg gcataggcag cagtggcctg gttggcacca gcatgggtgc tgggagcggg 3180
 gccctgagtg gagctggcat aagtgggtgg ggcattggcc tgagcagctt gggagggaca 3240
 gccagcattg gccacatgag gagttcctct gaccatcact ttaaccaaac cattgggtcc 3300
 gcctccctta gcacagctcg aagtcgaatc acaaagtata gtaccgtgca atatagcaag 3360
 tagtcaggac cccagctcac tttttcatag tcattgtggt ttagatccaa tccccaccac 3420
 taaaaaacta acaatgtgat ttataacgca caacttcgtg ctcaggtcat ctaggagcaa 3480
 ggtgagaaat cacaatgaga aaaataaatg gaaacaccac tgctagggga gagctctcct 3540
 tagcattcat aaacttttct cttatattag gactaaggaa ctaaaacttg aggcagagtc 3600

ttctttgtgc	ctgagtggcc	tgtagtccat	ctccagcatg	taactggcct	tacgatggca	3660
attggcatca	ttctccttgc	tctgttttgc	ttttccatat	agctcgagca	aaattcaaaa	3720
agaactaaat	atgcaatata	tgttcataat	tatgggaaaa	atctaaaatg	tgtgccagat	3780
gcctgtttgg	tttcacagat	aacataaata	aaaattcaac	cacagattta	tacaagggtt	3840
aaccattttt	tttaagtttg	actacatagt	caagtccaca	agccatcaag	cactcctacc	3900
ttaattattg	cactagagaa	aataaattcc	aaattaggaa	gtgtttccta	ggaggaaaat	3960
tccattagag	agtggcaata	ggatgaggtt	tcttcagggt	aaactagcaa	tgcctgagcc	4020
tgaaccttaa	tgtggggcct	cagttaatat	ccctgtggag	tcaaggattc	ttctgattct	4080
agtgtgtgtt	tagtgataga	tgtagtcttg	acgaatattg	cttactggtg	aggttgagga	4140
atatcacact	cgtctttccc	tttaccactg	tggttttgac	ttaagaaagc	aaaactcact	4200
aagtttactt	ctcgaattga	agcaagtgag	gcctgacatg	gttgtcatca	ctagtggcaa	4260
atgaccttcc	aagtaagcag	atgggaactg	aattgtgttt	tcaggttttg	tttttagtag	4320
gtgatattca	ttcgtatcca	gctctttatt	acatagctct	gaagttaaaa	tgatttacat	4380
aggccgagct	gtggacaaaa	aaaaagaagc	agcagcttgt	agtatgctta	agctttgggg	4440
aatttttttt	taaggggatc	taaaaaaatg	tttttagaac	atgtaaaatg	tttaatggtg	4500
aaagttggaa	aa					4512

<210> 2
 <211> 1049
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

 <400> 2

5

Met Asp Trp Ser Phe Phe Arg Val Val Ala Val Leu Phe Ile Phe Leu
 1 5 10 15
 Val Val Val Glu Val Asn Ser Glu Phe Arg Ile Gln Val Arg Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Thr Lys Asn Gly Thr Ile Lys Trp His Ser Ile Arg Arg Gln Lys
 35 40 45
 Arg Glu Trp Ile Lys Phe Ala Ala Ala Cys Arg Glu Gly Glu Asp Asn
 50 55 60
 Ser Lys Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile His Ser Asp Cys Ala Ala Asn
 65 70 75 80
 Gln Gln Val Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro
 85 90 95
 Tyr Gly Ile Phe Val Ile Asn Gln Lys Thr Gly Glu Ile Asn Ile Thr
 100 105 110

