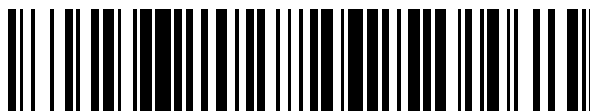


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 134**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2008** **PCT/IB2008/052440**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008** **WO09001260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008** **E 08763397 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2165198**

54 Título: **Uso cosmético de proteínas de tipo apolipoproteína D**

30 Prioridad:

22.06.2007 FR 0755976
27.07.2007 US 952262 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BERNARD, DOMINIQUE;
CASTIEL, ISABELLE y
SIMONETTI, LUCIE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 611 134 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso cosmético de proteínas de tipo apolipoproteína D

5 [0001] El sujeto de la presente invención es un método para caracterizar in vitro el envejecimiento de un epitelio que comprende al menos los pasos que consisten en: a) determinar en una muestra de dicho epitelio el contenido de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 1, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, y b) comparar
10 dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia.

[0002] La invención también se refiere a un método relativo para cribar los agentes activos antienvjecimiento y a un método para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético dirigido a la mejora de las señales de envejecimiento de la piel.

15 [0003] Los epitelios son tejidos cuyas células son contiguas e íntegramente conectadas entre sí y reposan en una membrana basal.
Estos forman un revestimiento externo, por ejemplo, en la superficie de la piel, es decir la epidermis, o un revestimiento interno, en la superficie de una membrana mucosa.
20 Estos también pueden formar glándulas.

[0004] Más precisamente, estos epitelios son estructuras cuya homeostasis resulta del uso de un conjunto finamente regulado de señales intracelulares y extracelulares que actúan en todas las etapas de la proliferación, migración o diferenciación celular, y de la síntesis de los distintos componentes de la matriz extracelular.
25 Estas señales pueden resultar en particular de la acción de los factores producidos por queratinocitos.

[0005] Mantener las funciones fisiológicas buenas de un epitelio implica en particular la diferenciación epitelial terminal y/o la síntesis de proteoglicanos.

30 [0006] En lo que se refiere más particularmente a la epidermis, es un epitelio que se divide de forma convencional en una capa basal de queratinocitos que contienen, en particular, células madre de la piel y que constituyen la capa germinativa de la epidermis, una capa celular denominada espinosa consistente en diferentes capas celulares poliédricas dispuestas en la capa basal, una capa denominada granulosa que comprende una a tres capas denominadas de células aplanadas que contiene inclusiones citoplásmicas diferentes, los gránulos de queratohialina, y finalmente un conjunto de capas superiores, denominada capa córnea (o estrato córneo) constituida de queratinocitos en la fase final de su diferenciación, denominados corneocitos.

[0007] El estrato córneo, la parte más exterior de la piel que proporciona la función de barrera entre el cuerpo y el ambiente, y el eje capilar, la parte emergente del folículo capilar que constituye el cabello, ambos representan el resultado del proceso de diferenciación de los queratinocitos.
40 La diferenciación epidérmica sigue un proceso de maduración donde los queratinocitos de la capa basal se diferencian y migran, dando como resultado la formación de los corneocitos, células muertas completamente queratinizadas.
Esta diferenciación es el resultado de fenómenos perfectamente coordinados que llevará a que se mantenga un grosor constante y que así provoque la homeostasis de la epidermis.
45

[0008] Numerosos trastornos y patologías de la piel pueden resultar de una disfunción en la homeostasis de la epidermis, y en particular una disfunción en la diferenciación epitelial terminal de los queratinocitos y/o en la síntesis de proteoglicanos.

50 [0009] Por consiguiente, las modificaciones principales sobre la epidermis son una reducción en la diferenciación de los queratinocitos que causan una deficiencia en la matriz proteica de la célula córnea, un aumento en metaloproteasas, proteasas que degradan la matriz extracelular y que participan en el envejecimiento de la piel, y en una reducción en la síntesis de varios glicosaminoglicanos.

55 [0010] Por ejemplo, en el caso de piel envejecida, esta disfunción se manifiesta generalmente por la aparición de arrugas (microrrelieve y arrugas profundas), una pérdida de elasticidad, por una sensación áspera y por sequedad.
Desde el punto de vista histológico, el aplanamiento de la unión dermoepidérmica y una reducción en el grosor de la dermis y de la epidermis son observadas.
60 El contenido de colágeno y de glicosaminoglicanos se reduce.
La función de barrera de la piel es perjudicada.
Todos estos fenómenos se exacerban por exposición solar crónica.

[0011] Asimismo, durante la menopausia, la piel sufre cambios en todos sus compartimentos, es decir
65 compartimentos epidérmicos y dérmicos.
El principal cambio relacionado con la dermis es una reducción en la cantidad de colágeno y en el grosor dérmico.

Esto causa, en mujeres menopáusicas, una reducción en el grosor de la piel y/o de las membranas mucosas. Las mujeres luego sienten una sensación de "piel seca" o de piel tirante y se observa una acentuación de las arrugas finas superficiales y líneas finas.

La piel muestra una aparición áspera al tacto.

5 Finalmente, la piel muestra una suavidad reducida.

[0012] Es ya conocido que durante las distintas etapas de diferenciación de los queratinocitos, diferentes familias de proteínas entran en juego que cada una tiene una función específica.

10 Entre éstas, las proteasas juegan un papel vital en la descamación, es decir en la eliminación de los corneocitos en la superficie de la epidermis, y las transglutaminasas participan en la reticulación de las proteínas que formarán el revestimiento córneo de la piel.

[0013] La presente invención resulta particularmente de la caracterización por los inventores, de la expresión de la apolipoproteína D, llamada también ApoD, en la capa córnea de la epidermis humana.

15 [0014] La ApoD es una glicoproteína de 29 KDa presente, en seres humanos, en el suero asociado a los HDL, y cuya función no está aún clara.

20 Su estructura tridimensional y su miembro de la familia de lipocalina sugiere que la ApoD sería un transportador de pequeñas moléculas hidrofóbicas y se enlazaría en particular a la bilirrubina, colesterol, progesterona, pregnenolona y ácido araquidónico.

[0015] Grandes aumentos de esta proteína se observan en diferentes enfermedades en seres humanos.

