

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 957**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2011 PCT/IB2011/054190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11773870 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2618808**

54 Título: **Uso cosmético de la dermicidina o fragmentos de ésta**

30 Prioridad:

19.10.2010 US 344827 P

19.10.2010 US 344826 P

24.09.2010 FR 1057699

24.09.2010 FR 1057690

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

17.03.2017

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)

14, rue Royale

75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

DELATTRE, CAROLINE;

GUENICHE, AUDREY;

CASTIEL, ISABELLE y

BERNARD, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

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

ES 2 605 957 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 la dermicidina o fragmentos de ésta

5 [0001] La presente patente se refiere al dominio de los biomarcadores de la piel, y particularmente de la piel madura, asociada o no a una sequedad cutánea, y en su aplicación como dianas o agentes activos cosméticos.

[0002] La epidermis, parte superficial de la piel, es un tejido cuyas células están juntas y unidas unas con otras y descansan sobre una membrana basal.

10 Ésta forma un revestimiento externo que incluye glándulas sebáceas o sudoríparas y los folículos pilosos.

[0003] Más precisamente, la epidermis es una estructura cuya homeóstasis resulta de la ejecución de un conjunto finamente regulado de señales intracelulares y extracelulares que actúan en todas las etapas de la proliferación, de la migración, de la diferenciación celular, así como de la síntesis de diferentes componentes de la matriz extracelular.

15 Estas señales pueden, particularmente, resultar de la acción de factores producidos por los queratinocitos.

[0004] La epidermis se divide convencionalmente en un estrato basal de queratinocitos que contiene, particularmente, células madre cutáneas y que constituye el estrato germinativo de la epidermis, un estrato llamado espinoso constituido por varias capas de células poliédricas dispuestas sobre el estrato basal, un estrato llamado granuloso que comprende de una a tres capas dichas de células aplanadas con inclusiones citoplásmicas distintas, los granos de queratohialina, y finalmente, un conjunto de capas superiores, llamado capa córnea, o estrato córneo, constituido por queratinocitos en la fase terminal de su diferenciación, llamados corneocitos.

20

[0005] La capa córnea, la parte más externa de la piel que asegura la función barrera entre el organismo y el ambiente, y el tallo piloso, parte emergente del folículo piloso que constituye el cabello, representan ambos la terminación del proceso de diferenciación de los queratinocitos.

La diferenciación epidérmica sigue un proceso de maduración en el cual los queratinocitos del estrato basal se diferencian y migran para acabar en la formación de los corneocitos, células muertas totalmente queratinizadas.

30 Esta diferenciación es la resultante de fenómenos perfectamente coordinados que conducirán al mantenimiento de la homeóstasis de la epidermis, y conferirán a la piel un aspecto sano, joven, luminoso y liso.

[0006] Con el envejecimiento, numerosas alteraciones fisiológicas de la piel, resultantes de una disfunción de la homeóstasis de la epidermis, y particularmente de una disfunción de la diferenciación epitelial de los queratinocitos y/o de la síntesis de los proteoglicanos, se producen.

35

[0007] Las alteraciones de la homeóstasis de la epidermis que se producen con el envejecimiento se traducen principalmente en una disminución de la diferenciación de los queratinocitos que causa un déficit de la matriz proteica de las células córneas, en un aumento de las metaloproteasas y de su actividad de degradación de la matriz extracelular, así como en una disminución de la síntesis de diferentes glicosaminoglicanos.

40

[0008] Durante el envejecimiento de la piel, estas alteraciones se traducen, habitualmente, en la aparición de un microrrelieve de la piel más marcado, incluso de arrugas y, al final, la aparición de líneas de expresión profundas, una pérdida de la elasticidad, un tacto rugoso y una sequedad cutánea.

45 En el plano histológico, se observa un aplastamiento de la unión dermoepidérmica y una disminución del grosor de la dermis y de la epidermis.

[0009] Los trastornos de la hidratación cutánea, y particularmente una sequedad cutánea, pueden ser además observados a menudo con la edad.

50

[0010] Por otra parte, muchos factores exteriores pueden reforzar además el desecamiento de la piel o agravar este estado.

Entre estos factores, se pueden citar las condiciones climáticas tales como el frío o el viento, los rayos solares, la exposición a ciertos agentes químicos o terapéuticos.

55

[0011] En el plano fisiológico, una piel seca está a menudo asociada a una bajada de los índices de hidratación cutánea y a una modificación del proceso de maduración del estrato córneo que tiene como signo más visible la aparición de escamillas en la superficie cutánea.

En el plano sensorial, una piel seca se puede caracterizar por una sensación de tirantez y/o de tensión cutánea.

60

[0012] El contenido de colágeno y de glicosaminoglicanos de la piel se ve igualmente disminuido y la función barrera de la piel madura puede verse alterada.

[0013] Se sabe que muchos factores epidérmicos, de los cuales la expresión, la actividad biológica o la maduración son alterados, disminuidos o aumentados, están implicados, directamente o indirectamente, en la producción y la manifestación de la piel madura o de diferentes signos de envejecimiento cutáneo asociados, como la sequedad

65

cutánea.

[0014] Estos factores se pueden utilizar como biomarcadores de la piel, como dianas de cribado, incluso como activos cosméticos.

[0015] Por ejemplo, se conoce por el documento FR 2 924 946 el uso cosmético y/o terapéutico de la ceramidas ácida, de polipéptidos derivados de esta proteína o de análogos de éstos, de una secuencia nucleica que codifica un tal polipéptido o de un agente modulador de la expresión o de la actividad, biológica o bioquímica, de un tal polipéptido, para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo, y como marcador para la valoración de un estado de un epitelio.

[0016] Sin embargo, aún sigue habiendo numerosas incógnitas en cuanto al mecanismo interno y en cuanto al conjunto de los factores implicados en el envejecimiento de la piel, asociado o no a una deshidratación.

[0017] Así, sigue habiendo una necesidad de identificar nuevos biomarcadores de la piel y, particularmente, que sean aptos para caracterizar una piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, en particular una piel madura y seca o signos de sequedad cutánea asociados a una piel madura.

[0018] Existe igualmente una necesidad de disponer de nuevos biomarcadores que permitan caracterizar un estado de la piel y, en particular, una piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, en particular una piel madura y seca o signos de sequedad cutánea asociados a una piel madura.

[0019] Existe aún una necesidad de disponer de nuevas herramientas de cribado de agentes activos o de tratamientos físicos convenientes para el cuidado de la piel, y particularmente útiles para prevenir y/o tratar una piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, en particular una piel madura y seca o signos de sequedad cutánea asociados a una piel madura.

[0020] Existe aún una necesidad de disponer de nuevos activos o de nuevos tratamientos para la prevención y/o el tratamiento de una piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, en particular una piel madura y seca o signos de sequedad cutánea asociados a una piel madura.

[0021] Existe aún una necesidad de disponer de nuevos objetivos cosméticos para el cuidado de la piel, y en particular para la prevención y/o el tratamiento de una piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, asociados o no a una sequedad cutánea.

[0022] La presente invención tiene como objeto satisfacer estas necesidades.

[0023] La presente invención se refiere a, según uno de sus primeros objetos, el uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos codificados por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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 o (ii) de dicha secuencia de ácidos nucleicos, como biomarcador de un estado de la piel madura y/o de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0024] En la presente patente también se describe el uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos codificados por una secuencia de ácidos nucleicos representados por SEC ID N°: 1, de un análogo o de un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos, o (ii) de dicha secuencia de ácidos nucleicos, como biomarcador de un estado de hidratación de la piel, y en particular de la piel seca y/o de los signos de sequedad cutánea.

[0025] En el contexto de la invención, se entiende por « biomarcador », una molécula o la actividad de una molécula, cuya presencia, contenido o grado de actividad es característico de un proceso biológico, fisiológico o patológico, o del impacto o del efecto inducido por la administración de un agente activo o de un tratamiento físico sobre un tal proceso.

[0026] En el contexto de la invención, se entiende por « piel » el conjunto de la epidermis del cuerpo humano, incluyendo el cuero cabelludo y los labios.

De una forma más particular, la piel considerada en la presente invención es preferiblemente los labios, la piel de la cara, del escote, de los brazos o de las piernas y, de manera preferida, la piel de la cara y/o del escote.

[0027] De manera inesperada, en el transcurso de un estudio de proteómica diferencial con la tecnología « iTRAQ », los inventores observaron a partir de proteínas extraídas con cintas adhesivas (stripping) de poblaciones de grupos de edad diferentes que la dermicidina (o DCD) resulta ser un biomarcador sensible y específico de la piel madura.

[0028] Además, se debe señalar que la secuencia de ácido nucleico SEC ID N° :1, que codifica la secuencia de aminoácido SEC ID N° :11, también ha sido descrita como siendo el polinucleótido hcap (para «proteína asociada a caquexia humana»), aislado a partir de una librería de cáncer de mama, como se describe en la patente US 5,834,192.

[0029] Más precisamente, los inventores han observado que los índices de expresión de la dermicidina, y particularmente de péptidos resultantes de la dermicidina e identificados por las secuencias SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18 estaban sistemáticamente disminuidos en las pieles maduras respecto a las pieles jóvenes.

[0030] Además, de manera inesperada, en el transcurso de un estudio de proteómica comparativa por Western Blot, los inventores observaron a partir de proteínas extraídas con cintas adhesivas (*stripping*) de poblaciones de grupos de edad diferentes que presentaban diferentes grados de hidratación cutánea que la dermicidina (o DCD) resulta ser un biomarcador sensible y específico de la piel seca. Así, los inventores han observado que los índices de expresión de la dermicidina, y particularmente de un péptido identificado por la secuencia SEC ID N°: 16 estaban sistemáticamente disminuidos en las pieles secas respecto a las pieles normalmente hidratadas.

Según el conocimiento de los inventores, esta proteína antimicrobiana de la superficie cutánea nunca ha sido clasificada como variante en el curso del envejecimiento o durante la deshidratación de la piel y aún menos como uno de los biomarcadores más pertinentes en salir de este tipo de estudios.

[0031] Se sabe que la sudación disminuye con la edad (Anderson and Kenney 1987; Kenney and Fowler 1988) y que la dermicidina es una proteína sudorípara (Schittek, Hipfel et al., 2001).

Por el contrario, los datos experimentales obtenidos por los inventores muestran manera inesperada que existe un déficit específico de expresión y/o de maduración de la DCD en el transcurso del envejecimiento cutáneo, porque ésta está subrepresentada en las muestras cutáneas, incluso con respecto a otras proteínas de origen sudoríparo.

Además, se puede destacar que la sequedad cutánea es un fenómeno complejo que no está sistemáticamente asociado a un déficit sudoríparo.

[0032] Según otro más de sus objetos, la presente invención se refiere al uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, para cribar agentes activos o tratamientos físicos para el cuidado de la piel madura y/o la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos.

[0033] Los agentes activos o los tratamientos físicos cribados pueden estar de forma más particular destinados a prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0034] En la presente patente, también se describe un uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos, o (ii) de una secuencia de ácidos nucleicos, para cribar agentes activos o tratamientos físicos susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos y destinados a favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel.

[0035] De manera preferida, tales agentes activos o tratamientos físicos se pueden destinar a prevenir y/o tratar la piel seca y/o los signos de sequedad cutánea.

[0036] En el sentido de la invención, se entiende por « expresión » con respecto a una secuencia de aminoácidos, por ejemplo una proteína o un péptido, o a una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo un ARNm, su contenido o la variación de su contenido con respecto a una referencia.

[0037] En el sentido de la invención, se entiende por « maduración » con respecto a una secuencia de aminoácidos, por ejemplo una proteína o un péptido, o a una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo un ARNm, las modificaciones que siguen a su síntesis en un ambiente celular.

Por ejemplo, en el caso de una secuencia de aminoácidos, se entiende por « maduración » las modificaciones post-traduccionales, tales como la glicosilación o la farnesilación de ciertos aminoácidos, o las etapas proteolíticas que conducen a la eliminación de secuencias llamadas « señal » o « secretora » o a la liberación de secuencias que presentan propiedades biológicas particulares.

En el caso de una secuencia de ácidos nucleicos, se entiende por « maduración », por ejemplo, el *splicing* alternativo de un ARNm.

[0038] En sentido de la invención, se entiende por « actividad », con respecto a una secuencia de aminoácidos, por ejemplo una proteína o un péptido, la actividad biológica de la secuencia de aminoácidos, en su caso después de la maduración, tal como una actividad enzimática, una actividad de agonista o de antagonista frente a un receptor, o de activadora o de inhibidora de una enzima, una actividad llamada de « estructura », o una actividad antimicrobiana.

[0039] En el sentido de la invención se entiende por « actividad », con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo un ARNm, su traducción.

[0040] Según otro de sus objetos, la presente invención se refiere al uso (i) de por lo menos una secuencia de

aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0041] En la presente patente, también se describe un uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel seca y/o de los signos de sequedad cutánea.

[0042] Según otro más de sus objetos, la presente invención se refiere al uso cosmético de una cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, como agente activo para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0043] En la presente patente también se describe un uso cosmético de una cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos, o (iii) de por lo menos un agente modulador de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, como agente activo para favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel.

[0044] De manera preferida, tal uso se puede dedicar a prevenir y/o tratar la piel seca y/o los signos de sequedad cutánea.

[0045] En el sentido de la presente invención, se entiende por « cantidad eficaz » de un compuesto de la invención una cantidad suficiente y necesaria de este compuesto para obtener un efecto deseado, y particularmente un efecto cosmético o de cuidado con respecto a la piel madura y/o a los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

Igualmente, una « cantidad eficaz » de un compuesto puede ser una cantidad suficiente y necesaria de este compuesto para obtener un efecto cosmético o de cuidado con respecto a la hidratación de la piel, y en particular de la piel seca y/o de los signos de sequedad cutánea.