Ser Ile Val Asp Arg Glu Val Thr Pro Phe Phe Ile Ile Tyr Cys Arg
 115 120 125
 Ala Leu Asn Ser Met Gly Gln Asp Leu Glu Arg Pro Leu Glu Leu Arg
 130 135 140
 Val Arg Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Met Ala
 145 150 155 160
 Thr Phe Ala Gly Gln Ile Glu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Leu Val
 165 170 175
 Met Ile Leu Asn Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro Asn Asn Leu Asn Ser
 180 185 190
 Lys Ile Ala Phe Lys Ile Ile Arg Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met
 195 200 205
 Phe Ile Ile Asn Arg Asn Thr Gly Glu Ile Arg Thr Met Asn Asn Phe
 210 215 220
 Leu Asp Arg Glu Gln Tyr Gly Gln Tyr Ala Leu Ala Val Arg Gly Ser
 225 230 235 240
 Asp Arg Asp Gly Gly Ala Asp Gly Met Ser Ala Glu Cys Glu Cys Asn
 245 250 255
 Ile Lys Ile Leu Asp Val Asn Asp Asn Ile Pro Tyr Met Glu Gln Ser
 260 265 270
 Ser Tyr Thr Ile Glu Ile Gln Glu Asn Thr Leu Asn Ser Asn Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ile Arg Val Ile Asp Leu Asp Glu Glu Phe Ser Ala Asn Trp Met
 290 295 300
 Ala Val Ile Phe Phe Ile Ser Gly Asn Glu Gly Asn Trp Phe Glu Ile
 305 310 315 320
 Glu Met Asn Glu Arg Thr Asn Val Gly Ile Leu Lys Val Val Lys Pro
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Glu Ala Met Gln Ser Leu Gln Leu Ser Ile Gly Val Arg
 340 345 350
 Asn Lys Ala Glu Phe His His Ser Ile Met Ser Gln Tyr Lys Leu Lys
 355 360 365
 Ala Ser Ala Ile Ser Val Thr Val Leu Asn Val Ile Glu Gly Pro Val
 370 375 380
 Phe Arg Pro Gly Ser Lys Thr Tyr Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser

385		390		395		400
Asn Asp Lys Val	Gly 405	Asp Phe Val	Ala Thr 410	Asp Leu Asp Thr	Gly 415	Arg
Pro Ser Thr Thr	Val 420	Arg Tyr Val	Met 425	Gly Asn Asn Pro	Ala 430	Asp Leu
Leu Ala Val	Asp 435	Ser Arg Thr	Gly 440	Lys Leu Thr Leu	Lys 445	Asn Lys Val
Thr Lys 450	Glu Gln Tyr	Asn Met 455	Leu Gly Gly Lys	Tyr 460	Gln Gly Thr	Ile
Leu 465	Ser Ile Asp Asp	Asn 470	Leu Gln Arg Thr	Cys 475	Thr Gly Thr Ile	Asn 480
Ile Asn Ile Gln	Ser 485	Phe Gly Asn Asp	Asp 490	Arg Thr Asn Thr	Glu 495	Pro
Asn Thr Lys	Ile 500	Thr Thr Asn Thr	Gly 505	Arg Gln Glu Ser	Thr 510	Ser Ser
Thr Asn Tyr	Asp 515	Thr Ser Thr Thr	Ser 520	Thr Asp Ser Ser	Gln 525	Val Tyr
Ser Ser 530	Glu Pro Gly Asn	Gly 535	Ala Lys Asp Leu	Leu 540	Ser Asp Asn Val	
His 545	Phe Gly Pro Ala	Gly 550	Ile Gly Leu Leu	Ile 555	Met Gly Phe Leu	Val 560
Leu Gly Leu Val	Pro 565	Phe Leu Met Ile	Cys 570	Cys Asp Cys Gly	Gly 575	Ala
Pro Arg Ser	Ala 580	Gly Phe Glu	Pro 585	Val Pro Glu Cys	Ser 590	Asp Gly
Ala Ile His	Ser 595	Trp Ala Val	Glu 600	Gly Pro Gln Pro	Glu 605	Pro Arg Asp
Ile Thr Thr Val	Ile 610	Pro Gln Ile	Pro 615	Pro Asp Asn Ala	Asn 620	Ile Ile
Glu 625	Cys Ile Asp Asn	Ser 630	Gly Val Tyr Thr	Asn 635	Glu Tyr Gly Gly	Arg 640
Glu Met Gln Asp	Leu 645	Gly Gly Gly Glu	Arg 650	Met Thr Gly Phe	Glu 655	Leu
Thr Glu Gly Val	Lys 660	Thr Ser Gly	Met 665	Pro Glu Ile Cys	Gln 670	Glu Tyr