25 Así, la ApoD es altamente acumulada en el fluido cístico de la glándula mamaria de mujeres afectadas por la enfermedad: "Enfermedad de los fluidos macroquísticos", una forma de cáncer benigno de la glándula mamaria.

[0016] Además, la ApoD se sobreexpresa durante la regeneración de los nervios.

30 De hecho, después de una lesión del nervio periférico, grandes aumentos en el ARN mensajero y en la proteína son observados, lo que sugiere que la ApoD puede jugar un papel importante en el mantenimiento del sistema nervioso periférico.

[0017] En WO2005/079821, una composición cicatrizante para una lesión es proporcionada comprendiendo fibroblastos cultivados dentro de una matriz de fibrina, donde los fibroblastos tienen un fenotipo de cicatrización de una herida y tienen en particular un nivel más alto de expresión de ApoD que los fibroblastos cultivados en una matriz de colágeno y los fibroblastos cultivados en el medio sin una matriz.

35 [0018] Finalmente, y más recientemente, se ha descubierto que la ApoD se acumula en el líquido cefalorraquídeo y en el hipocampo de los sujetos que sufren la enfermedad de Alzheimer.

Un análisis más exhaustivo ha demostrado grandes aumentos en varias otras enfermedades neurodegenerativas humanas tales como la meningoencefalitis, accidente cardiovascular, enfermedad de motoneurona y demencia.

40 Esto sugiere que la ApoD puede también jugar un papel importante en el mantenimiento del sistema nervioso central.

[0019] Por otro lado, según el conocimiento de los inventores, la apolipoproteína D hasta ahora no había sido identificada como una proteína del estrato córneo humano.

45 [0020] De hecho, a diferencia de todas las expectativas, la apolipoproteína D también ha resultado ser un marcador potencial del estado fisiológico de la piel, en particular en cuanto al envejecimiento.

50 Así, como es evidente de las pruebas presentadas a continuación, los inventores han observado, de forma imprevista, de una parte, la expresión de esta glicoproteína en el estrato córneo, y, por otro lado, una reducción significativa en su expresión durante el envejecimiento de la epidermis.

[0021] Consecuentemente, según uno de sus primeros aspectos, el sujeto de la presente invención es un método para caracterizar in vitro el envejecimiento de un epitelio que comprende al menos los pasos que consisten en:

55 a) determinar en una muestra de dicho epitelio el contenido de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 1, en particular representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 2, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, y
b) 10 comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia.

60 [0022] En el presente texto, por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad mínima necesaria para observar el efecto previsto, es decir un efecto cosmético o un efecto terapéutico, entendiéndose que las cantidades eficaces necesarias para obtener un efecto cosmético o un efecto terapéutico pueden ser, cuando proceda, idénticas o diferentes.

65 [0023] En el presente texto, por "uso cosmético" se entiende un uso destinado principalmente a proporcionar un efecto estético y/o comodidad.

[0024] En el presente texto, por "composición terapéutica" se entiende una composición destinada a proporcionar un efecto curativo o profiláctico con respecto a los trastornos epiteliales, y en particular, epidérmicos reconocidos como siendo una manifestación de un estado patológico.

[0025] Por "profiláctico" o "preventivo", en el presente texto, se entiende la reducción en el riesgo de aparición de un fenómeno, por ejemplo, una patología.

[0026] Por señales cutáneas de expresión del envejecimiento se entiende cualquier cambio en la aparición externa de la piel debido al envejecimiento, si es cronobiológico y/o fotoinducido, tal como por ejemplo arrugas y líneas finas, piel envejecida, falta de elasticidad y/o de tono de la piel, reducción en el grosor de la dermis y/o degradación de las fibras de colágeno, que causa la aparición de piel flácida y arrugada.

También se entiende cualquier cambio interno en la piel que no resulta sistemáticamente en una apariencia externa cambiada, tal como por ejemplo cualquier degradación interna de la piel, particularmente de las fibras de elastina, o de las fibras elásticas, después de una exposición a radiación ultravioleta.

[0027] En particular, la presente invención se refiere a un método de selección de los agentes activos antienviejecimiento que comprenden al menos los pasos que consisten en:

- a) llevar al menos un tipo de célula capaz de expresar un polipéptido teniendo una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 1, en particular representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 2, en contacto con al menos una sustancia química o compuesto biológico, que debe evaluarse bajo condiciones favorables para una manifestación de la expresión de dicho polipéptido, y
- b) determinar el contenido de dicho polipéptido.

[0028] Según una forma de realización variante, los datos o valor obtenidos se pueden evaluar en comparación con un dato o valor de referencia, obtenido por ejemplo de al menos un epitelio, en particular una epidermis, diferente de aquella que es el sujeto de la caracterización, y cuyo estado es conocido.

[0029] El objetivo de la presente invención es también, según otro de sus aspectos, un método para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético dirigido a mejorar las señales de envejecimiento de la piel, tales como arrugas o líneas finas que comprenden al menos la caracterización cuantitativa de la expresión de un polipéptido en el presente texto, es decir de la apolipoproteína D.

[0030] Según una forma de realización variante, los datos obtenidos al final de la caracterización también se pueden examinar en comparación con un valor o datos de referencia.

Este valor o datos de referencia pueden ser datos obtenidos del epitelio, en particular la epidermis, para ser sometidos al tratamiento, antes de la administración de dicho tratamiento o dentro de un tiempo cronológico más corto en relación a la fecha de inicio del tratamiento.

[0031] Como es evidente de la descripción que sigue, los métodos según la invención son particularmente ventajosos dado que su uso no requiere una operación invasiva.

[0032] Los métodos de la invención se pueden realizar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

[0033] De hecho, la ubicación, por los inventores del nuevo biomarcador del envejecimiento, la apolipoproteína D, en el estrato córneo hace la caracterización cuantitativa o cualitativa de la expresión de esta glicoproteína posible por la mera recogida de muestras tópicas.

El método de recogida de muestras puede ser por ejemplo una técnica tipo tiras adhesivas que consiste en aplicar al epitelio considerado, tal como una epidermis, una porción de cinta adhesiva.

Al eliminar esta cinta adhesiva, una fracción del epitelio, por ejemplo, una fracción epidérmica, es eliminada.