[0046] En el contexto de la invención, se entiende por « prevenir », el hecho de reducir el riesgo de que ocurra o de ralentizar la ocurrencia de un fenómeno dado, a saber en la presente invención, la piel madura y/o los signos del envejecimiento cutáneo, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

Igualmente, en el sentido de la patente, se entiende por « prevenir », el hecho de reducir el riesgo de que ocurra o de ralentizar la ocurrencia de una piel seca y/o de los signos de sequedad cutánea.

[0047] Según otro más de sus objetos, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, para preparar un modelo celular epitelial pluriestratificado, preferiblemente un modelo de piel reconstruida, imitando una piel madura, eventualmente asociada a una sequedad cutánea.

[0048] Según otro más de sus objetos, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar un estado de la piel madura y/o de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) efectuar, en una muestra aislada de una piel, una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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 o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, y
- b) comparar dicha medida efectuada en la etapa a) con una medida de referencia.

[0049] Según la diferencia observada entre la medida obtenida y la medida de referencia, la piel será calificada como piel normalmente joven o como piel madura, incluso madura y seca.

[0050] Según una forma de realización preferida, un estado de la piel considerada en la invención es una piel madura elegida de entre pieles que han sufrido un envejecimiento cronológico y/o un envejecimiento fotoinducido.

[0051] En la presente patente, también se describe un procedimiento para caracterizar un estado de hidratación de la piel, y en particular una piel seca y/o signos cutáneos de sequedad, que comprende al menos las etapas

consistentes en:

- a) efectuar, en una muestra aislada de una piel, una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
- b) comparar dicha medida efectuada en la etapa a) con una medida de referencia.

5 [0052] Según la diferencia observada entre la medida obtenida y la medida de referencia, la piel será calificada como piel normalmente hidratada o como piel seca.

10 [0053] Según otro más de sus objetos, la presente patente describe un procedimiento de cribado de agentes activos o de tratamientos físicos susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de una secuencia de aminoácidos de la invención o de una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) disponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos en condiciones propicias para la actividad, la expresión o la maduración de dichas secuencias,
- 15 b) poner en contacto dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos con al menos un agente activo por testar, o exponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos a un tratamiento físico por testar,
- c) efectuar una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
- 20 d) comparar dicha medida a una medida de referencia.

25 [0054] Según la diferencia observada entre la medida obtenida y la medida de referencia, el compuesto o el tratamiento físico cribado serán caracterizados o no como útiles para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0055] Según una forma de realización, el o los agentes activos o el o los tratamientos físicos cribados pueden estar de forma más particular dedicados a prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

30 [0056] En la presente patente también se describe un procedimiento de cribado de agentes activos o de tratamientos físicos susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos y destinados a favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel seca, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) disponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos en condiciones propicias para la actividad, la expresión o la maduración de dichas secuencias,
- 35 b) poner en contacto dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos con al menos un agente activo por testar, o exponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos a un tratamiento físico por testar,
- c) efectuar una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
- 40 d) comparar dicha medida a una medida de referencia.

45 [0057] Según otro objeto, la invención se refiere a un procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de agentes activos o de tratamientos físicos para el cuidado de la piel madura y/o la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o de una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) disponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos en condiciones propicias para la actividad, la expresión o la maduración de dichas secuencias,
- b) poner en contacto dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos con al menos un agente activo por testar, o exponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos a un tratamiento físico por testar,
- 55 c) efectuar una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
- d) comparar dicha medida a una medida de referencia, y
- e) observar una diferencia entre dicha medida y la medida de referencia para caracterizar el agente activo o el tratamiento como útil para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento,
- 60 asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0058] Según otra forma más de realización, la presente invención se refiere a un péptido aislado representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 18.

65 [0059] La presente invención tiene como ventaja proponer un nuevo biomarcador sensible y específico, de un estado de la piel madura y/o signos del envejecimiento cutáneo, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0060] Igualmente, la presente patente tiene como ventaja proponer un nuevo biomarcador sensible y específico de la hidratación de la piel, y en particular de la piel seca o signos de sequedad cutánea.

5 [0061] La observación de la presencia de la dermicidina en el estrato córneo, y particularmente de péptidos salidos específicamente de esta proteína, hace ventajosamente posible una determinación cuantitativa o cualitativa de la expresión o de la actividad de esta proteína, o de los péptidos correspondientes, por simple muestra tópica.

10 [0062] El método de obtención de muestra puede por ejemplo ser una técnica de tipo *stripping* que consiste en aplicar sobre la epidermis considerada una porción de cinta adhesiva. Al despega esta cinta adhesiva, una fracción de la superficie de la piel es tomada como muestra. Después de la extracción proteica, ésta puede ser a continuación analizada a través de métodos convencionales, tales como la dosificación inmunoenzimática ELISA o un análisis Western Blot, o de una forma más particular por el método de proteómica diferencial iTRAQ tal y como se define a continuación.

15 [0063] Asimismo, la presente invención tiene como ventaja poder proporcionar un nuevo biomarcador conveniente para el cribado de nuevos agentes activos o de nuevos tratamientos físicos convenientes a la prevención y/o al tratamiento de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea. Igualmente, la presente patente tiene como ventaja poder proporcionar un nuevo biomarcador conveniente para el cribado de nuevos agentes activos o de nuevos tratamientos físicos útiles para favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel. De manera preferida, tales agentes o tratamiento pueden convenir para la prevención y/o al tratamiento de la piel seca y/o signos de sequedad cutánea.

20 [0064] Igualmente, según otra ventaja, la presente invención permite proponer nuevos agentes activos convenientes para la prevención y/o el tratamiento de las pieles mayores y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos

30 [0065] La dermicidina o preproteolisina (DCD) es una proteína de 110 aminoácidos (SEC ID N°: 11) que comprende un péptido señal de 19 aminoácidos (SEC ID N°: 14) cuyo gen se localiza sobre el cromosoma 12, locus 12q13.1. Dos isoformas de esta proteína son recensadas, una más corta, isoforma 1 (SEC ID N°: 12), la otra más larga, isoforma 2 (SEC ID N°: 13).
35 Ésta es secretada en el sudor (Schittek, Hipfel et al. 2001).

[0066] Después de la división del péptido señal, la dermicidina (DCD) es una proteína de 90 aminoácidos según la secuencia SEC ID N°: 16.

40 [0067] Después de una maduración post-traducciona proteolítica, esencialmente por la catepsina D, que tiene lugar en el sudor (Baechle, Flad et al., 2006), este precursor proteico da nacimiento a la DCD-1 (SEC ID N°: 19) y a la DCD-1L (SEC ID NO :20) así como a numerosos péptidos cuya longitud varía de 25 a 48 aa (Flad, Bogumil et al. 2002).

45 [0068] Excepto si se indica lo contrario, el término « dermicidina » pretende designar en la presente patente las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20, que han sufrido o no una maduración post-traducciona.

50 [0069] Según una forma de realización preferida, se entiende por dermicidina de una forma más particular la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 16.

[0070] Entre los péptidos resultantes de la maduración de la dermicidina, como se describe en US 2008/020976, algunos muestran actividades antimicrobianas contra diferentes microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, o *Candida albicans*.

55 Los péptidos antimicrobianos son derivados de la parte C-terminal de la proteína.

[0071] La parte N-terminal de la proteína (SEC ID N°: 15) está constituida por un factor biológicamente activo que favorece la supervivencia celular (Cunningham, Hodge et al. 1998).

60 [0072] Esta proteína es expresada de manera constitutiva en la glándula sudorípara (Rieg, Garb et al. 2004), y está implicada en las vías de señalización de tipo PI3K/AKT/mTOR, particularmente importante en los fenómenos de proliferación y de supervivencia celular (Moreira, Strauss et al.2008). La disminución de la DCD observada en el sudor de los individuos que padecen atopia podría explicar en parte su susceptibilidad microbiana (Rieg, Steffen et al. 2005).

65 [0073] Algunos de los fragmentos antimicrobianos, así como de la parte N-terminal, son capaces de estimular la

producción de citocinas/quimiocinas a través de queratinocitos u otros tipos celulares que la implican en la regulación de la inmunidad cutánea (Watchorn, Dowidar et al. 2005; Niyonsaba, Suzuki et al. 2009).

Recientemente se ha propuesto el uso de la DCD como un marcador específico particularmente sensible de la presencia de rastros de sudor por RT-PCR o por ELISA utilizable en el dominio forense (Sakurada, Akutsu et al. 2009).

[0074] Una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la presente patente se puede codificar por una secuencia de ácidos nucleicos representados por SEC ID N°: 1, o ser un análogo o un fragmento de esta secuencia de aminoácidos.

[0075] Por « análogo de una secuencia de aminoácidos », se pretende designar toda secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 85%, preferiblemente de por lo menos 90%, y más preferiblemente de por lo menos 95 % con dicha secuencia, y una actividad biológica de la misma naturaleza.

[0076] Por « actividad biológica de la misma naturaleza » con respecto a una secuencia de aminoácidos se puede entender las propiedades antimicrobianas o de estímulo de la supervivencia y/o de la proliferación celular habitualmente atribuidas a la dermicidina.

Preferiblemente, por « actividad biológica de la misma naturaleza » con respecto a una secuencia de aminoácidos se entiende las propiedades de prevención y/o de tratamiento con respecto a la piel madura o signos del envejecimiento cutáneo, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, incluso con respecto a la piel seca y/o signos de sequedad cutánea.

[0077] La identidad de secuencia se puede determinar por comparación visual o mediante cualquier herramienta informática habitualmente utilizada en el dominio, como los programas BLAST disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov y utilizados con los parámetros configurados por defecto.

[0078] Un análogo puede ser un agente peptidomimético.

[0079] Un análogo de una secuencia de aminoácidos puede resultar de modificaciones salidas de mutación o de variación en las secuencias de los péptidos provenientes ya sea de la eliminación o de la inserción de uno o varios aminoácidos, ya sea de la sustitución de uno o varios aminoácidos, ya sea incluso de un *splicing* alternativo. Varias de estas modificaciones pueden combinarse.

[0080] Ventajosamente, un análogo de una secuencia de ácidos puede comprender sustituciones conservadoras con respecto a esta secuencia de aminoácidos.

[0081] Como ejemplo de mutaciones que se pueden considerar en la presente patente, se puede mencionar, de manera no exhaustiva, el reemplazo de uno o varios residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos que tienen un índice hidropático similar sin afectar, no obstante, de manera sensible a las propiedades biológicas del polipéptido.

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).

[0082] Una secuencia de aminoácidos o un análogo a ésta puede ser una secuencia de aminoácidos que ha sufrido una o varias maduración(es) post-traduccionales(es).

[0083] Por « maduración(es) post-traduccionales(es) », se pretende englobar el conjunto de las modificaciones que una secuencia de aminoácidos es susceptible de sufrir a la salida de su síntesis en una célula, tal y como por ejemplo una o varias fosforilación(es), una o varias tiolación(es), una o varias acetilación(es), una o varias glicosilación(es), una o varias 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.

[0084] Un análogo de una secuencia de aminoácidos presenta, además, sensiblemente la misma actividad biológica que esta secuencia de aminoácidos.

[0085] Además, se sabe que una secuencia primaria de aminoácidos puede comprender sitios específicamente reconocidos por enzimas de tipo proteasa, tales como la tripsina, que, una vez el reconocimiento de estos sitios sea efectivo, inducirán la división de la secuencia por proteólisis.

Esta proteólisis resulta en la generación de diversos péptidos, o fragmentos de secuencias de aminoácidos.

[0086] En consecuencia, la patente describe igualmente fragmentos de la dermicidina, salidos en su caso de su proteólisis.

[0087] En el sentido de la patente, se entiende por « fragmento de una secuencia de aminoácidos » toda porción de la secuencia de aminoácidos que comprende de 3 a 48 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia, preferiblemente de 6 a 36, preferiblemente 8 a 32, y más preferiblemente de 10 a 30 aminoácidos consecutivos de

dicha secuencia, y tiene una actividad biológica de la misma naturaleza.

5 [0088] Una secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11 a 20, particularmente entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, un análogo, o un fragmento de ésta.

10 [0089] Una secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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, un análogo, o un fragmento de ésta.

[0090] Una secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, o SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19 o SEC ID N°: 20, un análogo o un fragmento de ésta.

15 [0091] Una secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos representados por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19 o SEC ID N°: 20, un análogo o un fragmento de ésta.

20 [0092] Una secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, un análogo o un fragmento de ésta.

25 [0093] Un polipéptido puede igualmente ser una secuencia de aminoácidos natural o sintética, en su caso susceptible de ser obtenida después de la lisis enzimática o química de la dermicidina o por síntesis química o biológica o por extracción de un tejido biológico, como por ejemplo la piel, expresando naturalmente esta secuencia de aminoácidos o después de la transfección de éste, así como las distintas formas post-traduccionales de éste, o incluso cualquier secuencia de aminoácidos natural o sintética cuya secuencia comprenda totalmente o parcialmente una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, por ejemplo las variantes y los análogos.

30 [0094] El experto en la técnica puede obtener una secuencia de aminoácidos conforme a la invención mediante procedimientos a base de ADN recombinante, como por ejemplo los descritos en el manual « Molecular Cloning - A Laboratory Manual » (2nd edition), Sambrook et al., 1989, vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY, (Sambrook).

35 [0095] Según un objeto, la presente patente describe como tal un péptido aislado representado por una secuencia de aminoácidos elegida de entre SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 18, un análogo o un fragmento de ésta.

[0096] La invención se refiere en particular a un péptido aislado representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 18.

40 [0097] Según otra forma de realización, una secuencia de aminoácidos puede igualmente ser una secuencia de aminoácidos tal y como se ha definido previamente, fusionada con otra secuencia de aminoácidos, un agente de cribaje hidrófilo o hidrófobo, un precursor de bioconversión, un agente de marcaje luminiscente, radioactivo o colorimétrico.