Ser Gly Thr Leu Arg Arg Asn Ser Met Arg Glu Cys Arg Glu Gly Gly
 675 680 685
 Leu Asn Met Asn Phe Met Glu Ser Tyr Phe Cys Gln Lys Ala Tyr Ala
 690 695 700
 Tyr Ala Asp Glu Asp Glu Gly Arg Pro Ser Asn Asp Cys Leu Leu Ile
 705 710 715 720
 Tyr Asp Ile Glu Gly Val Gly Ser Pro Ala Gly Ser Val Gly Cys Cys
 725 730 735
 Ser Phe Ile Gly Glu Asp Leu Asp Asp Ser Phe Leu Asp Thr Leu Gly
 740 745 750
 Pro Lys Phe Lys Lys Leu Ala Asp Ile Ser Leu Gly Lys Glu Ser Tyr
 755 760 765
 Pro Asp Leu Asp Pro Ser Trp Pro Pro Gln Ser Thr Glu Pro Val Cys
 770 775 780
 Leu Pro Gln Glu Thr Glu Pro Val Val Ser Gly His Pro Pro Ile Ser
 785 790 795 800
 Pro His Phe Gly Thr Thr Thr Val Ile Ser Glu Ser Thr Tyr Pro Ser
 805 810 815
 Gly Pro Gly Val Leu His Pro Lys Pro Ile Leu Asp Pro Leu Gly Tyr
 820 825 830
 Gly Asn Val Thr Val Thr Glu Ser Tyr Thr Thr Ser Asp Thr Leu Lys
 835 840 845
 Pro Ser Val His Val His Asp Asn Arg Pro Ala Ser Asn Val Val Val
 850 855 860
 Thr Glu Arg Val Val Gly Pro Ile Ser Gly Ala Asp Leu His Gly Met
 865 870 875 880
 Leu Glu Met Pro Asp Leu Arg Asp Gly Ser Asn Val Ile Val Thr Glu
 885 890 895
 Arg Val Ile Ala Pro Ser Ser Ser Leu Pro Thr Ser Leu Thr Ile His
 900 905 910
 His Pro Arg Glu Ser Ser Asn Val Val Val Thr Glu Arg Val Ile Gln
 915 920 925
 Pro Thr Ser Gly Met Ile Gly Ser Leu Ser Met His Pro Glu Leu Ala
 930 935 940

Asn Ala His Asn Val Ile Val Thr Glu Arg Val Val Ser Gly Ala Gly
 945 950 955 960
 Val Thr Gly Ile Ser Gly Thr Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ile Gly Ser
 965 970 975
 Ser Gly Leu Val Gly Thr Ser Met Gly Ala Gly Ser Gly Ala Leu Ser
 980 985 990
 Gly Ala Gly Ile Ser Gly Gly Gly Ile Gly Leu Ser Ser Leu Gly Gly
 995 1000 1005
 Thr Ala Ser Ile Gly His Met Arg Ser Ser Ser Asp His His Phe
 1010 1015 1020
 Asn Gln Thr Ile Gly Ser Ala Ser Pro Ser Thr Ala Arg Ser Arg
 1025 1030 1035
 Ile Thr Lys Tyr Ser Thr Val Gln Tyr Ser Lys
 1040 1045

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 3

Ala Glu Phe His His Ser Ile Met
 1 5

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 4

Ala Glu Phe His His Ser Ile Met Ser Gln Tyr Lys
 1 5 10

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 5

Ala Gly Gln Ile Glu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Leu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 6

Ala Gly Gln Ile Glu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Leu Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 7
 Ala Leu Asn Ser Met Gly Gln Asp Leu Glu Arg Pro Leu Glu Leu Arg
 1 5 10 15
 10 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 8
 Ala Ser Ala Ile Ser Val Thr Val Leu Asn Val Ile Glu Gly Pro Val
 1 5 10 15
 Phe Arg
 20 <210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 9
 25 Ala Ser Ala Ile Ser Val Thr Val Leu Asn Val Ile Glu Gly Pro Val
 1 5 10 15
 Phe Arg Pro Gly Ser Lys
 20
 30 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10
 35 Asp Gly Gly Ala Asp Gly Met Ser Ala Glu Cys Glu Cys Asn Ile Lys
 1 5 10 15
 40 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11
 45 Asp Gly Gly Ala Asp Gly Met Ser Ala Glu Cys Glu Cys Asn Ile Lys
 1 5 10 15
 Ile
 50 <210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 12