Esto es luego, después de la extracción, analizado por métodos convencionales tal como ensayo inmunoenzimático o más particularmente un análisis de Western blot.

DEFINICIÓN DE POLIPÉPTIDO

[0034] Según una forma de realización, un polipéptido de este texto puede tener una secuencia de aminoácidos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 2.

[0035] Para los fines de la presente invención, por ApoD se entiende, en general, a menos que se indique de otro modo, la secuencia (SEQ ID NO 2) de la proteína teniendo o no glicosilaciones en los residuos de asparagina n° 45 y 178, conduciendo a variantes de peso molecular de 19 a 32 kDa y de pI 5,6 a 7,8.

[0036] Según una forma de realización, un polipéptido de este texto también puede ser un polipéptido natural o sintético, cuando proceda, capaz de ser obtenido por lisis enzimática o química de la apolipoproteína D o por síntesis química o biológica o por extracción de un tejido biológico, tal como por ejemplo la piel, expresando este

polipéptido de forma natural o después de la transfección, y las distintas formas postraduccionales de las mismas, o además cualquier polipéptido natural o sintético cuya secuencia comprende totalmente o parcialmente (como un todo o en parte) una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, por ejemplo las variantes y los análogos.

5 [0037] Personas expertas en la técnica pueden obtener un polipéptido del presente texto mediante métodos a base de ADN recombinante, tal como por ejemplo aquellos descritos en "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2ª edición), Sambrook et al., 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY, (Sambrook).

10 [0038] Según otra forma de realización, un polipéptido de este texto también puede ser un polipéptido tal como se ha definido anteriormente donde al menos un residuo ha sido sustituido por un residuo de aminoácido con un valor hidropático similar, tal como se ha definido anteriormente.

15 [0039] Según otra forma de realización, un polipéptido de este texto también puede ser un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, fusionado con otro polipéptido, un agente objetivo hidrofílico o hidrofóbico, un precursor de bioconversión, un marcador luminiscente, radiactivo o colorimétrico.

20 [0040] Sin ser limitativo, se pueden mencionar, como ejemplo de compuestos que se pueden acoplar con un polipéptido del presente texto, proteínas fluorescentes tales como la "Proteína verde fluorescente", compuestos químicos fluorescentes tales como rodamina, fluoresceína, Red Texas®, compuestos fosforescentes, elementos radiactivos, tales como ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I o ^{125}I , o marcadores colorimétricos tales como sustratos cromogénicos que son sensibles a la acción de la galactosidasa, la peroxidasa, la cloranfenicol acetiltransferasa, la luciferasa o la fosfatasa alcalina.

25 [0041] Dependiendo de la naturaleza de los compuestos capaces de ser acoplados con un polipéptido del presente texto, el acoplamiento se puede realizar por métodos químicos, en particular mediante grupos funcionales químicos reactivos o por métodos de biología molecular conocidos por un experto en la técnica.

DEFINICIÓN DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

30 [0042] El presente texto también menciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido del presente texto y su uso en los distintos usos mencionados en el texto y métodos conforme a la invención.

35 [0043] Por consiguiente, el presente texto también describe el uso de secuencias ácidos nucleicos, en particular ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico, que codifican un polipéptido del presente texto, en particular las secuencias correspondientes a al menos una secuencia de ácidos nucleicos representada por SEQ ID NO: 1 para la preparación de una composición descrita en el presente texto.

40 [0044] Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser de cualquier origen posible, es decir de origen animal, en particular mamífero y más preferiblemente todavía de origen humano, o de origen vegetal, o de origen microbiano (virus, fagos, bacterias y similares) o de origen fúngico, sin perjuicio de si ellos están presentes o no están presentes de forma natural en dicho organismo de origen.

45 [0045] En este caso, el texto también describe el uso de fragmentos de ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican los polipéptidos mencionados en el presente texto.

[0046] Una secuencia de ácidos nucleicos mencionada en el presente texto puede comprender una secuencia sentido, antisentido o de interferencia que corresponde con una secuencia que codifica un polipéptido del presente texto.

50 [0047] Por consiguiente, el presente texto también describe el uso de secuencias de ácidos nucleicos, en particular ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico, que codifican un polipéptido del presente texto.

55 [0048] Las secuencias de ácidos nucleicos del presente texto se pueden utilizar en particular para preparar secuencias de ácidos nucleicos sentido o antisentido correspondientes.

[0049] El texto también describe el uso de cualquier polinucleótido, teniendo una secuencia de ácido desoxirribonucleico o ribonucleico, que comprende una secuencia sentido o antisentido, en particular "pequeño ARN interferente", que corresponde a al menos la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 1.

AGENTE DE MODULACIÓN

[0050] El texto describe el uso de un agente modulador de la expresión, la actividad y/o la liberación de un polipéptido del presente texto.

65 [0051] En particular, el texto describe el uso de un agente de modulación que activa la actividad de un polipéptido del presente texto.

[0052] En el presente texto, por "modular" se entiende, en relación con un efecto dado, la acción de estimular o inhibir este efecto.

[0053] En el presente texto, por "agente modulador o compuesto químico o biológico capaz de modular la actividad y/o la expresión biológica" se entiende cualquier compuesto capaz de actuar, directa o indirectamente, en al menos un polipéptido del texto, o una secuencia de ácidos nucleicos que la codifica, o sobre un componente de una vía de señalización intra o extracelular, o una vía metabólica, que comprende dicho polipéptido, o sobre un componente comprendido en la regulación de la transcripción y/o la traducción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido.

[0054] Por " actividad biológica " se entiende en particular en relación con la apolipoproteína D la actividad biológica de la proteína con la secuencia representada por SEQ ID NO 2, de la forma madura de la proteína y la proteína teniendo o no glicosilaciones en los residuos de asparagina N° 45 y 178 conduciendo a variaciones en el peso molecular de 19 a 32 kDa y en pI de 5,6 a 7,8.

[0055] Este agente modulador puede ser un agente activador de la expresión génica o expresión proteica o bien un agente que inhibe la expresión génica o la expresión proteica de un polipéptido del texto.