45 [0098] De manera no limitativa, se pueden citar, como ejemplo de compuestos susceptibles de ser acoplados a una secuencia de aminoácidos conforme a la invención, las proteínas fluorescentes como la « proteína verde fluorescente », los compuestos químicos fluorescentes, tales como la rodamina, la fluoresceína, o el Texas Red®, compuestos fosforescentes, elementos radioactivos, tales como ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²¹I o ¹²⁵I, o agentes de marcaje colorimétrico como los substratos cromógenos sensibles a la acción de la galactosidasa, de la peroxidasa, de la cloranfenicol acetiltransferasa, de la luciferasa o de la fosfatasa alcalina.

50 [0099] Según la naturaleza de los compuestos susceptibles de ser acoplados con una secuencia de aminoácidos según la patente, el acoplamiento se puede llevar a cabo 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.

55 [0100] Ventajosamente, una secuencia de aminoácidos según la patente puede ser codificada por una secuencia de ácidos nucleicos elegida de entre una secuencia representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, un análogo o un fragmento de ésta.

60 [0101] La presente patente describe asimismo secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos y su aplicación en las distintas utilizaciones y procedimiento de la patente.

65 [0102] Así, la presente patente describe igualmente una secuencia de ácidos nucleicos, particularmente de ácidos desoxirribonucleicos, o de ácidos ribonucleicos, representada por la SEC ID N°: 1, un análogo o un fragmento de ésta.

[0103] En el sentido de la presente patente, se entiende por « fragmento de secuencia de ácidos nucleicos », una secuencia de ácidos nucleicos que comprende de 9 a 144 pares de bases consecutivas de dicha secuencia, preferiblemente de 18 a 108, preferiblemente 24 a 96, y más preferiblemente de 30 a 90 pares de bases consecutivas de dicha secuencia, y que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia.

[0104] En el sentido de la presente patente, se entiende por « análogo de una secuencia de ácidos nucleicos » una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 85%, preferiblemente de por lo menos 90%, y más preferiblemente de por lo menos 95 % con dicha secuencia, y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una actividad biológica igualmente naturaleza que la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia.

[0105] Por « análogo de una secuencia de ácidos nucleicos », se pretende designar una secuencia de ácidos nucleicos, eventualmente resultante de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y que codifica una secuencia de aminoácidos según la patente, particularmente como se ha definido previamente.

[0106] Una secuencia de ácidos nucleicos según la patente se puede representar por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 2, 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 y SEC ID N°: 10, un análogo o un fragmento de ésta.

[0107] Una secuencia de ácidos nucleicos según la patente puede ser de cualquier origen posible, a saber o bien animal, en particular de mamíferos y aún más particularmente humano, o bien vegetal, ya sea microorganismos, tales como por ejemplo virus, fagos, o bacterias entre otros, o incluso de hongos, sin prejuzgar el hecho de que estén presentes de manera natural o no en dicho organismo de origen.

[0108] La patente describe asimismo secuencias de ácidos nucleicos aisladas y purificadas que codifican una secuencia de aminoácidos considerados según la patente, y sus análogos y fragmentos.

[0109] Una secuencia de ácidos nucleicos según la patente puede comprender una secuencia sentido, anti-sentido o interferencial correspondiente a una secuencia que codifica un polipéptido según la patente.

[0110] La patente tiene igualmente como objetivo secuencias de ácidos nucleicos, particularmente de ácidos ribonucleicos o desoxirribonucleicos, que comprenden una secuencia sentido o anti-sentido, particularmente « ARN interferente pequeño » (ARNip), correspondiente al menos a una secuencia que codifica un polipéptido de la invención o una secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, un análogo o un fragmento de ésta.

Piel madura y signos cutáneos del envejecimiento

[0111] Por « piel madura », se entiende un estado general de la piel resultante del envejecimiento cronológico y/o del envejecimiento fotoinducido.

[0112] Por « signos cutáneos del envejecimiento », se entienden todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debido al envejecimiento ya sea de origen cronológico y/o fotoinducido.

[0113] Como ejemplo de estas modificaciones consideradas en la invención, se pueden citar las líneas de expresión y las arrugas, la piel marchita, la falta de elasticidad y/o de tono de la piel, el adelgazamiento de la dermis y/o el deterioro de las fibras de colágeno, lo que comporta una apariencia de piel blanda y arrugada.

[0114] Se entiende igualmente todas las modificaciones internas de la piel que no se traducen sistemáticamente en un aspecto exterior modificado, como por ejemplo todos los deterioros internos de la piel, y particularmente el deterioro de las fibras de elastina, o fibras elásticas, después de una exposición a la radiación ultravioleta.

[0115] En particular, los signos cutáneos del envejecimiento considerados por la invención son elegidos de entre un adelgazamiento de la piel, una pérdida de firmeza, una pérdida de elasticidad, una pérdida de densidad, o una pérdida de tonicidad de la piel, una sequedad de la piel, la aparición de un microrrelieve de la piel marcada, la formación y/o la presencia de arrugas y/o de líneas de expresión, una alteración del brillo de la tez de la piel, un aspecto papiráceo de la piel, una alteración del olor de la piel, un hundimiento de la piel, y un envejecimiento de la piel.

De manera preferida, los signos cutáneos del envejecimiento considerados por la invención son elegidos entre un adelgazamiento de la piel, la aparición de un microrrelieve de la piel marcada, la formación y/o la presencia de arrugas y/o de líneas de expresión, un hundimiento de la piel, y un envejecimiento de la piel.

[0116] De manera más preferida, los signos cutáneos del envejecimiento considerados por la invención son elegidos

de entre la aparición de un microrrelieve de la piel marcada, la formación y/o la presencia de arrugas y/o de líneas de expresión, un hundimiento de la piel, y un envejecimiento de la piel.

5 [0117] Se entiende por « hidratación de la piel », el conjunto de los mecanismos celulares y moleculares que llevan a asegurar y a mantener la presencia de una cantidad de agua fisiológica en la epidermis y la dermis, así como la cantidad de agua resultante.

[0118] Según un aspecto, la patente tiene como objetivo mantener e incluso estimular la homeóstasis de estos mecanismos, y así a favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel.
10 Así, según un aspecto, la patente está dirigida a las pieles que presentan un estado hidratado fisiológico, igualmente calificado de normal.

[0119] Según otro aspecto, la patente tiene como objetivo restaurar el equilibrio o reducir el riesgo de que se produzca un desequilibrio en la homeóstasis de estos mecanismos, y así prevenir y/o tratar la piel seca y/o los signos de sequedad cutánea.
15

[0120] Por « signos de sequedad cutánea », se entienden todas las modificaciones del aspecto de la piel debidas a un déficit de agua en la epidermis y/o la dermis.

20 [0121] Según el grado de manifestación del déficit de agua de la piel, una piel seca puede parecer rugosa al tacto, arrugada, incluso cubierta de escamillas.
Una piel seca puede manifestarse, esencialmente, por una sensación de tirantez y/o de tensión.

[0122] Por « piel seca », se entiende un estado general de la piel resultante de un déficit de agua en la epidermis y/o de la dermis.
25

[0123] Una piel seca puede manifestarse por un trastorno de la descamación y presentar diferentes estadios en función de la gravedad de esta descamación.

30 [0124] Cuando la piel es ligeramente seca, estas escamillas son abundantes pero poco visibles a simple vista, la eliminación se efectúa corneocito a corneocito.
Éstas son cada vez menos numerosas pero cada vez más visibles a simple vista cuando este desorden se agrava, los cúmulos pueden comprender varias centenas de corneocitos, representando así cúmulos más o menos grandes, llamados escamillas.
35

[0125] La sequedad cutánea puede ser constitucional o adquirida.

[0126] En el caso de la piel seca constitucional, se pueden distinguir dos categorías: las pieles patológicas y las pieles no patológicas.
40

[0127] Las pieles secas constitucionales patológicas están esencialmente representadas por la dermatitis atópica y las ictiosis.
Éstas son casi independientes de las condiciones exteriores y tienen su origen en modificaciones genéticas conocidas o desconocidas.
45

Entre las modificaciones genéticas conocidas que afectan a la hidratación cutánea se pueden citar, por ejemplo, las modificaciones del gen de la Transglutaminasa-1 o las del gen de la filagrina.

[0128] También se describe una composición farmacéutica o dermatológica que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable una, cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos según la patente, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos según la patente, o (III) de por lo menos un agente modulador de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, como agente activo para prevenir y/o tratar las pieles secas constitucionales patológicas seleccionadas de entre la dermatitis atópica y la ictiosis.
50

[0129] En el caso de las pieles secas constitucionales no patológicas, la gravedad 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 en la cara, las extremidades y el dorso de las manos).
60

[0130] 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 los rayos solares o también a ciertos tratamientos terapéuticos (retinoides, por ejemplo) es determinante.
65

Bajo estas influencias exteriores, la epidermis puede volverse momentáneamente y localmente seca. Esto puede suceder a cualquier tipo de epidermis.

[0131] Cualquiera que sea el origen, una piel con sequedad cutánea puede presentar, habitualmente, los signos siguientes: aspecto rugoso y escamoso al tacto, así como una flexibilidad y una elasticidad disminuidas.

5 [0132] La piel seca, igualmente denominada « xerosis », puede aparecer a cualquier edad, y no estar unida a una condición patológica.
Se hablará en este caso de sequedad « adquirida ».

10 [0133] Sin embargo, la xerosis se vuelve más frecuente y molesta con la edad, particularmente en caso de las mujeres.
Se habla entonces de xerosis senil.
Además, las mujeres sufren habitualmente un agravamiento del desecamiento cutáneo durante 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 del antebrazo y las manos.

15 [0134] Como ya 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.
20 La sequedad cutánea puede igualmente ser inducida por un estrés exógeno, de origen químico, por ejemplo de tipo detergente aniónico, o incluso de origen mecánico (rozamiento, afeitado).

[0135] Un uso cosmético según la patente puede convenir ventajosamente para prevenir y/o tratar las pieles secas seniles o frágiles, o la xerosis, particularmente elegida de entre la xerosis vulgar, la xerosis senil y la xerosis invernal.

25 [0136] Aunque ningún estudio haya demostrado una incidencia de la sequedad sobre el origen y la formación de las líneas de expresión y arrugas que son esencialmente atribuibles al envejecimiento, en el plano visual una piel seca las hace más aparentes.
Una piel seca puede, por lo tanto, ser asociada a una piel madura con líneas de expresión o arrugas.

30 [0137] Además, en el plano sensorial, la sequedad cutánea se caracteriza por una sensación de tirantez y/o de prurito.
Por razones evidentes, estas manifestaciones no son sólo fuente de, por ejemplo, dolores, sino también de una apariencia antiestética.

35 [0138] También se describe un uso cosmético que puede convenir ventajosamente para prevenir y/o tratar las sensaciones de tirantez y/o de prurito asociadas a las pieles secas.

40 [0139] Como ejemplos de signos de sequedad cutánea considerados en la patente, se pueden citar la piel marchita, la falta de elasticidad, de flexibilidad y/o de tono de la piel, el tacto rugoso, la presencia de grietas, la descamación, la presencia de escamas, o las líneas de expresión y arrugas asociadas a la piel seca.

45 [0140] Los signos de sequedad cutánea considerados también son todas las modificaciones internas de la piel que no se traducen sistemáticamente en un aspecto exterior modificado, como por ejemplo todos los deterioros internos de la piel, y particularmente el deterioro de las fibras de elastina, o fibras elásticas, consecutivas a un desecamiento de la dermis.
Según un aspecto, los signos de sequedad cutánea son elegidos de entre una piel marchita, una falta de elasticidad, de flexibilidad y/o de tono de la piel, un tacto rugoso, una presencia de grietas, una descamación, una presencia de escamas, las líneas de expresión y arrugas asociadas a la piel seca, y una sensación de tirantez y/o de prurito.

50 [0141] Según la invención, la piel madura o los signos cutáneos del envejecimiento pueden estar asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

Biomarcador

55 [0142] La presente invención se refiere al uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 20, y preferiblemente se elige entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, como biomarcador de un estado de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado(a) o no a una sequedad cutánea.

60 [0143] La presente invención se refiere al uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 20, y preferiblemente se elige entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, como biomarcador de un estado de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0144] En la presente patente, también se describe el uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos según la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos según la patente, como biomarcador de un estado de hidratación de la piel, y particularmente de la piel seca y/o signos de sequedad cutánea.

5 [0145] De manera preferida, un uso conforme a la patente permite caracterizar un estado de la piel como la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

10 [0146] Según una forma de realización, una disminución de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicho biomarcador puede ser indicativa de una piel madura y/o de signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

15 [0147] Según una forma de realización, también se describe que una disminución de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicho biomarcador puede ser indicativa de una piel con déficit de hidratación, y particularmente de una piel seca y/o de signos de sequedad cutánea.

La patente también se refiere al uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos según la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos según la patente, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel, y preferiblemente de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

20 [0148] También se describe el uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos según la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos según la patente, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel seca y/o de los signos de sequedad cutánea.

25 [0149] Según una forma de realización, un aumento de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicho biomarcador puede ser indicativo de un tratamiento cosmético eficaz para ejercer un efecto beneficioso sobre la piel y, más preferiblemente, un efecto con respecto a la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

30 [0150] También se describe que un aumento de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicho biomarcador puede ser indicativo de un tratamiento cosmético eficaz para ejercer un efecto beneficioso sobre la piel con déficit de hidratación y, más preferiblemente, un efecto con respecto a la piel seca y/o signos de sequedad cutánea.

35 [0151] En un uso conforme a la patente, una disminución o un aumento de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicho biomarcador se puede determinar por comparación a una medida de referencia obtenida según cualquier método conocido por el experto en la técnica.