Asp Gly Gly Ala Asp Gly Met Ser Ala Glu Cys Glu Cys Asn Ile Lys
1 5 10 15

Ile Leu

5 <210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 13

Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Met Ala Thr
1 5 10

15 <210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <400> 14

Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr Thr Val Arg
1 5 10

25 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 15

30 Asp Ser Pro Met Phe Ile Ile Asn Arg
1 5

35 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 16

40 Glu Ile Arg Val Ile Asp Leu Asp Glu Glu Phe
1 5 10

45 <210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 17

Glu Ile Arg Val Ile Asp Leu Asp Glu Glu Phe Ser Ala Asn
1 5 10

50 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

55

<400> 18

Glu Gln Tyr Gly Gln Tyr Ala Leu Ala Val Arg
1 5 10

5 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 19

Glu Gln Tyr Asn Met Leu Gly Gly Lys
1 5

15 <210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <400> 20

Glu Ser Ser Asn Val Val Val Thr Glu Arg
1 5 10

25 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 21

30 Glu Val Thr Pro Phe Phe Ile Ile Tyr Cys Arg
1 5 10

35 <210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 22

40 Phe Ile Ser Gly Asn Glu Gly Asn Trp Phe Glu Ile Glu
1 5 10

45 <210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 23

Phe Leu Val Leu Gly Leu Val Pro Phe Leu Met Ile Cys Cys Asp Cys
1 5 10 15

50 <210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

55 <400> 24

Phe Leu Val Leu Gly Leu Val Pro Phe Leu Met Ile Cys Cys Asp Cys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 18
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 25

Phe Leu Val Leu Gly Leu Val Pro Phe Leu Met Ile Cys Cys Asp Cys
1 5 10 15

10 Gly Gly

<210> 26
<211> 17
15 <212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 26

Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ile Asn Gln
1 5 10 15

Lys

20 <210> 27
<211> 14
<212> PRT
25 <213> Homo Sapiens

<400> 27

Ile His Ser Asp Cys Ala Ala Asn Gln Gln Val Thr Tyr Arg
1 5 10

30 <210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

35 <400> 28

Ile Ile Arg Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met Phe Ile Ile Asn Arg
1 5 10 15

40 <210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

45 <400> 29

Ile Leu Asp Val Asn Asp Asn Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 10
50 <212> PRT

<213> Homo Sapiens
 <400> 30

5 Ile Leu Ser Ile Asp Asp Asn Leu Gln Arg
 1 5 10

<210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 10 <213> Homo Sapiens

<400> 31

 Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ile
 1 5 10 15

 Asn Gln Lys

15 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Homo Sapiens

<400> 32

 Lys Ile Ile Arg Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met Phe Ile Ile Asn
 1 5 10 15

25 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

30 <400> 33

 Lys Ile Ile Arg Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met Phe Ile Ile Asn
 1 5 10 15

 Arg

35 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 34

40 Lys Leu Lys Ala Ser Ala Ile Ser Val Thr Val
 1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Homo Sapiens

<400> 35

50 Lys Leu Lys Ala Ser Ala Ile Ser Val Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 36
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 36
 5 Leu Ala Asp Ile Ser Leu Gly Lys
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 37
 Leu Asp Arg Glu Gln Tyr Gly Gln Tyr
 15 1 5
 <210> 38
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 38
 Asn Met Leu Gly Gly Lys Tyr Gln Gly Thr Ile
 25 1 5 10
 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Homo Sapiens
 <400> 39
 Asn Met Leu Gly Gly Lys Tyr Gln Gly Thr Ile Leu
 1 5 10
 35 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 40 <400> 40
 Asn Asn Phe Leu Asp Arg Glu Gln Tyr
 1 5
 45 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 41
 50 Asn Asn Phe Leu Asp Arg Glu Gln Tyr Gly
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 11
 55 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 42

	Asn Asn Phe Leu Asp Arg Glu Gln Tyr Gly Gln
	1 5 10
5	<210> 43 <211> 12 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 43
10	Asn Asn Phe Leu Asp Arg Glu Gln Tyr Gly Gln Tyr
	1 5 10
15	<210> 44 <211> 8 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 44
20	Asn Ser Asn Leu Leu Glu Ile Arg
	1 5
25	<210> 45 <211> 9 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 45
30	Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg
	1 5
35	<210> 46 <211> 12 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 46
40	Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg Pro Gly Ser
	1 5 10
45	<210> 47 <211> 13 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 47
50	Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg Pro Gly Ser Lys
	1 5 10
55	<210> 48 <211> 14 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 48
	Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg Pro Gly Ser Lys Thr
	1 5 10
	<210> 49