[0056] A modo de ilustración, y sin limitación, de agentes que activan la expresión génica, se pueden mencionar en particular andrógenos (dihidrotestosterona (DHT)), dexametasona (DEX), ácido transretinoico, 1,25-dihidroxivitamina D3, clozapina, alfa-interleucina 1 y glucocorticoides.

[0057] A modo de ilustración, y sin limitación, de los agentes que inhiben la expresión génica, se puede mencionar en particular baicaleína, estrógenos (estradiol) y tamoxifeno.

[0058] De forma más particular, el agente de modulación puede ser un activador de expresión génica de los polipéptidos del texto.

[0059] El presente texto describe adicionalmente un método de cribado de los compuestos biológicos o químicos o factores fisicoquímicos capaces de modular una actividad biológica de un polipéptido del texto que comprende al menos los pasos que consisten en:

- a) llevar al menos un polipéptido del texto en contacto con al menos un compuesto biológico o químico que debe evaluarse y/o someter dicho polipéptido a dicho factor fisicoquímico, favorable bajo condiciones para la manifestación de dicha actividad biológica de dicho polipéptido, y
- b) determinar dicha actividad biológica de dicho polipéptido.

[0060] En tal método, la actividad biológica del polipéptido, en particular su actividad de diferenciación epitelial, y en particular la diferenciación epidérmica terminal, en particular en relación con los queratinocitos, puede por ejemplo ser determinada por cualquier método conocido por un experto en la técnica.

[0061] Por ejemplo, y sin ser limitativos, se pueden mencionar métodos de cultivo celular seguidos de caracterización de marcadores de diferenciación, tal como por ejemplo queratina 10, filagrina o marcadores de proliferación tales como por ejemplo KI 67 y PCNA.

[0062] Según una forma de realización, la actividad biológica del polipéptido se puede comparar a un valor de referencia.

[0063] Un valor de referencia puede ser obtenido por la medición de la actividad biológica del polipéptido en ausencia de cualquier compuesto químico o biológico o factor fisicoquímico que debe evaluarse.

[0064] Asumiendo que esta medición de un valor de referencia se realiza antes del uso del compuesto químico o biológico o factor fisicoquímico que debe evaluarse, el método puede adicionalmente permitir, cuando proceda, valorar la eficacia potencial de dicho compuesto.

[0065] Es posible que esta actividad biológica no sea afectada por la presencia de dicho compuesto o por otro lado sea inhibida o estimulada.

[0066] Asumiendo que un efecto estimulante es observado, el compuesto evaluado es capaz de ser usado por ejemplo como un agente activo antienviejecimiento.

[0067] Un método del presente texto se puede realizar en una muestra celular aislada obtenida bien a partir de una biopsia de la piel o de células cultivadas.

[0068] Ventajosamente, una muestra de queratinocitos se puede mencionar como muestra celular adecuada para la invención.

[0069] Ventajosamente, un polipéptido usado en el método según la presente invención es apolipoproteína D.

[0070] El presente texto también describe un método de los compuestos biológicos o químicos de selección capaces de modular la expresión de un polipéptido del presente texto, que comprende al menos los pasos que consisten en:

- a) llevar al menos un tipo celular capaz de expresar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido del presente texto en contacto con al menos una sustancia química o compuesto biológico, que debe evaluarse bajo condiciones favorables para la manifestación de la expresión de dicha secuencia, y
- b) determinar la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos.

[0071] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos puede ser determinada, por ejemplo, mediante sondas oligonucleótidas, o por cualquier protocolo conocido por un experto en la técnica.

[0072] A modo de ejemplo de métodos de la detección de una secuencia de ácidos nucleicos, se puede hacer mención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR o Q-PCR), el método de Northern blot, método de ensayo de protección de ribonucleasa, métodos con chips de ADN, métodos con chips transcriptómicos, métodos con chips oligonucleótidos, métodos de hibridación in situ.

[0073] A modo de ejemplo de agentes adecuados para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos, y en particular de una secuencia de ARNm, se puede mencionar una sonda de ácidos nucleicos marcada que puede hibridarse con dicha secuencia.

[0074] Tal sonda de ácidos nucleicos puede ser obtenida fácilmente por cualquier método conocido por un experto en la técnica.

[0075] Por consiguiente, las secuencias de ácidos nucleicos del texto se pueden utilizar para producir cebadores oligonucleótidos sentido y/o antisentido, que se hibridan, bajo condiciones de astringencia alta, con la secuencia SEQ ID NO: 1.

[0076] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos del texto se puede comparar a un valor de referencia obtenido, por ejemplo, realizando un método del presente texto en ausencia de un compuesto de prueba.

[0077] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos puede también ser determinada, indirectamente, por la determinación de la expresión del polipéptido codificado por dicha secuencia, mediante cualquier técnica conocida en el campo, tal como método de Western blot, ELISA, el método de Bradford o de Lowry, o como se indica a continuación.

[0078] El presente texto también describe un método para seleccionar los compuestos biológicos o químicos, o incluso agentes activos antienviejamiento, capaces de modular la expresión de un polipéptido del presente texto, que comprende al menos los pasos que consisten en:

- a) llevar al menos un tipo celular capaz de expresar un polipéptido del presente texto en contacto con al menos una sustancia química o compuesto biológico, que debe evaluarse bajo condiciones favorables para la manifestación de la expresión de dicho polipéptido,
- b) determinar el contenido de polipéptido, y
- c) comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicho polipéptido determinado en ausencia de un compuesto químico o biológico que debe evaluarse.

[0079] La comparación realizada en la etapa c) puede hacer posible para deducir información con respecto a la propiedad de dicho compuesto de prueba para modular la expresión de un polipéptido del texto.

[0080] Un método de la invención se puede realizar en una muestra celular aislada.

[0081] La determinación de un contenido de polipéptido del presente texto se puede realizar mediante cualquier método conocido por personas expertas en la técnica.

