

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 131**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2011 PCT/FR2011/050953**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135253**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11723513 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2563807**

54 Título: **Polipéptido expresado en la capa córnea y su utilización**

30 Prioridad:

27.04.2010 FR 1053225

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER (TOULOUSE III)
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**JONCA, NATHALIE;
TOULZA, EVE;
SAINTIGNY, GAËLLE;
SERRE, GUY y
WEBER VIVAT, MARINA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

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

ES 2 615 131 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

Polipéptido expresado en la capa córnea y su utilización

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un nuevo polipéptido de la capa córnea, en lo sucesivo denominado en el presente documento LCE6A, así como a sus aplicaciones, tanto a nivel cosmético como terapéutico.

10 **Estado de la técnica**

La piel está constituida principalmente por tres capas, esto es, partiendo desde la más superficial, la epidermis, la dermis y la hipodermis.

15 La epidermis está constituida en particular por queratinocitos (mayoritarios), melanocitos (que intervienen en la pigmentación de la piel) y células de Langerhans. Su función es proteger el cuerpo del ambiente exterior y de asegurar su integridad, y particularmente frenar la penetración de microorganismos o de sustancias químicas, y de impedir la evaporación del agua contenida en la piel.

20 Para esto, los queratinocitos experimentan un proceso de maduración orientado continuo durante el cual los queratinocitos situados en la capa basal de la epidermis forman, en el estado terminal de su diferenciación, corneocitos que son células obtenidas de la cornificación (apoptosis particular). Estos corneocitos son muy intercohexivos, están totalmente queratinizados en forma de envolturas córneas y rodeados de un medio extracelular muy rico en lípidos. Los elementos constitutivos de estas células, así como las enzimas que regulan su
25 desprendimiento para permitir la descamación, se sintetizan principalmente en los queratinocitos de la capa celular subyacente, la capa granulosa. Los queratinocitos granulosa corresponden al último estadio nucleado de la diferenciación queratinocitaria, antes de la cornificación que viene acompañado de lisis nuclear con la detención de cualquier actividad de transcripción y traducción. En este estadio es cuando culmina la producción de los precursores de la envoltura córnea y de otros constituyentes celulares específicos indispensables para la función barrera de la epidermis, tales como las ceramidas, el colesterol y los ácidos grasos libres. La envoltura córnea formada durante la cornificación se sustituye por la bicapa lipídica de los queratinocitos granulosa. Representa el 7 % del peso seco de la capa córnea. Está constituida por proteínas unidas entre sí o con la envoltura lipídica laminar de manera covalente por las transglutaminasas formando un complejo macromolecular particularmente estable, insoluble e impermeable, que es esencial para la resistencia física y para la función barrera de la capa
35 córnea.

La diferenciación epidérmica es un fenómeno complejo que requiere una regulación precisa de la expresión de genes que permiten la fabricación de diferentes constituyentes de los queratinocitos además de los corneocitos. Numerosos factores de transcripción están implicados en este proceso. Los genes de las numerosas proteínas de la envoltura córnea se localizan dentro de un mismo grupo de 2,5 Mb, denominado "complejo de diferenciación epidérmica" (CDE) en la posición 1q21.3. El CDE comprende más de 50 genes diferentes expresados principalmente en la epidermis. Allí se encuentra la mayoría de los genes que codifican las proteínas estructurales necesarias para la diferenciación terminal, tales como la loricrina, la filagrina y la involucrina. El CDE también contiene varias familias de genes, de las cuales al menos 18 codifican las proteínas tardías de la envoltura córnea
45 (*Late Cornified Envelope*, LCE, en español envoltura tardía cornificada) (Marshall *et al.* 2001, Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 13031-6). Durante la cornificación, estas proteínas de la familia LCE se incorporan en la envoltura córnea gracias a la acción de las transglutaminasas que establecen un enlace ϵ -(γ -glutamil) lisilo entre un resto de glutamina donante y un grupo amina aceptor, de manera dependiente de calcio.

50 La función barrera de la epidermis puede encontrarse alterada en determinadas condiciones climáticas (bajo el efecto del frío y/o del viento, por ejemplo); bajo el efecto del estrés o de la fatiga; bajo el efecto de determinados factores químicos (contaminación, rayos ultravioleta, alcohol, jabones irritantes, productos de limpieza doméstica, detergentes, etc.).