40 [0152] Una « medida de referencia » respecto a un parámetro dado es una medida cualitativa o cuantitativa de este parámetro efectuada en condiciones llamadas « controles » o « normales », por ejemplo determinada en una muestra de referencia, o determinada en una muestra en ausencia de un tratamiento que se presume tiene un efecto sobre el parámetro.

45 [0153] Por ejemplo, una medida de referencia para una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos según la patente puede ser un valor cuantitativo o cualitativo relativo a la expresión, la maduración o la actividad de dichas secuencias determinado en una muestra de piel joven y fisiológicamente sana, o determinado en una muestra de piel, particularmente de piel madura, antes de un tratamiento cosmético.

50 [0154] Igualmente, por ejemplo, una medida de referencia para una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos según la patente puede ser un valor cuantitativo o cualitativo relativo a la expresión, la maduración o la actividad de dichas secuencias determinado en una muestra de piel fisiológicamente sana y normalmente hidratada, o determinado en una muestra de piel seca, antes de un tratamiento cosmético.

55 [0155] Preferiblemente, una medida de referencia es una medida estadística, es decir, que ha sido repetida sobre diferentes muestras para obtener una media.

[0156] La medida de referencia se puede efectuar paralelamente o secuencialmente a la medida de prueba.

60 [0157] También puede ser una medida « histórica », es decir, efectuada anteriormente a la medida de prueba, y almacenada, por ejemplo en una base de datos, para un uso posterior.

65 [0158] Una comparación de la medida de prueba a una medida de referencia, y una observación de una desviación o de una ausencia de desviación entre las dos medidas, permite sacar una información en cuanto al parámetro medido, por ejemplo la disminución o el aumento de la expresión, de la maduración o de la actividad de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos según la patente.

[0159] Tal información puede ser posteriormente aplicada para determinar el carácter joven o maduro de una piel. Igualmente, tal información puede ser posteriormente aplicada para determinar el carácter normalmente hidratado o seco de una piel

5 [0160] Un procedimiento según la patente puede igualmente ser efectuado sobre una muestra de piel, tomada de un modelo celular epidérmico, o de una piel aislada reconstruida con el fin de calificar su estado.

[0161] Según una forma de realización, la patente se refiere a un procedimiento, en particular *in vitro* o *ex vivo*, para caracterizar un estado de la piel.

10 [0162] También se describe un procedimiento, en particular *in vitro* o *ex vivo*, para caracterizar un estado de hidratación de la piel.

15 [0163] Un procedimiento según la patente permite ventajosamente caracterizar un estado de edad de la piel y/o signos del envejecimiento cutáneo, y particularmente caracterizar un estado de edad de la piel de origen cronológico y/o fotoinducido.

[0164] También se describe que un procedimiento según la patente permite ventajosamente caracterizar un estado seco de la piel y/o signos de sequedad cutánea.

20 [0165] La invención se refiere a un procedimiento cosmético *in vitro* o *ex vivo*, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, en un individuo que lo necesite, que comprende al menos las etapas consistentes en:

25 a) efectuar, antes de la aplicación del tratamiento cosmético, en una primera muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una primera medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de por lo menos una secuencia de aminoácidos elegida de entre la 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 o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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,

30 b) efectuar, después de la aplicación del tratamiento cosmético, en una segunda muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una segunda medida, cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y

35 c) comparar la primera y la segunda medida, particularmente con el fin de obtener una información relativa a un efecto al menos de la aplicación del tratamiento cosmético.

[0166] Según una forma de realización particular, la secuencia de aminoácidos es representada entre una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18.

40 [0167] Es evidente que las medidas efectuadas en las etapas a) y b) deben ser comparables una a la otra, y por lo tanto ser relativas al mismo parámetro.

45 [0168] De manera preferida, este procedimiento de la invención permite resaltar un efecto de un tratamiento cosmético susceptible de hacer disminuir la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0169] También se describe un procedimiento cosmético, o no terapéutico, en particular *in vitro* o *ex vivo*, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel seca y/o signos de sequedad cutánea, en un individuo que lo necesita, que comprende al menos las etapas consistentes en:

50 a) efectuar, antes de la aplicación del tratamiento cosmético, en una primera muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una primera medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de una secuencia de aminoácidos según la patente o de una secuencia de ácidos nucleicos según la patente,

55 b) efectuar, después de la aplicación del tratamiento cosmético, en una segunda muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una segunda medida, cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos según la patente o de dicha secuencia de ácidos nucleicos según la patente, y

60 c) comparar la primera y segunda medidas, particularmente con el fin de obtener una información relativa a un efecto al menos de la aplicación del tratamiento cosmético.

[0170] Es evidente que las medidas efectuadas en las etapas a) y b) deben ser comparables una a la otra, y por lo tanto ser relativas al mismo parámetro.

65 [0171] De manera preferida, también se describe que un procedimiento de la invención permite resaltar un efecto de un tratamiento cosmético susceptible de hacer retroceder la piel seca y/o los signos de sequedad cutánea.

[0172] La medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente se puede determinar por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

5 [0173] Como ejemplo de métodos que convienen a la invención, se puede hacer mención a la reacción de polimerización en cadena (PCR), cuantitativa (Q-PCR) o no, en presencia o no de transcriptasa inversa (RT-PCR o Q-RT-PCR), el Northern blot, el método « ensayo de protección con ribonucleasa », los métodos con chips de ADN, los métodos con chips transcriptómicos, los métodos con chips de oligonucleótidos, los métodos de hibridación in situ.

10 [0174] Como ejemplo de agentes convenientes para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos según la patente, y en particular de una secuencia de ARNm, se puede hacer mención a sondas de ácidos nucleicos marcados que se pueden hibridar a una secuencia de ácidos nucleicos según la patente.

15 [0175] Tal sonda de ácidos nucleicos puede ser fácilmente obtenida por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0176] Así, las secuencias de ácidos nucleicos descritas por la patente se pueden utilizar para realizar cebadores oligonucleótidos sentido y/o anti-sentido, que se hibridan en condiciones de fuerte astringencia con al menos una de las secuencias SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, un análogo o un fragmento de éstas.

20 [0177] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos puede igualmente ser determinada, de manera indirecta, por la determinación de la expresión de la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia, mediante cualquier técnica conocida en el dominio, tal y como el Western Blot, el ELISA, el método de Bradford o de Lowry, o como se indica a continuación.

[0178] La medida cualitativa o cuantitativa, de la expresión, de la maduración, o de la actividad de una secuencia de aminoácidos se puede efectuar mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

30 [0179] En calidad de métodos de detección de la expresión, de la maduración, o de la actividad de una secuencia de aminoácidos, se puede hacer mención al Western blot, el Slot blot, el Dot blot, los métodos ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) de tipo singleplex o múltiplex, los métodos de proteómica o de glicómica, de coloración de polipéptidos en un gel de poliacrilamida por un colorante a base de plata, por azul de Coomassie o por SYPRO, la inmunofluorescencia, la absorción UV, los métodos inmunohistoquímicos en microscopía tradicional, electrónica o confocal, FRET (fluorescence resonance energy transfer/transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), los métodos de TR-FRET (time resolved FRET/FRET en tiempo resuelto), los métodos de FLIM (fluorescencia lifetime imaging microscopy/conjunto de imágenes por microscopía en 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 posterior al fotoblanqueo), los métodos por gen transportador, los métodos de AFR (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 radioinmunoensayos (RIA), los métodos de focalización isoeléctrica, y las pruebas enzimáticas, los métodos que aplican 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).

[0180] De manera más general, se pueden usar métodos de dosificación inmunoenzimáticos a partir de soluciones de proteínas, más cuantitativas y sensibles.

50 Estos métodos de tipo ELISA asocian parejas de anticuerpos de captura y de detección específica del antígeno dirigido.

Se pueden utilizar anticuerpos comerciales o anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes desarrollados específicamente.

También se pueden llevar a cabo técnicas ELISA multiplex de gran capacidad.

55 Así, se puede citar el método multiplex de tipo anticuerpo sobre bolas Luminex (por ejemplo Bioplex de Bio-Rad), de tipo anticuerpo sobre superficie plana (« antibodies-arrays ») (por ejemplo el método propuesto por la empresa MesoScale Discovery).

[0181] En particular, puede ser ventajoso detectar la expresión de una secuencia de aminoácidos, a través de un anticuerpo, en su caso bajo una forma marcada.

Un tal anticuerpo se puede marcar a través de una sustancia detectable directamente o detectable por reacción con otro reactivo.

65 [0182] Por « anticuerpo », se pretende designar manera general anticuerpos monoclonales o policlonales, así como fragmentos de inmunoglobina susceptibles de ligar un antígeno y que se pueden producir por cualquier técnica de ingeniería genética conocida por el experto en la técnica o por corte enzimático o químico de anticuerpos intactos.

- 5 [0183] Un anticuerpo susceptible de ser utilizado como herramienta de evaluación de un estado de una epidermis puede ser obtenido mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, tal como se describe en « Antibodies: A Laboratory Manual », Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).
- [0184] Según una forma de realización preferida, puede ser ventajoso detectar la expresión de una secuencia de aminoácidos de la invención por medio de un método proteómico diferencial « iTRAQ ».
- 10 [0185] Según una forma de realización preferida, puede ser igualmente ventajoso detectar la expresión de una secuencia de aminoácidos de la invención a través de un Western Blot.
- [0186] Tal método es conocido por el experto en la técnica y puede ventajosamente ser llevado a cabo como se describe en los ejemplos a continuación.
- 15 [0187] De manera particular, por « actividad » con respecto a una secuencia de aminoácidos se entiende una actividad antimicrobiana, una actividad de estímulo de la supervivencia celular, una actividad de estímulo de la proliferación celular, o una actividad de reducción o de prevención de la piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, como se indica anteriormente.
- 20 [0188] También de manera particular, por « actividad » con respecto a una secuencia de aminoácidos se entiende una actividad antimicrobiana, una actividad de estimulación de la supervivencia celular, una actividad de estimulación de la proliferación celular, o una actividad de reducción o de prevención de la piel seca y/o signos de sequedad cutánea, como se indica anteriormente.
- 25 [0189] Tal actividad se puede determinar por cualquier método conocido por el experto en la técnica, como por ejemplo, por valoración de la proliferación o de la supervivencia de células epidérmicas en cultivos, tales como queratinocitos, o por valoración de la actividad antimicrobiana sobre bacterias en cultivo, tales como *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*.
- 30 [0190] De manera preferida, la determinación de un estado de la piel o la caracterización de la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel se pueden efectuar por medición de la variación de la expresión de una secuencia de aminoácidos, y preferiblemente representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19 o SEC ID N°: 20, un análogo o un fragmento de ésta.
- 35 [0191] Los procedimientos de la patente son particularmente ventajosos en la medida en que su realización no necesita de recurrir a una técnica invasiva.
Una muestra de epidermis puede así ser obtenida por las técnicas llamadas de « *stripping* » y directamente analizada por una técnica de análisis convencional conocida por el experto en la técnica.
- 40 [0192] 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 « *stripping* » con tiras adhesivas.
Gracias a estos « *strippings* », los corneocitos adheridos y el contenido de sus espacios intercelulares se pueden tomar y someter después a una extracción que permite tener acceso al contenido proteico.
- 45 [0193] La toma de una muestra conveniente para un procedimiento de la patente puede también ser efectuada de manera más directa por « lavados » de la superficie cutánea, por medio por ejemplo de accesorios de tipo turbina con aleta, de tipo célula con espiral tal y como se describe en la patente FR 2 667 778 asociada a un circuito fluídico, o simplemente por adición/extracción de una gota de tampón a la superficie de la piel.
- 50 [0194] A título indicativo, otros métodos de extracción adaptados a la ejecución de los procedimientos de la patente pueden ser mencionados, tales como los métodos por raspado de la parte superior del estrato córneo a través de un sistema biláminas.
Esta técnica permite recoger escamillas que pueden a continuación ser directamente analizadas por diferentes técnicas para determinar los índices de minerales, aminoácidos o lípidos.
- 55 [0195] Ventajosamente, uno de los marcadores de la patente se puede aplicar con el fin de una elección preclínica, más eficaz y más rigurosa, de individuos, con el objetivo de evaluar la eficacia del tratamiento o del activo cosmético para el cuidado de la piel.
- 60 [0196] Asimismo, de manera ventajosa, uno de los marcadores de la patente se puede aplicar con el fin de una selección preclínica, más eficaz y más rigurosa, de individuos, con el objetivo de evaluar la eficacia del tratamiento o del activo cosmético para el cuidado de la piel seca.
- 65 [0197] Asimismo, un biomarcador de la patente puede ser aplicado ventajosamente como se indica anteriormente para evaluar la eficacia de un agente activo, in vitro, ex vivo o in vivo con respecto a un déficit de hidratación de la

piel, o pieles secas o signos de sequedad cutánea.

[0198] Asimismo, un biomarcador de la patente puede ser aplicado ventajosamente como se indica anteriormente para evaluar la eficacia de un agente activo, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

[0199] Asimismo, un biomarcador de la patente se puede aplicar para establecer un consejo personalizado de un tratamiento cosmético para un individuo en función de su perfil de expresión de biomarcadores cutáneos.

Cribado

[0200] Según uno de sus aspectos, la presente patente se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, de ácidos nucleicos tal y como se describe en la patente, para cribar o en un procedimiento de cribado, en particular *in vitro* o *ex vivo*, de agentes activos o de tratamientos físicos, conveniente particularmente para el cuidado de la piel.

Los agentes activos o los tratamientos físicos cribados pueden convenir particularmente para el cuidado de la piel madura, y/o para la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

[0201] También se describe el uso de una secuencia de aminoácidos, de ácidos nucleicos según la patente, para cribar o en un procedimiento de cribado, en particular *in vitro* o *ex vivo*, de agentes activos o de tratamientos físicos, conveniente particularmente para el cuidado de la piel y destinados a favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel.