[0082] Como métodos para la detección de un polipéptido, se puede mencionar el método de Western blot, método de slot blot, método de dot blot, métodos ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) del tipo singleplex o multiplex, métodos proteómicos o glicómicos, métodos de coloración de polipéptidos en un gel de poliacrilamida con tinción de plata, con azul de Coomassie o con SYPRO, métodos de inmunofluorescencia, métodos de absorción de UV, métodos inmunohistoquímicos convencionales de microscopía electrónica o confocal, métodos de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), métodos de TR-FRET (FRET resueltos en el tiempo), métodos de FLIM (microscopía de tiempo de vida de imágenes fluorescentes), métodos de FSPIM (microscopía espectral de imágenes fluorescentes), métodos de FRAP (recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueamiento), métodos de gen reportero, métodos de AFM (microscopía de fuerza atómica), métodos de resonancia de plasmón superficial, métodos de microcalorimetría, métodos de citometría de flujo, métodos

biosensores, métodos de radioinmunoensayo (radioinmunoanálisis), métodos de isoelectroenfoque, pruebas enzimáticas, métodos con chips peptídicos, chips de azúcar, chips de anticuerpos, métodos de espectrometría de masas, métodos de espectrometría tipo SELDI-TOF (CIPHERGEN).

5 [0083] Los métodos del presente texto se puede realizar en una muestra, por ejemplo, aislada del epitelio, en particular la epidermis, obtenida de una biopsia de piel o un modelo celular epitelial, por ejemplo, modelo epidérmico o más ventajosamente a partir de una eliminación superficial no invasiva, en particular con una cinta adhesiva ("cinta autoadhesiva"), de estrato córneo o por lavado simple.

10 [0084] Una muestra de epidermis se puede recoger por cualquier método conocido por personas expertas en la técnica.

[0085] Estos métodos se pueden realizar por las denominadas técnicas de tiras adhesivas.

15 [0086] Estas tiras adhesivas son superficies pegajosas aplicadas a la superficie de la epidermis tal como Blenderm® de 3M, D'squam (adhesivo comercial de CuDERM), pegamento de cianoacrilato o el método de tiras adhesivas de barniz.

Utilizando estas tiras adhesivas, los corneocitos adherentes y el contenido de sus espacios intercelulares se pueden recoger y posteriormente someter a una extracción que hace posible acceder al contenido de la proteína.

20 [0087] La recogida de una muestra adecuada para el método también se puede realizar más directamente por "lavado" de la superficie de la piel mediante, por ejemplo, accesorios del tipo de turbina de paletas, del tipo de celdas espirales (como se describe en la patente FR 2 667 778) combinado con un circuito de fluidos, o sencillamente por adición/eliminación de una gota de tampón en la superficie de la piel.

25 [0088] Como una guía para otros métodos de recogida de muestras apropiados para la realización de la invención, puede haber métodos mencionados basados en el raspado de la parte superior del estrato córneo mediante un sistema de cuchilla doble.

30 Esta técnica hace posible recoger escamas que pueden luego ser directamente analizadas por varias técnicas para determinar los niveles de minerales, aminoácidos o lípidos.

[0089] Se entiende que todas las composiciones cosméticas o terapéuticas consideradas en el presente texto usan un medio fisiológicamente aceptable.

35 [0090] En el presente texto, se entiende por "medio fisiológicamente aceptable" un medio adecuado para la aplicación de una composición a un epitelio o un material queratínico, como la piel, el cuero cabelludo, los labios, las membranas mucosas y fibras de queratina tal como el cabello, las uñas y el vello corporal, o cuando proceda por la vía oral o parenteral.

40 [0091] En el presente texto, por "terapéutico" se entiende una composición que se puede usar en el contexto de un tratamiento profiláctico y/o curativo, o de un método para evaluar el estado de un epitelio, y en particular de la epidermis.

45 [0092] Una composición terapéutica o cosmética descrita en el presente texto puede adicionalmente comprender al menos un agente activo cosmético y/o terapéutico.

[0093] Como ejemplos de agentes activos que se pueden usar en el contexto del texto, se pueden mencionar aceites cosméticos, tales como aceites de silicona o aceites vegetales del tipo triglicérido, aceites de hidrocarburo tales como aceite de parleam y ésteres de ácidos grasos y de alcoholes grasos.

50 [0094] También puede ser posible usar otros agentes activos que hacen posible mejorar la condición de la piel, tales como agentes activos hidratantes o humectantes o agentes activos que permiten mejorar la barrera de lípidos naturales, tales como ceramidas, sulfatos de colesterol y/o ácidos grasos y sus mezclas derivadas.

55 [0095] También puede ser posible usar enzimas teniendo actividad en la piel, tales como proteasas, lipasas, glucosidasas, amidasas, cerebrosidasas y/o melanasas y sus mezclas derivadas.

60 [0096] Como otros ejemplos de agentes activos adecuados para la realización de la presente invención, se pueden mencionar: agentes activos analgésicos, agentes activos anti-levadura, agentes activos antibacterianos, agentes activos antiparasitarios, agentes activos antifúngicos, agentes activos antivíricos, agentes activos anti-inflamatorios esteroidales, agentes activos anestésicos, agentes activos antipruríticos, agentes activos queratolíticos, agentes activos anti radicales libres, agentes activos antiseborreicos, agentes activos anticaspa, agentes activos anti-acné, agentes activos destinados a prevenir el envejecimiento de la piel y/o a mejorar su condición, agentes activos antidermatitis, agentes activos antiirritantes, agentes activos inmunomoduladores, agentes activos para el tratamiento de la piel seca, agentes activos antitranspirantes, agentes activos antipsoriáticos, agentes activos para la protección contra los UV, agentes activos antihistamínicos, agentes activos de curación de heridas, agentes activos

autobronceado, antioxidantes tales como té verde o fracciones activas del mismo, glicerina, laponita, cafeína, aceites esenciales aromáticos, colorantes, agentes activos despigmentantes, liporreguladores, emolientes, refrescantes, desodorizantes, antisensibilizantes, blanqueantes y agentes activos nutritivos, agentes reductores de la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación de la piel, y sus mezclas derivadas.

5 [0097] En general, cualquier composición del texto se puede aplicar a la piel (en cualquier región de la piel del cuerpo) o en las membranas mucosas (membranas mucosas bucales, jugales, gingivales genitales y conjuntivales, y similares).