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 49
 Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg Pro Gly Ser Lys Thr Tyr
 1 5 10 15
 10 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 50
 15
 Pro Pro Tyr Gly Ile Phe Val Ile Asn Gln Lys
 1 5 10
 20 <210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 51
 25
 Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met Phe Ile Ile Asn Arg
 1 5 10
 30 <210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 52
 35
 Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro
 1 5 10
 40 <210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 53
 45
 Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr
 1 5 10
 50 <210> 54
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 54
 55
 Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr Gly
 1 5 10
 55 <210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 55

Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr Gly Ile
1 5 10

5 <210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 56

Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr Gly Ile Phe
1 5 10 15

15 <210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <400> 57

Ser Ile Asp Asp Asn Leu Gln Arg
1 5

25 <210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 58

30 Ser Ile Val Asp Arg Glu Val Thr Pro Phe
1 5 10

35 <210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 59

40 Thr Ser Ile Val Asp Arg Glu Val Thr Pro Phe Phe
1 5 10

45 <210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 60

Thr Ile Glu Ile Gln Glu Asn Thr Leu Asn Ser Asn Leu Leu Glu Ile
1 5 10 15

Arg

50 <210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

55 <400> 61

	Thr Leu Asn Ser Asn Leu Leu Glu Ile Arg
	1 5 10
5	<210> 62 <211> 8 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 62
10	Thr Met Asn Asn Phe Leu Asp Arg
	1 5
15	<210> 63 <211> 13 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 63
20	Thr Tyr Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys
	1 5 10
25	<210> 64 <211> 12 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 64
30	Val Ala Thr Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr
	1 5 10
35	<210> 65 <211> 14 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 65
40	Val Ala Thr Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr Thr Val
	1 5 10
45	<210> 66 <211> 15 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 66
50	Val Ala Thr Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr Thr Val Arg
	1 5 10 15
55	<210> 67 <211> 19 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 67

Val Gly Asp Phe Val Ala Thr Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr
1 5 10 15

Thr Val Arg

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 68

Val Ile Asp Leu Asp Glu Glu Phe Ser Ala Asn
1 5 10

<210> 69
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 69

Val Ile Gln Pro Thr Ser Gly Met Ile Gly Ser Leu Ser Met His Pro
1 5 10 15

Glu Leu Ala Asn Ala His Asn Val Ile Val Thr Glu Arg
20 25

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 70

Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val
1 5 10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 71

Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Met
1 5 10

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 72

Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Met Ala
1 5 10

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 73

Val Leu Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe Arg
1 5 10

5 <210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 74

Val Met Gly Asn Asn Pro Ala Asp Leu Leu
1 5 10

15 <210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <400> 75

Val Met Gly Asn Asn Pro Ala Asp Leu Leu Ala Val Asp Ser Arg
1 5 10 15

25 <210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 76

Val Met Gly Asn Asn Pro Ala Asp Leu Leu Ala Val Asp Ser Arg Thr
1 5 10 15

30 Gly Lys

35 <210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 77

Val Met Gly Asn Asn Pro Ala Asp Leu Leu Ala Val Asp Ser Arg Thr
1 5 10 15

Gly Lys Leu Thr
20

40 <210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

45 <400> 78

Val Val Lys Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Met Gln Ser Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Arg
20

<210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 79
 Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys
 1 5 10
 10 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 80
 Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys Val Gly Asp Phe
 1 5 10 15
 20 <210> 81
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 25 <400> 81
 Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys Val Gly Asp Phe Val
 1 5 10 15
 Ala Thr
 30 <210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 82
 Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys Val Gly Asp Phe Val
 1 5 10 15
 Ala Thr Asp Leu
 20
 35 <210> 83
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 40 <400> 83
 Val Val Thr Gly Asn Met Gly Ser Asn Asp Lys Val Gly Asp Phe Val
 1 5 10 15
 Ala Thr Asp Leu Asp Thr Gly Arg Pro Ser Thr Thr Val Arg
 20 25 30
 45 <210> 84
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 50