[0202] Igualmente, los agentes activos o los tratamientos físicos cribados pueden convenir particularmente para el cuidado de la piel seca, y/o a la prevención y/o el tratamiento de los signos de sequedad cutánea.

[0203] Un uso o un procedimiento de la patente puede comprender la comparación de una medida de la actividad, de la expresión o de la maduración de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos según la patente con una medida de referencia.

[0204] Una medida de referencia puede ser tal y como se ha definido previamente.

[0205] En particular, una medida de referencia puede ser un valor cuantitativo o cualitativo relativo a la expresión, la maduración o la actividad de dichas secuencias determinado en una muestra en ausencia de agente activo o de tratamiento físico testado.

[0206] Así, una medida de referencia se puede obtener repitiendo las etapas de un procedimiento de la invención, y particularmente las etapas a), b) y c) de un procedimiento de la invención como se ha definido previamente, en ausencia de compuestos biológicos o químicos, o de tratamientos físicos por testar.

[0207] Una comparación de la medida de prueba con una medida de referencia, y una observación de una desviación o de una ausencia de desviación entre las dos medidas permite obtener una información en cuanto al efecto del agente activo o del tratamiento físico testado.

[0208] La determinación cuantitativa o cualitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos se puede efectuar por cualquier método conocido por el experto en la técnica, y particularmente como se ha descrito anteriormente.

[0209] Según una forma de realización, el cribado de un agente activo o de un tratamiento físico susceptible de modular la actividad de una secuencia de aminoácidos puede hacerse por medición de la actividad o de la expresión de una molécula objetivo que pertenece a las vías de señalización o de metabolismo en las cuales se puede implicar dicha una secuencia de aminoácidos, como por ejemplo un sistema de gen reportero.

[0210] Según una forma de realización, un procedimiento según la patente se puede aplicar en un sistema acelular, esto es, en un sistema que no comprende células pero que reproduce funciones celulares, o en una muestra celular aislada.

[0211] Un procedimiento conforme a la patente se puede efectuar sobre una muestra celular aislada, una muestra acelular, sobre una secuencia de aminoácidos aislada o sobre una secuencia de ácidos nucleicos aislada descrita por la patente, obtenidos por biopsia cutánea, a partir de células en cultivo, particularmente de un modelo epidérmico, o de una toma de superficie cutánea no invasiva, particularmente por adhesivo (« *tape-stripping* ») de estrato córneo o por simple lavado, como se ha descrito anteriormente.

[0212] Ventajosamente, como muestra celular conveniente para la patente, se puede mencionar una muestra de queratinocitos o cualquier otro tipo celular de la piel que expresa una secuencia de aminoácidos descrita por la patente.

[0213] De manera preferida, el cribado de un agente activo o de un tratamiento físico se puede efectuar por medida

de la variación de la expresión, en presencia y en ausencia del agente activo o del tratamiento físico cribado, de una secuencia de aminoácidos según la patente, y preferiblemente representada por una secuencia elegida entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, o SEC ID N°: 18, un análogo o un fragmento de ésta.

5 Agente modulador

[0214] Se entiende por « agente modulador » o « agente activo o un tratamiento físico susceptible de modular la expresión, la maduración o la actividad de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos », todo compuesto o fenómeno físico susceptible de actuar, directamente o indirectamente, sobre al menos una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos conformes a la patente, o sobre un elemento de una vía de señalización intra o extracelular, o de una vía metabólica, o de regulación de la transcripción y/o de la traducción que implica dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos.

[0215] Se entiende por « modular », respecto a un efecto dado, la acción de estimular o de inhibir este efecto.

[0216] Los agentes activos o los tratamientos físicos salidos de un cribado según la patente pueden ser ventajosamente utilizados con fines cosméticos, particularmente para la piel madura o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

También se describe que los agentes activos o los tratamientos físicos salidos de un cribado según la patente pueden ser ventajosamente utilizados con fines cosméticos, particularmente para la hidratación de la piel, y en particular de la piel seca o signos de sequedad cutánea.

[0217] Según una forma de realización, un agente activo según la patente puede ser un agente estimulador de la actividad, de la expresión o de la maduración de una secuencia de aminoácidos de la invención.

[0218] En particular, un agente estimulador se puede elegir entre un lisado de *Bifidobacterium sp.* y una mezcla compuesta de un lisado de *Bifidobacterium sp.* y de fitoesfingosina-salicilato.

[0219] De manera preferida, un lisado de *Bifidobacterium sp.* puede ser un lisado de *Bifidobacterium longum*.

Un lisado de *Bifidobacterium longum* que conviene a una realización según la patente puede ser el 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° CAS: N° 96507-89-0.

Un tal lisado es particularmente comercializado con la denominación Repair Complex CLR® por la empresa K. RICHTER GmbH.

[0220] Una mezcla compuesta de un lisado de *Bifidobacterium sp.* y de fitoesfingosina-salicilato según la patente puede comprender un lisado de *Bifidobacterium longum* como se ha definido previamente y un derivado de fitoesfingosina-salicilato.

[0221] Un derivado de fitoesfingosina-salicilato conveniente a la ejecución de la patente puede ser el derivado comercializado por la empresa EVONICK GOLDSCHMIDT con la denominación Phytosphingosine SLC®.

[0222] Una mezcla según la patente puede comprender un lisado de *Bifidobacterium sp.* en una proporción de 10 % y un derivado de fitoesfingosina-salicilato en una proporción de 0,002 %.

[0223] Como agente modulador susceptible de ser cribado según un uso o un procedimiento conforme a la patente, también se puede mencionar los anticuerpos, o los ARN interferentes.

Composiciones

[0224] La presente patente también se refiere a composiciones, particularmente cosméticas, que comprenden, en un medio fisiológicamente o cosméticamente aceptable, una cantidad eficaz de por lo menos una secuencia de aminoácidos descrita por la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente.

[0225] De una forma más particular, la patente describe una composición cosmética que comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos elegida de entre SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 18, un análogo o un fragmento de ésta o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un tal péptido.

[0226] La invención se refiere a una composición cosmética que comprende un péptido aislado representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 18 o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un tal péptido.

[0227] En el sentido de la presente invención, se entiende por « medio fisiológicamente aceptable », un medio conveniente para la administración de una composición por vía tópica sobre la piel, el cuero cabelludo, o los labios, o por vía oral o por vía parenteral tal y como la vía intradérmica o subcutánea.

[0228] Una composición según la patente puede contener adyuvantes habituales en el dominio considerado, tales

como gelificantes hidrófilos o lipófilos, aditivos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, solventes, perfumes, cargas, filtros, absorbentes de olores y materias colorantes.

5 [0229] Las cantidades de los diferentes componentes de las composiciones según la patente son las habitualmente utilizadas en los dominios considerados.

[0230] La cantidad de secuencia de aminoácidos, o de secuencia de ácidos nucleicos descrita en la patente, también llamada « cantidad eficaz » es, por supuesto, función de la naturaleza del activo y del efecto deseado y puede, por lo tanto, variar en gran medida.

10 [0231] Para dar un orden de tamaño, una composición puede contener una secuencia de aminoácidos, o una secuencia de ácidos nucleicos, 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 [0232] Según otra forma de realización, una composición cosmética de la patente puede comprender, además, al menos un agente activo cosmético y/o terapéutico adicional.

20 Activos adicionales

[0233] Como ejemplos de agentes activos adicionales utilizables en el contexto de la presente patente, se puede hacer mención a los 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.

25 [0234] También puede ser posible utilizar otros agentes activos que permiten mejorar el estado de la piel y/o de sus anexos, tales como activos hidratantes o humidificantes o agentes activos que permiten mejorar la barrera lipídica natural, tales como ceramidas, sulfatos de colesterol y/o ácidos grasos, y sus mezclas.

30 [0235] También puede ser posible utilizar otros agentes activos que permiten mejorar el estado de la piel y/o de sus anexos, tales como activos anti-envejecimiento.

[0236] También puede ser posible utilizar enzimas que tienen una actividad sobre la piel y/o sus anexos, tales como proteasas, lipasas, glucosidasas, amidasas, cerebrosidadasas y/o melanasas, y sus mezclas.

35 [0237] Como otros ejemplos de agentes activos convenientes para la realización de la presente patente figuran: los activos analgésicos, los activos anti-levaduras, 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 anti-radicales libres, los activos anti-seborreicos, los activos antipeliculares, los activos antiacné, los activos para prevenir el envejecimiento de la piel y/o para mejorar su estado,
40 los activos antidermatitis, los activos antiirritantes, los activos inmunomoduladores, los activos para el tratamiento de la piel seca, los activos antitranspirantes, los activos anti-psoriásicos, los activos protectores contra los UV, los activos antihistamínicos, los activos cicatrizantes, los activos autobronceantes, los antioxidantes tales como el té verde o 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,
45 insensibilizantes, blanqueantes, nutrientes, los activos que disminuyen la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea, y sus mezclas.

[0238] Como activos adicionales susceptibles de convenir a una forma más particular a la ejecución de la patente también se pueden mencionar los microorganismos probióticos, además de los considerados en el lisado previamente descrito, los activos prebióticos, los activos que favorecen la síntesis de factor de defensa de la piel, los activos que permiten restablecer el equilibrio entre diferenciación/proliferación de las células de la epidermis, en particular tales como los activos de tipo retinol o similares al retinol, los activos hidratantes o activos que estimulan la actividad de proteasa cutánea, particularmente de la catepsina D.

55 Uso cosmético

[0239] La presente patente se refiere al uso cosmético de una cantidad eficaz de por lo menos una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos descrita en la patente, como agente activo para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

60 [0240] También se describe el uso cosmético de una cantidad eficaz de por lo menos una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos descrita en la patente o de por lo menos un agente modulador de la actividad, de la expresión o de la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y particularmente un agente modulador como se ha definido previamente, como agente activo para favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel.

65

[0241] También se describe que un uso según la patente se puede dedicar a prevenir y/o tratar una piel seca y/o signos de sequedad cutánea.

5 [0242] Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento cosmético para prevenir y/o tratar una piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea de un individuo que lo necesite, que comprende al menos una etapa que consiste en administrar a dicho individuo al menos una composición que comprende como agente activo (i) al menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6.

[0243] Un procedimiento o un uso de la patente permiten prevenir y/o tratar el envejecimiento cutáneo, particularmente cronológico y/o fotoinducido.

15 [0244] Un procedimiento o un uso según la patente permiten conferir y/o restaurar un aspecto joven a la piel, que se manifiesta por una piel lisa, elástica, tónica, o firme, o una tez luminosa.

[0245] Un procedimiento o un uso según la patente permiten prevenir y/o reducir la presencia de un microrrelieve marcado de la piel, en particular a nivel de la comisura de los labios y las patas de gallo.

20 [0246] Un procedimiento o un uso según la patente permiten reforzar las propiedades de barrera de la piel.

[0247] En la presente patente también se describe un procedimiento cosmético, o no terapéutico, para favorecer y/o reforzar la hidratación de la piel, y preferiblemente para prevenir y/o tratar una piel seca y/o signos de sequedad cutánea, de un individuo que lo necesite, el procedimiento que comprende al menos una etapa que consiste en administrar a dicho individuo al menos una composición que comprende como agente activo (i) al menos una secuencia de aminoácidos descrita por la patente o (ii) al menos una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente, o (iii) al menos un agente modulador de la actividad, de la expresión o de la maduración de dichas secuencias descritas por la patente, particularmente tal como se ha definido anteriormente.

30 [0248] Un procedimiento o un uso según la patente también permiten conferir y/o restaurar un aspecto hidratado y sano a la piel, que se manifiesta en una piel lisa, elástica, tónica, o firme, o una tez luminosa.

35 [0249] Un procedimiento o un uso según la patente también permite prevenir y/o reducir la presencia de escamillas, de rugosidades, de grietas, de escamas y/o de líneas de expresión o arrugas asociadas a la piel seca o con déficit de hidratación.

[0250] Un procedimiento o un uso según la patente permiten igualmente reforzar las propiedades de barrera de la piel.

40 [0251] De manera preferida, un procedimiento según la patente puede comprender la aplicación por vía tópica sobre al menos una parte de la piel de un individuo que lo necesite, en particular sobre la piel de la cara y/o del escote, de por lo menos una capa de una composición tópica de la invención.

45 [0252] Ventajosamente, un procedimiento según la patente por vía tópica puede comprender la aplicación sobre la piel, y particularmente sobre la piel de la cara, de una composición según la patente en forma de una máscara.

[0253] Un procedimiento cosmético por vía tópica según la patente puede comprender ventajosamente la aplicación de una composición según la patente, en asociación de manera simultánea, sucesiva o separada en el tiempo respecto a una composición cosmética o dermatológica adicional diferenciada de la composición según la patente y destinada al cuidado y/o al maquillaje de la piel.

50 [0254] Según otra forma de realización preferida, un procedimiento cosmético según la patente se puede aplicar por vía oral, particularmente por administración de por lo menos una composición alimenticia o dietética con fines cosméticos.

[0255] Según otra forma de realización preferida, un procedimiento cosmético según la patente se puede aplicar por vía parenteral.
La realización por vía parenteral de un procedimiento cosmético según la patente se efectúa con excepción de toda intervención quirúrgica y sólo pretende ejercer un tratamiento superficial de la piel con fines estéticos.

60 [0256] Así, un procedimiento cosmético según la patente por vía parenteral se aplica por cualquier técnica de inyección o dispositivo conveniente para una inyección intraepidérmica y/o intradérmica y/o subcutánea.

65 [0257] Tal administración puede ser efectuada, por ejemplo, por mesoterapia.