10 [0098] De una manera conocida, una composición cosmética también puede contener adyuvantes habitualmente usados en el campo cosmético, tales como agentes gelificantes hidrofílicos o lipofílicos, aditivos hidrofílicos o lipofílicos, conservantes, antioxidantes, solventes, perfumes, productos de relleno, agentes de cribado, absorbentes de olores y materias colorantes.

15 [0099] Las cantidades de los varios constituyentes de las composiciones del texto son aquellas usadas de forma convencional en los campos considerados.

[0100] La cantidad de compuesto químico o biológico o de polipéptido, secuencia de ácidos nucleicos o agente de modulación del texto contenido en una composición del texto, denominada también "cantidad eficaz", por supuesto depende de la naturaleza del compuesto y del efecto deseado y puede por lo tanto variar mucho.

20 [0101] Para dar un orden de magnitud, una composición puede contener un agente de modulación del texto o un polipéptido en una cantidad que representa del 0,00001% al 50% del peso total de la composición, en particular en una cantidad que representa del 0,001% al 10% del peso total de la composición, y más particularmente en una cantidad que representa del 0,1% al 1% del peso total de la composición.

[0102] Una composición descrita en el presente texto puede ser más particularmente diseñada para reducir y/o tratar las condiciones responsables de causar el deterioro del estado de un epitelio, en particular de una epidermis.

30 [0103] Un estado de un epitelio cubierto por el presente texto puede ser un estado enlazado a una disfunción en la diferenciación terminal epitelial, en particular, epidérmica, en particular de los queratinocitos.

[0104] Tal estado puede ser de origen cronológico (es decir ligado al tiempo transcurrido tal como el envejecimiento de la piel) y/o un signo de un trastorno de la piel, ligado por ejemplo al fotoenvejecimiento.

35 [0105] Por consiguiente, una composición descrita en el presente texto, en particular una composición cosmética, puede en particular estar prevista para prevenir y/o tratar una reducción en el grosor de una epidermis y/o una pérdida de solidez, elasticidad, densidad y/o tono de una epidermis y/o la formación de arrugas y líneas finas.

40 [0106] Una composición descrita en el presente texto, en particular una composición cosmética, puede en particular estar prevista para prevenir y/o tratar las señales cutáneas de sequedad, en particular para prevenir y/o tratar la deshidratación de una epidermis.

45 [0107] Una composición del texto también se puede destinar para prevenir y/o tratar trastornos de la función de barrera de un epitelio, en particular de una epidermis.

[0108] Una composición descrita en el presente texto, en particular una composición cosmética, se puede destinar para prevenir y/o tratar las señales del envejecimiento epidérmico.

50 [0109] Una composición descrita en el presente texto, en particular una composición terapéutica, puede estar más particularmente destinada para el tratamiento de un trastorno de la piel tal como un trastorno de hidratación de la piel tal como xerosis, paraqueratosis, hiperqueratosis, ictiosis, psoriasis, dermatitis atópica, eczema, rosacea, líquen, prurito, una patología de la piel que tiene un componente inflamatorio o resultante de una degradación de la respuesta inmune, descamación, interrupción de la melanogénesis o de sebogénesis, alopecia, hirsutismo, un trastorno de curación de heridas, o un trastorno de la piel que implica fenómenos de secreción y procesos de invasión celular, en particular en el contexto de neoplasias malignas o benignas.

55 [0110] El presente texto también describe el uso de al menos un polipéptido del texto o de al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, como una herramienta para caracterizar el estado de un epitelio, y en particular de una epidermis.

[0111] A modo de ejemplo, es posible caracterizar según el texto el estado de un epitelio elegido de descamación, ictiosis, hiperqueratosis, sequedad de una epidermis, envejecimiento o fotoenvejecimiento.

[0112] Por consiguiente, el presente texto describe, según otro de sus aspectos, métodos no invasivos para caracterizar el estado superficial de una epidermis no patológica o la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico destinado a caracterizar de forma cualitativa o cuantitativa la expresión de la apolipoproteína D.

5 [0113] Estos métodos son particularmente ventajosos puesto que su uso no requiere necesariamente recurrir a una técnica operativa para realizar tal caracterización.

Un extracto de epidermis puede así ser obtenido por desorción simple y analizado directamente por una técnica analítica convencional, en particular como se ha descrito anteriormente.

10 [0114] Un método descrito en el presente texto para caracterizar el estado de un epitelio, por ejemplo, una epidermis, comprende al menos los pasos que consisten en:

a) determinar, en una muestra de dicho epitelio, el contenido de polipéptido del texto, o de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, y

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

15 [0115] Ventajosamente, un método del texto no es invasivo.

[0116] Un método del texto es ventajosamente realizado en una muestra aislada.

20 [0117] Según una forma de realización, un método según el texto se puede realizar en una muestra de epitelio, en particular de epidermis, recogida a partir de un individuo.

[0118] Un método según el texto también se puede realizar en una muestra de epitelio, y en particular de epidermis, recogida a partir de un modelo celular epitelial, y en particular, epidérmico, o de una piel aislada reconstruida para calificar el estado de la misma.

25 [0119] Una muestra de epitelio se puede recoger por cualquier método conocido por personas expertas en la técnica.

30 [0120] Un método según el texto puede ser realizado *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

[0121] Un valor de referencia puede ser, por ejemplo, un contenido de polipéptido o de secuencia de ácidos nucleicos determinada en una muestra de epidermis recogida a partir de un epitelio, y en particular una piel normal, es decir que es satisfactoria desde un punto de vista fisiológico, al igual que por ejemplo una piel joven.

35 [0122] Un valor de referencia se puede medir en paralelo con o después de la determinación de dicho contenido de un polipéptido o de una secuencia de ácidos nucleicos.

40 [0123] Una comparación de un contenido determinado con un valor de referencia puede hacer posible evaluar una desviación con respecto a este valor.

[0124] El análisis de la intensidad y/o de la naturaleza de esta desviación (negativa o positiva) puede ser informativo del estado de la epidermis.

45 [0125] La caracterización del estado de una epidermis puede ser un signo de un trastorno potencial de la piel que se puede corregir por el uso de compuestos capaces de modular la expresión de un polipéptido del texto.

[0126] Un método descrito en el presente texto se puede realizar en un método para el diagnóstico *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* de un trastorno supuesto de un epitelio, en particular de la epidermis, en un individuo.