55 Numerosas patologías cutáneas, que se caracterizan por la producción de una capa córnea gruesa y por una descamación anómala, es decir, por una hiperqueratosis, también presentan una función barrera alterada. La hiperqueratosis puede producirse sobre cualquier zona anatómica cutánea y en contextos clínicos muy variados. Su sustrato fisiopatológico y su causa son varios. Como ejemplos se pueden citar: la xerosis (o sequedad cutánea), la ictiosis, la soriasis, determinadas lesiones tumorales benignas o malignas, la hiperqueratosis reactiva. A la inversa, determinadas manifestaciones patológicas acarream un adelgazamiento de la epidermis y en particular de la capa córnea, traduciéndose en una fragilidad excesiva del revestimiento cutáneo. Esta puede encontrarse en diversas áreas anatómicas, su causa es variable y puede ser constitucional o adquirida. Como ejemplos se pueden citar: los trastornos tróficos cutáneos de extremidades inferiores en los pacientes portadores de patologías vasculares, varices, arteriopatías (diabetes, arterioesclerosis...), trastornos tróficos cutáneos en el cuadro de un síndrome algodistrófico, los trastornos tróficos debidos a una cicatrización anómala.

La función barrera de la epidermis también puede encontrarse alterada durante el envejecimiento. De este modo, a menudo se constata en personas mayores, y particularmente de más de 50 años, la manifestación de una xerosis o sequedad de las mucosas, relacionada con una disminución de la secreción de sebo, con modificaciones hormonales o con un flujo hídrico ralentizado a través de la epidermis. Estas alteraciones de la barrera de la epidermis provocan un descenso de la cantidad de agua organizada, una desincronización de la síntesis o una modificación de la estructura y/o de la composición de las biocapas de la capa granulosa. Estas modificaciones favorecen de este modo la descamación de la capa córnea, la penetración de alérgenos, de agentes irritantes o de microorganismos que ocasionan de este modo una desecación cutánea que puede generar sensaciones molestas tales como tirantez o enrojecimiento, y también alterar el brillo del cutis y la flexibilidad de la piel.

Para prevenir o corregir este fenómeno, es sabido aplicar en la piel composiciones cosméticas o farmacéuticas que contengan agentes higroscópicos, tales como azúcares o polioles, o incluso urea y ácido láctico (componentes del NMF, *Natural Moisturizer Factor*, en español, factor hidratante natural) para captar el agua presente en la piel y frenar de este modo su evaporación. Por lo general, también se recurre a cuerpos grasos que permiten formar una película oclusiva sobre la piel, tales como la vaselina, que contribuye a frenar la evaporación del agua. Por otra parte, estas composiciones incorporan frecuentemente activos que actúan sobre una o diversas dianas biológicas diferentes que intervienen bien en los procesos de regeneración de la piel, en particular en la diferenciación de los queratinocitos, en la síntesis de lípidos epidérmicos y en la cohesión de corneocitos, o bien en la síntesis endógena de constituyentes del factor hidratante natural (NMF) de la piel, en particular en la síntesis de los proteoglucanos.

Sin embargo, siempre persiste la necesidad de proponer nuevos activos cosméticos o farmacéuticos que permitan luchar más eficazmente contra la sequedad cutánea, contra los trastornos de la función barrera y/o contra el debilitamiento de la epidermis.

Ahora bien, la solicitante, tras el análisis que ha realizado del transcriptoma del queratinocito granuloso humano (Toulza *et al.*, Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function, *Genome Biology* 2007, 8 : R107), ha puesto de manifiesto un nuevo gen situado en el CDE sobre el cromosoma humano 1q21, que codifica un polipéptido de 80 aminoácidos, que ha decidido denominar LCE6A, y cuyo ADN complementario ha aislado y clonado (nomenclatura génica humana, GenBank DQ991251).

La secuencia del gen correspondiente a esta nueva proteína LCE6A, de una longitud de 1130 kb, permite afirmar que pertenece a la familia de genes de "*Late Cornified Envelope*", LCE (envoltura tardía cornificada) que codifican las proteínas de la envoltura córnea. La expresión de este gen está muy fuertemente inducida en la fracción enriquecida en queratinocitos granulosa, que corresponde a un estadio tardío de la diferenciación queratinocitaria. Si bien pertenece a la familia de LCE, la secuencia polipeptídica correspondiente a la LCE6A presenta poca homología con las secuencias de otras proteínas de esta misma familia y constituye un nuevo grupo entre los 5 grupos hasta ahora conocidos en la familia de LCE.

La secuencia polipeptídica de la proteína LCE6A tiene 80 aminoácidos. Contiene 8 restos de glutamina y 6 restos de lisina. Entre un panel de 17 ADN complementarios humanos de tejidos o de órganos sanos (corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, colon, leucocitos, epidermis), la expresión del gen de LCE6A solo se ha encontrado en la epidermis.