[0258] Un procedimiento cosmético por vía parenteral sólo se traduce, por lo tanto, en una fractura superficial de la piel y sale por lo tanto de todo marco médico o terapéutico.

5 [0259] Para la vía parenteral, se podrá alternativamente dar preferencia a la administración mediante parches de alcance sistémico.

[0260] Un procedimiento cosmético según la patente se puede aplicar de manera diaria, por ejemplo a razón de una única administración por día, o de una administración fraccionada en dos o tres veces al día, por ejemplo una vez por la mañana y una vez por la tarde.

10 [0261] Un procedimiento cosmético según la patente se puede aplicar a lo largo de un período de tiempo que varía de una semana a varias semanas, incluso varios meses, este período que puede además ser repetido después de los períodos de no tratamiento durante varios meses, incluso varios años.

15 [0262] Como ejemplo de procedimiento cosmético según la patente, se puede prever una administración de una composición descrita por la patente, por ejemplo, en una proporción de 1, 2 o 3 veces al día, o más, y habitualmente durante una duración prolongada de por lo menos 4 semanas, incluso de 4 a 15 semanas, con, en su caso uno o varios períodos de interrupción.

20 Piel reconstruida

[0263] Según otro aspecto, la presente patente se refiere al uso de una cantidad eficaz de por lo menos una secuencia de aminoácidos descrita por la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente, para preparar un modelo celular epitelial pluriestratificado, preferiblemente un modelo de piel reconstruida.

25 [0264] El interés de desarrollar modelos organotípicos más cercanos a las condiciones *in vivo* es grande para la evaluación de la seguridad y eficacia de los activos y fórmulas para aplicaciones cosméticas y dermatológicas.

30 [0265] El uso de por lo menos una secuencia de aminoácidos descrita por la patente, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente, o de por lo menos un agente modulador descrito por la patente, en un medio de cultivo es susceptible de mejorar la calidad de los modelos desarrollados.

35 [0266] Un modelo de piel reconstruida según la patente puede ser útil para imitar una piel madura, eventualmente asociada a una sequedad cutánea, o las condiciones de una restauración de la homeóstasis de una piel madura, eventualmente asociada a una sequedad cutánea.

[0267] Según otro aspecto, la presente patente se refiere a un procedimiento de preparación de un modelo celular epitelial pluriestratificado aislado, y preferiblemente una piel reconstruida aislada que comprende al menos la etapa de poner en contacto al menos una cantidad eficaz de por lo menos una secuencia de aminoácidos, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos, con células susceptibles de generar una piel reconstruida aislada, y particularmente queratinocitos.

45 [0268] Un modelo de piel reconstruida puede comprender diferentes tipos celulares, tales como queratinocitos, fibroblastos, células de Langerhans y melanocitos. Las células de tipo fibroblastos pueden ser irradiadas o no.

[0269] Tales modelos y su preparación son conocidos por el experto en la técnica.

50 [0270] Según otro aspecto más, la presente patente también describe un procedimiento de preparación de un modelo celular epitelial pluriestratificado, preferiblemente un modelo de piel reconstruida, que comprende al menos una etapa de puesta en cultivo de células de por lo menos un tipo celular de dicho modelo, dichas células habiendo sido genéticamente modificadas para suprimir la expresión de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácido nucleicos descrita por la patente.

55 [0271] La adquisición de células genéticamente modificadas para suprimir la expresión de una secuencia de aminoácidos o de una secuencia de ácidos nucleicos descrita por la patente, células llamadas « *knock-out* », se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

60 [0272] Por ejemplo, tales células se pueden obtener por transfección y recombinación homóloga de un fragmento de ácido nucleico que se inserta en o toma la ubicación del gen que expresa la secuencia de aminoácidos cuya expresión se desea suprimir.

65 [0273] Igualmente, puede ser posible suprimir la expresión de un gen dado por transfección en la célula de una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN interferente específico del ARNm sacado del gen cuya expresión se desea suprimir.

Leyendas de las figuras

5 [0274] Figura 1: representa la variación de la expresión de la dermicidina (media \pm sem) medida por Western Blot en función del grado de hidratación de la piel.

[0275] En el sentido de la presente patente, « un » debe entenderse, excepto si se indica lo contrario, en el sentido de « al menos un ».

10

[0276] Los ejemplos y figuras a continuación se presentan a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplos**Ejemplo 1**

Expresión de la dermicidina, en la piel

1- Materiales y métodos

20

a- protocolo iTRAQ

[0277] La detección de la expresión de la dermicidina (DCD) se realizó mediante el método iTRAQ (Isobaric Tagging Reagents for Quantitative Proteomic Analysis) desarrollado por la empresa Applied Biosystems.

25 Este método permite la cuantificación de péptidos previamente marcados por un marcador isobárico. Existe 4 marcadores diferentes y se pueden comparar hasta 4 tipos de muestras distintas en una mismo análisis LC-MS-MS.

[0278] El principio de este método es el siguiente:

30

- Digestión de extractos proteicos y marcaje:

[0279] En primer lugar, cada extracto proteico es digerido por una enzima proteolítica: la tripsina.

35 [0280] En segundo lugar, cada mezcla peptídica obtenida es marcada con un marcador isobárico de una masa total 145, que comprende un grupo « reportero » de masa 114, 115,116 o 117, y un grupo « balance » de masa 31, 30,29 o 28, ligados entre sí por un sitio de fragmentación MS.

[0281] El marcaje es obtenido por reacción del Peptide Reactive Group de cada marcador con las aminas primarias de los péptidos (extremo N-terminal de los péptidos o la cadena lateral de las lisinas o de las tirosinas).

40

- Análisis LC-MS-MS y cuantificación:

[0282] Después de la etapa de marcaje, las muestras se ponen en común y son analizadas por espectrometría de masa.

45

Un péptido dado, presente en varias muestras, tendrá una masa progenitora idéntica pero su espectro de fragmentación MS/MS generará la masa del grupo transportador característico de cada uno de los reactivos iTRAQ. La comparación de la intensidad de cada ion transportador (114, 115,116 o 117) permite entonces la cuantificación del péptido.

50

[0283] El método iTRAQ es descrito más precisamente por Zieske (J. Exp.mBot., 2006,57 :1501) o Wiese et al.(Proteomics, 2007,7 :340).

b- Extracción y tratamiento de las muestras cutáneas

55

[0284] Las extracciones de tipo *stripping* con tira adhesiva del estrato córneo de una superficie de 90 cm² se obtienen según el protocolo descrito por Mehul et al., J. Biol. Chem., 2000,275(17):12841-7, a nivel de la cara externa de la pierna. Se realiza la extracción de dos grupos de sujetos:

1) Grupo « Piel Moven »: 18-40 años, 27 sujetos masculinos;

60

2) Grupo « Piel Madura »: superior a 60 años, 35 sujetos masculinos.

[0285] Estas extracciones de piel son a continuación analizadas por proteómica por medio de la técnica llamada de « marcaje isobárico », previamente descrita, utilizando el kit iTRAQ Reagents Multiplex kit (4352135), de Applied Biosystems, según las instrucciones del fabricante.

65

2- Resultados

[0286] Entre las proteínas identificadas, los péptidos representados por las secuencias SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18 salidas de la dermicidina (N° de depósito P81605 - Ref.: Swissprot/Uniprot) son detectados y cuantificados en cuatro experimentos.

5

[0287] Los resultados de cuantificación de la dermicidina se dan en la tabla siguiente:

Proteína	N°Experimento Ratio 116/114 Maduro/Joven				Media	Desviación estándar
	1	2	3	4		
Dermicidina	0,3937	0,2465	0,4356	0,4209	0,37	0,09

[0288] Estos resultados muestran que el ratio iTRAQ medio de maduro/joven es igual a $0,37 \pm 0,09$. Esta medida traduce una fuerte expresión de la dermicidina en las pieles del grupo « piel joven », y una fuerte disminución de su expresión en las pieles del grupo « piel madura ».

10

[0289] La dermicidina se revela por lo tanto como un biomarcador interesante y específico de la piel, y particularmente de un estado de edad de la piel, asociado o no a una sequedad cutánea.

15

[0290] La expresión de la apolipoproteína D y de la cadena pesada de la catepsina D ha sido medida a modo de datos comparativos.

[0291] Los resultados obtenidos se expresan en la tabla siguiente.

20

Proteína	N°Experimento Ratio 116/114 Maduro/Joven				Media	Desviación estándar
	1	2	3	4		
Apolipoproteína D	0,7975	0,7455	0,8205	0,9062	0,82	0,07
Cadena pesada de la catepsina D	0,9580	1,1068	0,9595	0,9537	0,99	0,07

[0292] En comparación con la dermicidina, la apolipoproteína D y la cadena pesada de la catepsina D no están más que muy ligeramente subexpresadas en el grupo « piel madura » en relación al grupo « piel joven ».

25

[0293] Este estudio valida así el uso de la dermicidina como biomarcador de excepción de la piel, y particularmente de la piel madura, asociada o no a una sequedad cutánea.

Ejemplo 2

Expresión de la dermicidina en la piel

30

1- Materiales y métodos

a- Protocolo Western-Blot

35

[0294] La detección de la expresión de la dermicidina (DCD) se realizó a través de un método de Western-Blot.

[0295] El principio de este método es el siguiente: las proteínas se separan por migración electroforética sobre un gel Critérium SDS-PAGE 10-20 % (Bio-Rad). Después de una transferencia semi seca sobre membrana PVDF, las proteínas se incuban en una solución de bloqueo (TBS+ 0,1 %de Tween+ 1 de % leche) y luego son incubadas con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés durante una noche a 4 °C.

40

Una segunda incubación con el anticuerpo secundario (acoplado a una peroxidasa) dirigido contra el anticuerpo primario se efectúa durante una hora a temperatura ambiente.

45

[0296] Según el grado de sensibilidad, diferentes kits se utilizan para la revelación: ECL, ECL+ o ECL Advance (Amersham). La imagen es adquirida en FluorSmax (Biorad) y las bandas cuantificadas con ayuda de un software Quantity-One (Biorad)

Proteína	Naturaleza de las muestras	Anticuerpo I	Dilución	Anticuerpo II	Detección	Peso mol. calculado
Dermicidina	Desnaturalizada	Sc-27466/poly	1/100 IgG anti-Cabra-HRP	ECL+ 60seg	9kDa	

b- Extracción y tratamiento de las muestras cutáneas

[0297] 120 individuos de sexo femenino, mayores de 18 a 70 años, fueron seleccionadas para este estudio.

5 [0298] Se delimitaron cuatro zonas por pierna (pierna izquierda externa/interna, pierna derecha externa/interna). Las extracciones se realizan por *stripping* con tira adhesiva (en la parte inferior de la pierna) según el protocolo descrito por Mehul et al., (J. Biol. Chem., 2000,275(17):12841-7).

10 [0299] Para este estudio, el análisis se efectúa sobre una zona: la pierna izquierda externa.

[0300] Las muestras salidas de la extracción con cintas adhesivas (*stripping*) fueron utilizadas para el análisis Western Blot. Antes de la realización de las tomas, los tipos de pieles fueron caracterizados por una puntuación clínica.

15 [0301] La puntuación clínica es realizada por un dermatólogo según el « Atlas de la piel seca en las piernas » con el fin de identificar los diferentes tipos de pieles según los grados que aparecen a continuación:

- 0: piel normal, relieve cutáneo regular, aspecto liso
- 1: piel ligeramente seca, relieve cutáneo estriado, aspecto áspero
- 20 2: piel seca, relieve cutáneo estriado y algunas escamillas, aspecto áspero
- 3: piel muy seca, numerosas escamillas y algunas escamas, aspecto rugoso
- 4: piel extremadamente seca, numerosas pieles, aspecto rugoso

Preparación de los polvos acétonicos

25 [0302] Cada tira de *stripping* de 75 cm² se sumerge en 75 ml de acetona. El barniz se disuelve y los corneocitos están en suspensión. La mezcla se filtra en bomba de vacío sobre membrana de nylon de 40 µm para recoger los corneocitos.

30 Dos lavados sucesivos se efectúan con el mismo volumen de acetona. Se obtienen polvos acétonicos de estrato córneo en forma seca.

Extracción de las muestras

35 [0303] Se realizan dos tipos de extracción de manera sucesiva: extracción nativa y luego desnaturalizante.

Extracción nativa

40 [0304] Los polvos acétonicos se pesan y se colocan en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Trefflab cat.Nº.96,07246,9,01). 100 µl de tampón PBS 0,1 % tritón X100 se añaden a 1 mg de polvo acétonico y la mezcla se deja una hora en contacto en el cristal.

Luego se tritura durante 30 segundos en el cristal.

El medio es a continuación recuperado en columnas Millipore Ultraree de 0,45 µm y luego centrifugado durante 5 min a 10000 g a 4 °C: el sobrenadante es entonces recogido.

Una dosificación de proteínas se realiza según la técnica del BCA (kit BCA Pierce).

45 Las muestras se ajustan a una concentración de 0,15 mg/ml en tampón Laemmli 4X y son conservadas a -20 °C a la espera del análisis.

Extracción desnaturalizante

50 [0305] Se realiza a partir del sedimento del extracto nativo. En tubos Eppendorf de 1,5 ml (Trefflab cat.Nº.96,07246,9,01) se agregan 100µl de tampón Laemmli 1X al sedimento para 1 mg de polvo acétonico.

La mezcla se hierve durante 10 min a 90 °C y luego se tritura durante 20 segundos y se centrifuga durante 10 min a 10000 G/min. El sobrenadante es recogido. Una dosificación de proteínas se realiza según la técnica de Bradford.

Las muestras se ajustan a 1 mg/ml y son conservadas a -20 °C a la espera del análisis.

55 [0306] Estas muestras de piel son a continuación analizadas por Western Blot como se ha descrito previamente. Los resultados se obtuvieron a partir de los extractos desnaturalizados.