50 [0127] Por ejemplo, el estado de un epitelio para ser evaluado se puede elegir de descamación, ictiosis, hiperqueratosis, sequedad de una epidermis, envejecimiento o fotoenvejecimiento.

55 [0128] Un polipéptido adecuado para realizar un método según la invención puede ser ventajosamente la apolipoproteína D.

[0129] La determinación del contenido de polipéptido del texto o de ácidos nucleicos del texto en una muestra de epidermis se puede realizar por cualquier protocolo conocido por personas expertas en la técnica.

60 [0130] Como métodos para la detección de un polipéptido, se pueden mencionar aquellas citadas anteriormente.

[0131] Por consiguiente, es posible concebir la detección de la presencia de un polipéptido del texto mediante un anticuerpo, cuando proceda en una forma marcada.

[0132] Un anticuerpo capaz de ser usado como una herramienta para la evaluación del estado de una epidermis se puede obtener por cualquier método conocido por personas expertas en la técnica, como se describe en " Antibodies: A Laboratory Manual ", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Ventajosamente, los anticuerpos usados pueden ser anticuerpos recombinantes tal como aquellos desarrollados por la compañía Antibodies-by-design.

[0133] Una secuencia de ácidos nucleicos adecuada para realizar un método según la invención puede ser ventajosamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la ApoD, por ejemplo, del tipo ARNm.

[0134] A modo de ejemplo de los métodos para detectar los ácidos nucleicos del texto, se pueden mencionar los métodos citados anteriormente.

[0135] El presente texto también describe un método no terapéutico para demostrar el efecto de un tratamiento responsable de causar la regresión de un trastorno de un epitelio, en particular un trastorno de la piel o del cuero cabelludo, en un individuo, que comprende al menos los pasos que consisten en:

a) realizar, antes del tratamiento, al menos una primera determinación, en una primera muestra de un epitelio recogida de dicho individuo, de una actividad biológica y/o de la expresión de un polipéptido del texto, o de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido,

b) realizar, después del tratamiento, al menos una segunda determinación, en una segunda muestra de un epitelio recogido de dicho individuo, de dicha actividad biológica y/o de dicha expresión de dicho polipéptido o de dicha expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos determinada en el paso a), y

c) comparar las primeras y segundas determinaciones, en particular para deducir a partir de ellas la información acerca del efecto al menos del tratamiento.

[0136] Tal tratamiento puede en particular ser un tratamiento cosmético.

[0137] En particular, el tratamiento cuyo efecto debe ser evaluado puede ser un tratamiento destinado para aliviar o reducir un trastorno de la piel o del cuero cabelludo ligado a una proliferación de queratinocitos y/o disfunción de la diferenciación.

[0138] La actividad biológica y la expresión de un polipéptido se puede determinar según se ha indicado anteriormente.

[0139] Según otro aspecto, el presente texto describe un método para el tratamiento cosmético de un trastorno de la piel que comprende al menos un paso que consiste en aplicar al menos una composición cosmética del texto a al menos parte de la piel, membranas mucosas y/o fibras de queratina.

[0140] Según otro aspecto, el presente texto describe el uso de una cantidad eficaz de al menos un polipéptido del texto o de al menos un agente modulador de la expresión de dicho polipéptido para la preparación y/o la mejora de un modelo celular pluriestratificado, en particular del tipo de membrana mucosa o epidérmica, y en particular un modelo de piel reconstruida.

[0141] En el presente texto, por "modelo de piel reconstruida" se entiende un modelo donde varios tipos de células son combinados, en particular tales como los constituyentes naturales de la piel, al igual que por ejemplo queratinocitos, fibroblastos, células de Langerhans y melanocitos.

[0142] Las células del tipo fibroblasto se pueden irradiar o de otro modo.

[0143] Tales modelos y su preparación se conocen por personas expertas en la técnica.

[0144] Para los fines de la presente invención, "un" debería ser entendido en el sentido de "al menos un".

[0145] Los ejemplos presentados a continuación se presentan a modo de ilustración y no limitan la invención.

EJEMPLO I

Análisis de muestras recogidas por tiras adhesivas de barniz en varias regiones de la piel de un individuo

[0146] Los análisis son realizados usando tiras adhesivas de barniz realizadas en las piernas.

[0147] Los sujetos adecuados para el estudio se ponen en 4 grupos.

[0148] El grupo AS corresponde al grupo 1: n=15 individuos menopáusicos secos.

[0149] El grupo AN corresponde al grupo 2: n=13 individuos menopáusicos normales.

[0150] El grupo JS corresponde al grupo 3: n=16 individuos jóvenes secos.

[0151] El grupo JN corresponde al grupo 4: n=14 individuos jóvenes normales.

5 1: Preparación de polvos de acetona

[0152] Dos tiras adhesivas de barniz (B. Mehul et al., J Biol Chem 2000, Apr 28; 275(17): 12841-7) de 10 cm² se colocan en 20 ml de acetona.

Los corneocitos se separan.

10 La mezcla se filtra en una membrana de nilón de 40 µm.

Tres enjuagues sucesivos se realizan con el mismo volumen de acetona.

La suspensión es finalmente filtrada en una bomba de vacío.

Los polvos de acetona del estrato córneo se obtienen en la forma seca.

15 2: Extracción de las muestras

[0153] Una extracción se realiza bajo condiciones de desnaturalización.

Para ello, un prelavado se realiza con un volumen (100 µl) de tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) +0.1% Tritón X100 se añade por mg de polvo de acetona.

20 La mezcla es molida en un Potter y centrifugada.

Se recupera el granulado de corneocito.

Se extrae con el mismo volumen (100 µl/mg) de tampón de Laemmli conteniendo 0.0625 mM Tris pH 6.8, 200 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol.

25 La mezcla se calienta a temperatura de ebullición durante 10 minutos, y luego se tritura y centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Se recupera el sobrenadante.

Un ensayo de proteínas se realiza según la técnica Bradford con el reactivo Bradford (ensayo Bio-Rad protein).

Las muestras se ajustan a 1 mg/ml.

3: Análisis de las proteínas por el método de Western blot

30 [0154] Las proteínas se separan por electroforesis SDS-PAGE.