<400> 84

Tyr Gln Gly Thr Ile Leu Ser Ile Asp Asp Asn Leu Gln Arg
1 5 10

5 <210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 85

Tyr Val Met Gly Asn Asn Pro Ala Asp Leu Leu Ala Val Asp Ser Arg
1 5 10 15

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de cribado de activos anti-envejecimiento que comprende al menos las etapas que consisten en:
- 10 a) poner en contacto al menos un tipo celular capaz de liberar al menos una forma peptídica soluble complejada o no, derivado de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2, con al menos un activo anti-envejecimiento que se va a evaluar, en condiciones propicias para una liberación de dicha forma peptídica soluble,
- 15 b) determinar un contenido de dicha forma peptídica soluble, y
- c) comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma soluble determinado en ausencia de compuesto químico o biológico que se va a evaluar, donde una detección o una caracterización de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho activo.
- 20 2. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico, en un individuo, destinado a prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo relacionados con el envejecimiento cronológico, que incluye al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de al menos una forma peptídica soluble complejada o no, derivada de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2, donde una detección o una caracterización de una presencia o de un aumento de un contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho tratamiento.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, que incluye al menos las etapas que consisten en:
- i. disponer de al menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
- 30 ii. cuantificar en dicha muestra, particularmente a través de una técnica de dosificación ELISA, al menos una forma peptídica soluble complejada o no, derivada al menos en parte de la proteólisis del polipéptido de secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2,
- iii. repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y
- 35 iv. comparar los resultados obtenidos tras las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de deducir una información relativa a al menos un efecto de dicho tratamiento, donde la detección en la etapa iv) de una presencia o de un aumento en el contenido de dicha forma peptídica soluble es indicativo de una eficacia de dicho tratamiento, y donde dichas primera y segunda muestras de superficie cutánea corresponden a estadios de tratamiento diferentes.
4. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la primera muestra representa un estado pretratamiento y la segunda representa un estado durante el tratamiento o post- tratamiento.
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 4, que incluye, además, una etapa que consiste en ajustar en dicho individuo dicho tratamiento por administración de una composición cosmética de cuidado establecida o seleccionada con respecto a la información obtenida tras la etapa iv.
- 45 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha forma soluble complejada deriva de la asociación de la desmogleína I o de uno de sus fragmentos bien con otra proteína desmogleína I o uno de sus fragmentos, bien con una proteína objetivo, particularmente seleccionada entre la desmoculina 2a (Dsc2), las placofilinas 1, 2 y 3, la placoglobina, la calicreína 5, la hormona del crecimiento 1 (GH1), la SSSCA1 (Centromeric Autoantigen 27 kD), la RuvB-like 1, la proteína C3orf10, y la VRK3 (Vaccinia related kinase 3).

Figura 1

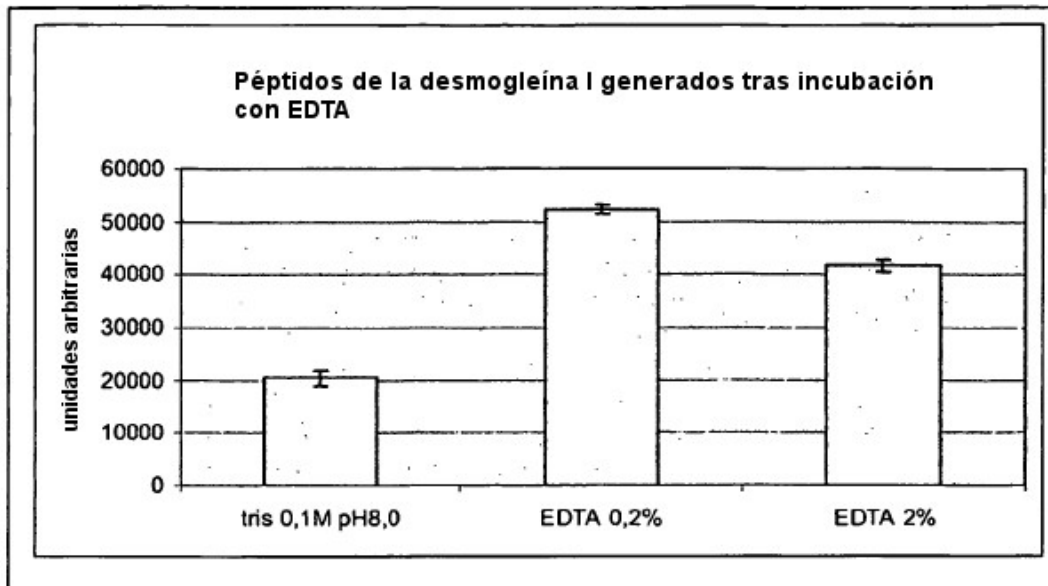


Figura 2