Análisis estadístico

60 [0307] El efecto de la sequedad cutánea (puntuación clínica) sobre el nivel de expresión de los biomarcadores ha sido analizado a la vez gráficamente representando los valores medios con su intervalo de confianza en función de los grupos de edad o de la puntuación clínica de sequedad cutánea, y con ayuda de un modelo de regresión múltiple con los parámetros edad y puntuación de sequedad cutánea en covariables.

65 [0308] La significatividad de los coeficientes (prueba de Student) asociados a las covariables permite testar la

asociación entre el biomarcador estudiado con la edad y la puntuación de sequedad.

Tener en cuenta los dos parámetros del modelo permite apreciar el efecto de uno de los parámetros ajustando sobre el efecto del segundo (con los otros parámetros manteniéndose iguales).

- 5 [0309] El nivel de significatividad de las pruebas se fija en 5 % en un método bilateral no ajustado. Los análisis han sido efectuados con ayuda del software SPPSS versión 17. Los niveles de expresión de los biomarcadores fueron previamente transformados (raíz cuadrada o Log10) cuando era útil para, a la vez, simetrizar su distribución y estabilizar su variación.

10 2- Resultados

[0310] Los resultados obtenidos, ilustrados por la figura 1, muestran claramente una disminución de la expresión de la dermicidina correlacionada con un aumento del grado de deshidratación, o de sequedad, de la epidermis.

- 15 [0311] El análisis estadístico confirma una disminución significativa de la expresión de la dermicidina en las pieles secas respecto a las pieles normales (p=0,046).

[0312] Este estudio valida así el uso de la dermicidina como biomarcador de excepción de la hidratación de la piel, y particularmente de la piel seca.

20

Ejemplo 3

Efecto de un lisado de *Bifidobacterium* sp. sobre la expresión de la dermicidina

25 1- Materiales y métodos

[0313] Las extracciones de muestras de pieles, y las medidas de la expresión de la dermicidina se realizan como se indica en el ejemplo 1.

- 30 [0314] Los voluntarios son sujetos femeninos mayores de 30 a 65 años. Se han combinado y distribuido en dos subgrupos según el tratamiento administrado, un grupo « Placebo », y un grupo « Tratado ».

35 [0315] El grupo « tratado » recibe por vía tópica, sobre la pierna, en una proporción de 2 veces al día, mañana y tarde, durante 56 días, o sea 2 meses, una composición que comprende 10 % de Repair Complex® en una fórmula soporte correspondiente a una emulsión aceite en agua desmineralizada Arlacel/Myrj que contiene 5 % de Parleam, 15 % de ciclopentasiloxano, 3 % de glicerina y 2 % de vaselina.

40 [0316] El Repair Complex® comprende un lisado de *Bifidobacterium longum* registrado bajo el nombre INCI: Bífida ferment Lysate, bajo el nombre EINECS: *Bifidobacterium longum*, bajo el N° EINECS: N° 306-168-4, y bajo el N° CAS: N° 96507-89-0. Este lisado es comercializado con la denominación Repair Complex CLR® por la empresa K. RICHTER GmbH.

45 [0317] El grupo « Placebo » recibe, por el contrario, únicamente la fórmula soporte.

[0318] Para cada condición de sujetos « Tratado » y « Placebo », se obtiene una media de los ratios J56/J0, permitiendo de este modo de evaluar el efecto del tratamiento.

50 [0319] Los ratios J56/J0 se calculan según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de efecto del tratamiento} = 100 * \frac{\text{Ratio J56/J0 « Tratado »} - \text{Ratio J56/J0 « Placebo »}}{\text{ratio J56/J0 « Placebo »}}$$

55 2- Resultados

[0320] Los datos sin procesar obtenidos al final del análisis son los siguientes:

Experimento 1	
Ratio J56/J0 Placebo	Ratio J56/J0 Tratado
2,70	3,10
Experimento 2	
Ratio J56/J0 Placebo	Ratio J56/J0 Tratado

1,00	1,62
------	------

[0321] El valor medio del ratio J56/J0 « Placebo » es de 1,85, mientras que el valor medio del ratio J56/J0 « Tratado » es de 2,36.

5 [0322] El tratamiento con el Repair Complex® se traduce en un aumento de la señal de 27 % respecto al placebo.

[0323] Así, la administración, por vía tópica, de un lisado de *Bifidobacterium longum* incrementa la expresión de la dermicidina aproximadamente un 30 % después de 2 meses de tratamiento.

10 [0324] La administración, por vía tópica, de un lisado de *Bifidobacterium sp.* Permite, por lo tanto, restaurar un nivel de expresión de la dermicidina a nivel de la piel, y particularmente de la piel madura, asociada o no a una sequedad cutánea, propicio para reforzar su acción de protección de la piel, para reforzar las propiedades de barrera de la piel y para reducir los signos cutáneos del envejecimiento, asociados o no a una sequedad cutánea.

15 [0325] La administración, por vía tópica, de un lisado de *Bifidobacterium sp.* permite igualmente restaurar un nivel de expresión de la dermicidina a nivel de la piel seca, propicio para reforzar su acción de protección de la piel, para reforzar las propiedades de barrera de la piel y para reducir los signos de sequedad cutánea.

20 [0326] Este estudio valida además el uso de la dermicidina como biomarcador para evaluar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel madura, y como herramienta de cribado de nuevos agentes activos destinados al tratamiento de la piel madura, asociada o no a una sequedad cutánea.

Ejemplo 4

25 Efecto de una mezcla lisada de *Bifidobacterium longum* y de fitoesfingosina salicilato sobre la expresión de la dermicidina

1- Materiales y métodos

30 [0327] Las extracciones de muestras de pieles y las medidas de la expresión de la dermicidina se realizan como se indica en el ejemplo 1.

[0328] Los voluntarios son sujetos femeninos mayores de 40 a 45 años. Cada sujeto es su propia muestra de control, se extraen muestras de los dos brazos pero sólo uno se trata con el producto testado y el segundo brazo recibe un placebo.

35 [0329] El brazo « tratado » recibe por vía tópica, en una proporción de 2 veces al día, mañana y tarde, durante 56 días, es decir 2 meses, una composición que comprende 10 % de Repair Complex® y 0,002 % de Phytosphingosine-SLC en una fórmula soporte correspondiente a una emulsión aceite en agua desmineralizada Arlacel/Myrj que contiene 5 % de Parleam, 15 % de ciclopentasiloxano, 3 % de glicerina y 2 % de vaselina.

[0330] El Repair Complex® comprende un *Bifidobacterium longum* registrado bajo el nombre INCI: Bifida ferment Lysate, bajo el nombre EINECS: *Bifidobacterium longum*, bajo el N° EINECS: N° 306-168-4, y bajo el N° CAS: N° 96507-89-0.

45 Este lisado es comercializado con la denominación Repair Complex CLR® por la empresa K. RICHTER GmbH.

[0331] El derivado fitoesfingosina-salicilato es el comercializado por la empresa EVONICK GOLDSCHMIDT con la denominación Phytosphingosine SLC®.

50 [0332] El brazo « Placebo » recibe únicamente la fórmula soporte.

[0333] Para cada condición « Tratado » y « Placebo », se obtiene una media de los ratios J56/J0 como se indica anteriormente, permitiendo de este modo evaluar el efecto del tratamiento.

55 2- Resultados

[0334] Los datos sin procesar obtenidos al final del experimento son los siguientes:

Experimento nº 1	
Ratio J56/J0 Placebo	Ratio J56/J0 Tratado
0,75	1,66
Experimento nº2	

Ratio J56/J0 Placebo	Ratio J56/J0 Tratado
0,45	0,81

[0335] El valor medio del ratio J56/J0 « Placebo » es de 0,6, mientras que el valor medio del ratio J56/J0 « tratado » es de 1,235.

5 [0336] El efecto del tratamiento es igual a 105%, y traduce una duplicación de la expresión de la dermicidina en relación al « Placebo ».

[0337] Así, la administración, por vía tópica, de una mezcla que comprende un lisado de *Bifidobacterium longum* y fitoesfingosina-salicilato incrementa la expresión de la dermicidina en más de 100 %.

10 [0338] La administración, por vía tópica, de una mezcla que comprende un lisado de *Bifidobacterium longum* y fitoesfingosina-salicilato permite, por lo tanto, restaurar un nivel de expresión de la dermicidina a nivel de la piel, y particularmente de la piel madura, asociada o no a una sequedad cutánea, propicio para reforzar su acción de protección de la piel, para reforzar las propiedades de barrera de la piel, y para reducir los signos cutáneos del envejecimiento, asociados o no a una sequedad cutánea.

15 La administración, por vía tópica, de una mezcla que comprende un lisado de *Bifidobacterium longum* y fitoesfingosina-salicilato permite igualmente restaurar un nivel de expresión de la dermicidina a nivel de la piel, y particularmente de la piel seca, propicio para reforzar su acción de protección de la piel, para reforzar las propiedades de barrera de la piel, y para reducir los signos de sequedad cutánea.

20 Bibliografía

[0339]

25 Anderson, R. K. and W. L. Kenney (1987). « Effect of age on heat-activated sweat gland density and flow during exercise in dry heat » J. Appl. Physiol. 63(3): 1089-1094.

Baechle, D., T. Flad, et al. (2006). « Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L » J. Biol. Chem. 281(9):5406-5415.

Cunningham, T. J., L. Hodge et al. (1998) « Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin » J. Neurosci 18(18):7047-7060.

30 Flad, T., R. Bogumil et al. (2002) « Detection of dermicidin-derived peptides in sweat by ProteinChip Technology. » J. Immunol. Methods 270(1): 53-62.

Kenney, W. L. and S. R. Fowler (1988) « Methylcholine-activated eccrine sweat gland density and output as a function of age » J. Appl. Physiol. 65(3):1082-1086.

Kyte et al., (1982), J. Mol. Biol., 157: 105.

35 Mehul B. et al., (2000) « Identification and Cloning of a New Calmodulin-like Protein from Human Epidermis » J. Biol. Chem. 275(17):12841-12847

Moreira, D. F, B. E. Strauss et al. (2008) « Genes up- and down-regulated by dermicidin in breast cancer: a microarray analysis » Genet. Mol. Res. 7(3): 925-932.

40 Niyonsaba, F. A. Suzuki et al. (2009) « The human antimicrobial peptide dermicidin activates normal human keratinocytes » Br. J. Dermatol. 160(2): 243-249.

Rieg, S.C., Garbe et al. (2004) « Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat gland and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions » Br. J. Dermatol. 151(3): 534-539.

45 Rieg S., Il Steffen et al. (2005) « Deficiency of dermicidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo » J. Immunol. 174(12):8003-8010.

Sakurada K., T. Akutsu, et al., (2009) « Detection of dermicidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA » Forensic. Sci. Int. 2010 Jan. 30;194(1-3):80-4. Epub 2009 Nov. 13.

Sambrook et al., 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY.

Schittek, B, R. Hipfel et al. (2001) : « Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands » Nat. Immunol. 2(12): 1133-11137.

5 Watchorn, T. M. N. Dowidar et al. (2005) « The cachectic mediator proteolysis inducing factor activates NF-kappaB and STAT3 in human Kupffer cells and monocytes » Int. J. Oncol. 27(4): 1105-1111.

Wiese et al., (2007) « Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research » Proteomics 7(3):340-350

Zieske et al. (2006) « A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies » J. Exp. Bot. 57(7):1051-1058.

10

Listado de secuencias

[0340]

<110> L'OREAL

15 <120> Utilización cosmética de la Dermicidina, análogos o fragmentos de ésta

<130> BR94152/KLP/SLH/cf

<150> FR 10 57690

<151> 2010-09-24

20 <150> FR 10 57699

<151> 2010-09-24

<150> US 61/344826

<151> 2010-10-19

<150> US 61/344827

<151> 2010-10-19

25 <160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 333

<212> ADN

30 <213> Homo Sapiens

ES 2 605 957 T3

<400> 1
 atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat 60
 gatccagagg ccgcctctgc cccaggatcg gggaaaccctt gccatgaagc atcagcagct 120
 caaaaggaaa atgcaggtga agaccaggg ttagccagac aggcaccaa gccaaggaag 180
 cagagatcca gccttctgga aaaaggccta gacggagcaa aaaaagctgt ggggggactc 240
 ggaaaactag gaaaagatgc agtcgaagat ctagaaagcg tgggtaaagg agccgtccat 300
 gacgttaaag acgtccttga ctcagtacta tag 333

<210> 2
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 2
 atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat 60
 gatccagagg ccgcctctgc cccaggatcg gggaaaccata aacaaatgga ttgtttacag 120
 ctacagaagc ccccttcaga gactgccaaa tttctgtcct catccaccaa cctgcctaga 180
 agagagaagc tagtgcctc tgcaaaacct cccacacta gggggctggt ataa 234

<210> 3
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 3
 atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat 60
 gatccagagg ccgcctctgc cccaggatcg gggaaaccctt gccatgaagc atcagcagct 120
 caaaaggaaa atgcaggtga agaccaggg ttagccagac aggcaccaa gccaaggaag 180
 cagagatcca gccttctgga aaaaggccta gacggagcaa aaaaagctgt ggggggactc 240
 ggaaaactag gaaaagatgc agtcgaagat ctagaaagcg tgggtaaagg tggggaagag 300
 aggttggctt ttggggctcc tgtgaatcta acctccatcc ctctgacttc tgtgagccgt 360

ccatga 366

15

<210> 4
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 4
 atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcc 57

20

ES 2 605 957 T3

<210> 5
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 5

tatgatccag aggccgcctc tgccccagga tcggggaacc cttgccatga agcatcagca 60
 gctcaaaagg aaaatgcagg tgaagaccca 90