Después de transferencia semiseca sobre la membrana PVDF (Immobilon-P Milipore) según un protocolo estándar, las proteínas se incuban con el anticuerpo Medcla 457 (36c6) (Accurate Chemical) de la antiapolipoproteína D durante toda la noche a 4°C.

35 A continuación, la segunda incubación se realiza con el anticuerpo secundario, en este caso un anticuerpo de ratón (anti-ratón IgG HRP de cabra conjugado) (Bio-Rad) dirigido contra el primer anticuerpo durante 1h 30 min a temperatura ambiente.

Las proteínas totales presentes en las membranas después de la transferencia se manchan con negro de amido, después de la inmunodetección.

40 El kit ECL Plus (Amersham) se usa para la visualización.

La imagen se adquiere con FluorSmax (BioRad) y las bandas se cuantifican con la ayuda del software Quantity-one (BioRad).

4: Resultados

45 [0155] Los resultados se expresan como delta cnt*mm² de la proteína de interés / delta cnt*mm² de las proteínas totales.

Metodología:

50 [0156]

• análisis doble de varianza en edad y tipo de piel teniendo en cuenta la interacción de estos dos factores + análisis simple de varianza (grupo) y prueba de comparación múltiple de Turkey.

55 Como las condiciones de normalidad y de homocedasticidad no fueron verificadas, el análisis fue realizado después de la transformación logarítmica.

El análisis estadístico fue realizado con los paquetes de software SAS versión 8.2 y SPSS versión 12.

[0157] Todas las pruebas fueron realizadas en doble umbral del 5%.

60 [0158] La tabla siguiente presenta los resultados medios y sus errores estándar de la media (SEM).

Grupo	Apolipoproteína D	Sem apoD
AS	192	62
AN	206	76
JS	738	245
JN	728	201

[0159] Una reducción significativa se nota en la expresión de la apolipoproteína D durante el envejecimiento de la piel (p=0.005).

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0160]
CONFORME AU DEPOT

10 <110> L'OREAL

<120> Utilisation cosmetique de protéines de type apolipoprotéine D

15 <130> BR 83226/CR/HG/cf

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 869

<212> ADN

<213> homo sapiens

25 <400> 1

```

gctgattctg catctggaaa ctgccttcat cttgaaagaa aagctccagg tcccttctcc      60
agccaccag cccaagatg gtgatgctgc tgctgctgct ttccgactg gctggcctct      120
tcggtgcggc agagggacaa gcatttcac tttgggaagt cccaatcct ccggtgcagg      180
agaattttga cgtgaataag tatctcgga gatggtacga aattgagaag atcccaacaa      240
cctttgagaa tggacgctgc atccaggcca actactcact aatggaaaac ggaaagatca      300
aagtgttaaa ccaggagttg agagctgatg gaactgtgaa tcaaatcgaa ggtgaagcca      360
ccccagttaa cctcacagag cctgccaagc tggaagttaa gttttcctgg tttatgccat      420
cggcaccgta ctggatcctg gccaccgact atgagaacta tgccctcgtg tattcctgta      480
cctgcatcat ccaacttttt cacgtggatt ttgcttggat cttggcaaga aaccctaadc      540
tccctccaga aacagtggac tctctaaaaa ataccctgac ttctaataac attgatgtca      600
agaaaatgac ggtcacagac caggtgaact gcccgaagct ctcgtaacca ggttctacag      660
ggaggctgca cccactccat gttacttctg cttcgctttc ccctacccca ccccccccc      720
ataaagacaa accaatcaac cacgacaaag gaagttgacc tgaacatgta accatgccct      780
accctgttac cttgctagct gcaaaaataaa cttgttgctg acctgcaaaa aaaaaaaaaa      840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                869

```

<210> 2

<211> 189

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 611 134 T3

Met Val Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Leu Ala Gly Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Gly Gln Ala Phe His Leu Gly Lys Cys Pro Asn Pro Pro
 20 25 30
 Val Gln Glu Asn Phe Asp Val Asn Lys Tyr Leu Gly Arg Trp Tyr Glu
 35 40 45
 Ile Glu Lys Ile Pro Thr Thr Phe Glu Asn Gly Arg Cys Ile Gln Ala
 50 55 60
 Asn Tyr Ser Leu Met Glu Asn Gly Lys Ile Lys Val Leu Asn Gln Glu
 65 70 75 80
 Leu Arg Ala Asp Gly Thr Val Asn Gln Ile Glu Gly Glu Ala Thr Pro
 85 90 95
 Val Asn Leu Thr Glu Pro Ala Lys Leu Glu Val Lys Phe Ser Trp Phe
 100 105 110
 Met Pro Ser Ala Pro Tyr Trp Ile Leu Ala Thr Asp Tyr Glu Asn Tyr
 115 120 125
 Ala Leu Val Tyr Ser Cys Thr Cys Ile Ile Gln Leu Phe His Val Asp
 130 135 140
 Phe Ala Trp Ile Leu Ala Arg Asn Pro Asn Leu Pro Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Asp Ser Leu Lys Asn Ile Leu Thr Ser Asn Asn Ile Asp Val Lys Lys
 165 170 175
 Met Thr Val Thr Asp Gln Val Asn Cys Pro Lys Leu Ser
 180 185

REIVINDICACIONES

1. Método de caracterización *in vitro* del envejecimiento de un epitelio que comprende al menos los pasos que consisten en:

a) determinar en una muestra de dicho epitelio el contenido de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, en particular representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO: 2, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, y

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

2. Método de cribado de los agentes activos antienvjecimiento que comprende al menos los pasos que consisten en:

a) poner en contacto al menos un tipo celular capaz de expresar un polipéptido teniendo una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 1, en particular representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 2, con al menos un compuesto químico o biológico, que debe evaluarse bajo condiciones favorables para una manifestación de la expresión de dicho polipéptido,

b) determinar el contenido de dicho polipéptido.

3. Método de caracterización de la eficacia de un tratamiento cosmético dirigido a la mejora de las señales de envejecimiento de la piel, tales como arrugas y líneas finas que comprende al menos la caracterización de la expresión de un polipéptido con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 1, en particular representada como conjunto por una secuencia representada por SEQ ID NO 2.