<210> 6
 <211> 276
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 6

tatgatccag aggccgcctc tgccccagga tcggggaacc cttgccatga agcatcagca 60
 gctcaaaagg aaaatgcagg tgaagaccca gggttagcca gacaggcacc aaagccaagg 120
 aagcagagat ccagccttct ggaaaaaggc ctagacggag caaaaaaagc tgtgggggga 180
 ctcggaaaac taggaaaaga tgcagtcgaa gatctagaaa gcgtgggtaa aggagccgtc 240
 catgacgtta aagacgtcct tgactcagta ctatag 276

<210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

15

<400> 7
 gaaaatgcag gtgaagaccc agggtagcc aga 33

<210> 8
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

20

<400> 8

aaagctgtgg ggggactcgg aaaactagga aaagatgcag tcgaagatct agaaagcgtg 60
 ggtaaaggag ccgtccatga cgttaaa 87

<210> 9
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

25

<400> 9

ES 2 605 957 T3

agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120
 gacgtccttg actcagta 138

5 <210> 10
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 10

agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120
 gacgtccttg actcagtact a 141

10 <210> 11
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 11

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn
 20 25 30

Pro Cys His Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp
 35 40 45

Pro Gly Leu Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser
 50 55 60

Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu
 65 70 75 80

Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys
 85 90 95

Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu
 100 105 110

15 <210> 12
 <211> 77

ES 2 605 957 T3

<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 12

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu
1 5 10 15

Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn
20 25 30

His Lys Gln Met Asp Cys Leu Gln Leu Gln Lys Pro Pro Ser Glu Thr
35 40 45

Ala Lys Phe Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Pro Arg Arg Glu Lys Leu
50 55 60

Val Pro Ser Ala Lys Pro Pro His Thr Arg Gly Leu Val
65 70 75

5 <210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 13

ES 2 605 957 T3

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn
 20 25 30

Pro Cys His Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp
 35 40 45

Pro Gly Leu Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser
 50 55 60

Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu
 65 70 75 80

Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys
 85 90 95

Gly Gly Glu Glu Arg Leu Val Phe Gly Ala Pro Val Asn Leu Thr Ser
 100 105 110
 Ile Pro Leu Thr Ser Val Ser Arg Pro
 115 120

<210> 14
 <211> 19
 5 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 14
 Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Val Cys Ala

10 <210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 15

Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn Pro Cys His
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro
 20 25 30

ES 2 605 957 T3

<210> 16
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 16

Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn Pro Cys His
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro Gly Leu
 20 25 30

Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser Leu Leu Glu
 35 40 45

Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu Gly Lys Leu
 50 55 60

Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys Gly Ala Val
 65 70 75 80

His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu
 85 90

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 17

Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro Gly Leu Ala Arg
 1 5 10

<210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15

<400> 18

Lys Ala Val Gly Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Glu Ser Val Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys
 20 25

<210> 19
 <211> 47

20

ES 2 605 957 T3

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 19

Ser Ser Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val
 20 25 30

Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val
 35 40 45

5 <210> 20
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 20

10

Ser Ser Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val
 20 25 30

Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu
 35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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 o (ii) de dicha secuencia de ácidos nucleicos, como biomarcador de un estado de la piel madura y/o de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.
2. Uso según la reivindicación 1, en la cual dicha secuencia de aminoácidos está representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 20, y preferiblemente elegida de entre SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20.
3. Uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, para cribar agentes activos o tratamientos físicos para el cuidado de la piel madura y/o la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos.
4. Uso (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.
5. Uso cosmético de una cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, como agente activo para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.
6. Uso de una cantidad eficaz (i) de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, para preparar un modelo celular epitelial pluriestratificado, preferiblemente un modelo de piel reconstruida, imitando una piel madura, eventualmente asociada a una sequedad cutánea.
7. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar un estado de la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea que comprende al menos las etapas consistente en:
- a) efectuar, en una muestra aislada de una piel, una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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 o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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, y
 - b) comparar dicha medida efectuada en la etapa a) a una medida de referencia.
8. Procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de agentes activos o de tratamientos físicos para el cuidado de la piel madura y/o la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, susceptibles de modular la actividad, la expresión o la maduración de una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o de una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6, que comprende al menos las etapas consistentes en:
- a) disponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos en condiciones propicias para la actividad, la expresión o la maduración de dichas secuencias,
 - b) poner en contacto dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos con al menos un agente activo por testar, o exponer dicha secuencia de aminoácidos o dicha secuencia de ácidos nucleicos a un tratamiento físico por testar,
 - c) efectuar una medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
 - d) comparar dicha medida a una medida de referencia, y
 - e) observar una diferencia entre dicha medida y la medida de referencia para caracterizar el agente activo o el tratamiento como útil para prevenir y/o tratar la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea.

- 5 9. Procedimiento cosmético para prevenir y/o tratar una piel madura y/o signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea de un individuo que lo necesite, que comprende al menos una etapa que consiste en administrar a dicho individuo al menos una composición que comprende como agente activo (i) al menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 16, o (ii) al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, plató ID NO: 3 y SEC ID N°: 6.
- 10 10. Procedimiento cosmético, *in vitro* o *ex vivo*, para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético de la piel madura y/o los signos cutáneos del envejecimiento, asociado/a(s) o no a una sequedad cutánea, en un individuo que lo necesite, que comprende al menos las etapas consistentes en:
- 15 a) efectuar, antes de la aplicación del tratamiento cosmético, en una primera muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una primera medida cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de por lo menos una secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre 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, o de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 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,
- 20 b) efectuar, después de la aplicación del tratamiento cosmético, en una segunda muestra de piel aislada tomada de dicho individuo, al menos una segunda medida, cualitativa o cuantitativa de la expresión, de la maduración o de la actividad de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha secuencia de ácidos nucleicos, y
- c) comparar la primera y segunda medidas, particularmente con el fin de deducir una información relativa a un efecto al menos de la aplicación del tratamiento cosmético.
- 25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el cual la secuencia de aminoácidos está representada entre una secuencia elegida de entre SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18.
- 30 12. Péptido aislado representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 18.
13. Composición cosmética que comprende un péptido como se define en la reivindicación 12 o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un tal péptido.

Listado de Secuencias

SEC ID N°:1 (P81605)

atgaggttca	tgactctcct	cttctctgaca	gctctggcag	gagccctggt	ctgtgcctat	60
gatccagagg	ccgcctctgc	cccaggatcg	gggaaccctt	gccatgaagc	atcagcagct	120
caaaaggaaa	atgcaggtga	agaccaggg	ttagccagac	aggcaccaaa	gccaaggaag	180
cagagatcca	gccttctgga	aaaaggccta	gacggagcaa	aaaaagctgt	ggggggactc	240
ggaaaactag	gaaaagatgc	agtcgaagat	ctagaaagcg	tgggtaaagg	agccgtccat	300
gacgttaaag	acgtccttga	ctcagtacta	tag			333

SEC ID N°:2 (A5JHP2)

atgaggttca	tgactctcct	cttctctgaca	gctctggcag	gagccctggt	ctgtgcctat	60
gatccagagg	ccgcctctgc	cccaggatcg	gggaaccata	aacaaatgga	ttgtttacag	120
ctacagaagc	ccccttcaga	gactgcaaaa	tttctgtcct	catccaccaa	cctgcctaga	180
agagagaagc	tagtgcctc	tgcaaaaact	ccccacacta	gggggctggt	ataa	234

SEC ID N°:3 (A5JHP3)

atgaggttca	tgactctcct	cttctctgaca	gctctggcag	gagccctggt	ctgtgcctat	60
gatccagagg	ccgcctctgc	cccaggatcg	gggaaccctt	gccatgaagc	atcagcagct	120
caaaaggaaa	atgcaggtga	agaccaggg	ttagccagac	aggcaccaaa	gccaaggaag	180
cagagatcca	gccttctgga	aaaaggccta	gacggagcaa	aaaaagctgt	ggggggactc	240
ggaaaactag	gaaaagatgc	agtcgaagat	ctagaaagcg	tgggtaaagg	tggggaagag	300
aggttggtct	ttggggctcc	tgtgaatcta	acctccatcc	ctctgacttc	tgtgagccgt	360
ccatga						366

SEC ID N°:4 (péptido señal P81605)

atgaggttca	tgactctcct	cttctctgaca	gctctggcag	gagccctggt	ctgtgcc	57
------------	------------	-------------	------------	------------	---------	----

SEC ID N°:5 (péptido de supervivencia P81605)

tatgatccag	aggccgcctc	tgccccagga	tgggggaacc	cttgccatga	agcatcagca	60
gctcaaaagg	aaaatgcagg	tgaagacca				90

SEC ID N°:6 (Dermicidina)

tatgatccag	aggccgcctc	tgccccagga	tgggggaacc	cttgccatga	agcatcagca	60
gctcaaaagg	aaaatgcagg	tgaagacca	gggttagcca	gacaggcacc	aaagccaagg	120
aagcagagat	ccagccttct	ggaaaaaggc	ctagacggag	caaaaaaagc	tgtgggggga	180
ctcggaaaac	taggaaaaga	tgcagtcgaa	gatctagaaa	gcgtgggtaa	aggagccgtc	240
catgacgtta	aagacgtcct	tgactcagta	ctatag			276

SEC ID N°:7 (péptido 1)

gaaaatgcag gtgaagaccc agggttagcc aga 33

SEC ID N°:8 (péptido 2)

aaagctgtgg ggggactcgg aaaactagga aaagatgcag tcgaagatct agaaagcgtg 60
 ggtaaaggag ccgtccatga cgtaaaa 87

SEC ID N°:9

agccttcttg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120
 gacgtccttg actcagta 138

SEC ID N°:10

agccttcttg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120
 gacgtccttg actcagtact a 141

SEC ID N°:11 (P81605)

10 20 30 40 50 60
 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK
 70 80 90 100 110
 QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGAHV DVKDVLDLVL

SEC ID N°:12 (A5JHP2)

10 20 30 40 50 60
 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNHKQMDCLQ LQKPPSETAK FLSSSTNLPR
 70
 REKLVPSAKP PHTRGLV

SEC ID N°:13 (A5JHP3)

10 20 30 40 50 60
MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHEASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK
70 80 90 100 110 120
QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLGKDAVED LESVGKGEE RLVFGAPVNL TSIPLTSVSR P

SEC ID N°:14 (señal)

10
MRFMTLLFLT ALAGALVCA

SEC ID N°:15 (péptido de supervivencia)

10 20 30
YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP

SEC ID N°:16 (Dermicidina)

10 20 30 40 50 60
YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP GLARQAPKPR KQRSSLLEKG LDGAKKAVGG
70 80 90
LGKLGKDAVE DLESVGKGAV HDVKDVLDSV L

SEC ID N°:17 (péptido 1)

10
ENAGEDPGLA R

SEC ID N°:18 (péptido 2)

10 20
KAVGGLGKLG KDAVEDLESV GKGAHVHDVK

SEC ID N°:19 (Dermicidina) DCD-1

10 20 30 40
SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV

SEC ID N°:20 (Dermicidina) DCD-1L

10 20 30 40
SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL

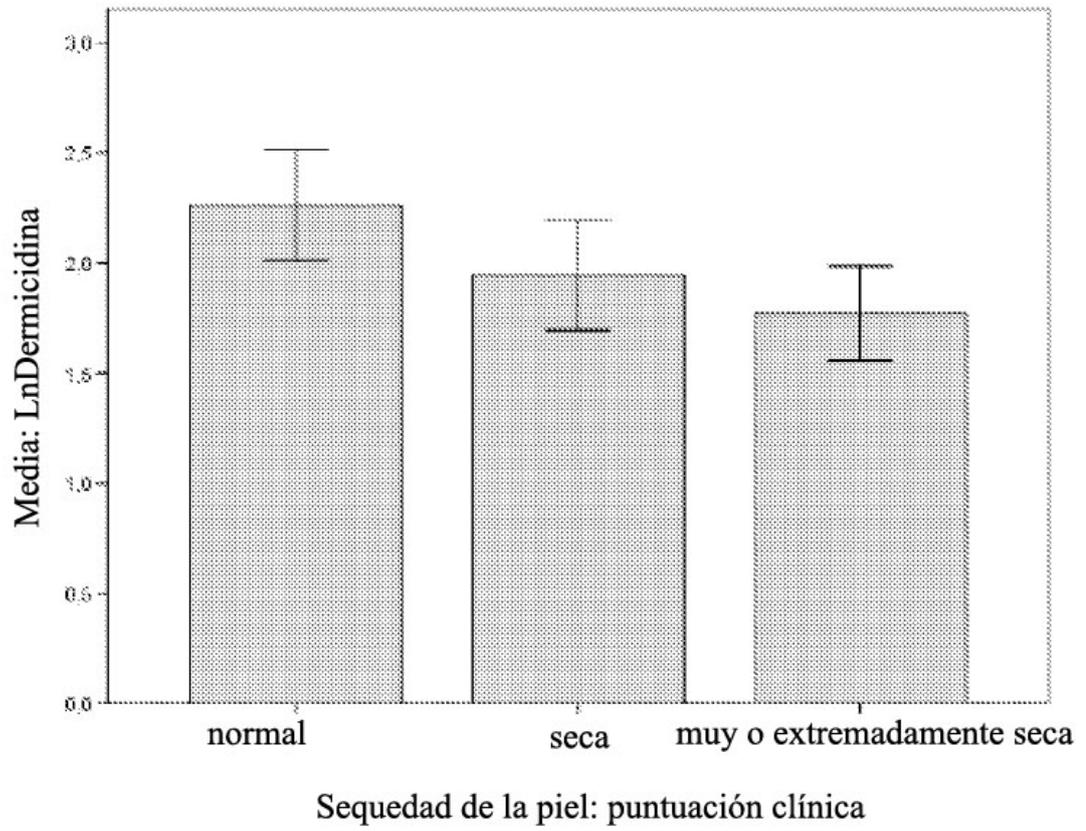


FIGURA 1