El documento WO02/059260 describe un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2.

Objeto de la invención

De acuerdo con un aspecto, la presente invención tiene por objeto una utilización cosmética o incluso una terapéutica, de una cantidad eficaz:

- de al menos un polipéptido seleccionado entre los fragmentos de SEQ ID N°: 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, y los análogos de uno de los fragmentos, presentando dichos fragmentos y análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys),

como agente útil para reforzar la función barrera de la epidermis y/o prevenir y/o tratar los signos de la sequedad cutánea y/o incluso prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también tiene por objeto una utilización:

- de al menos un polipéptido seleccionado entre los fragmentos de SEQ ID N°: 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, y los análogos de uno de los fragmentos, presentando dichos fragmentos y análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys),

para fabricar una composición terapéutica con objeto de:

- reforzar la función barrera de la epidermis y prevenir y/o tratar los signos de la sequedad cutánea o incluso prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo; y/o
- 5 - prevenir y/o tratar los trastornos tróficos cutáneos o los consecutivos a trastornos de la cicatrización; y/o
- prevenir y/o tratar el adelgazamiento de la epidermis y, en particular, de la capa córnea y/o tratar una fragilidad excesiva del revestimiento cutáneo y/o a inducir el engrosamiento de la capa córnea; y/o
- 10 - tratar la hiperqueratosis, la xerosis, la ictiosis, la soriasis, las lesiones tumorales hiperqueratósicas benignas o malignas o la queratosis reactiva.

La presente invención también tiene por objeto uno de los polipéptidos descritos anteriormente, para su utilización para prevenir y/o tratar los trastornos mencionados anteriormente.

- 15 También se describe una composición cosmética o farmacéutica que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un polipéptido aislado natural o sintético, comprendiendo dicho polipéptido al menos un fragmento de SEQ ID N° 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, o un análogo de uno de los fragmentos, presentando dichos fragmentos y análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys).
- 20 También se describe un polinucleótido aislado que comprende al menos un fragmento de SEQ ID N°: 1, o un análogo de uno de los fragmentos.

Por reforzar la función barrera cutánea, se entiende garantizar el mantenimiento de la función barrera de la piel a un nivel de eficacia mínimo, que corresponde a su nivel de eficacia normal, es decir, el nivel al cual se garantiza su función de protección del organismo.

Por "signos de sequedad cutánea", se entiende todas de las modificaciones del aspecto exterior de la piel, debidas particularmente a la deshidratación de la epidermis, tales como el aspecto apagado, rugoso, no sedoso, rojizo y/o escamoso, así como la pérdida de elasticidad y una disminución del grosor de la piel. En casos graves, los signos de sequedad cutánea incluyen sensaciones relacionadas con el fenómeno de sequedad, tales como prurito, picores y/o tirantez, que pueden conducir a la aparición de patologías verdaderas tales como, por ejemplo, hipersensibilidad, atrofia cutánea, dermatitis atópica o xerosis invernal.

Por consiguiente, por "prevenir y/o tratar los signos de la sequedad cutánea", se entiende reforzar, preservar y/o restaurar la barrera epidérmica, particularmente su función protectora o reguladora, mejorar y/o reforzar la cohesión celular de la epidermis, aumentar la resistencia epidérmica a los agentes agresores, mejorar y/o reforzar la estructura de la epidermis, aumentar su grosor y/o garantizar la integridad cutánea.

Por "prevenir y/o tratar los síntomas del envejecimiento cutáneo", se entiende, de manera preferentemente, el envejecimiento fotoinducido o fotoenvejecimiento. Por "signos de envejecimiento cutáneo", se entiende todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debidas al envejecimiento, tales como, por ejemplo, líneas y arrugas, piel marchita, piel flácida, piel adelgazada, pérdida de elasticidad y/o de firmeza de la piel, piel apagada y sin brillo.

Por "cantidad eficaz" en el sentido de la presente invención, se entiende la cantidad mínima necesaria para la observación del efecto esperado, es decir, un efecto cosmético o terapéutico, entendiéndose que las cantidades eficaces necesarias para la obtención de un efecto cosmético o terapéutico pueden ser, en su caso, iguales o diferentes.

Por "trastornos tróficos cutáneos" se entienden los trastornos particularmente de origen vascular, las anomalías de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) o las lesiones originadas por una insuficiencia microcirculatoria de origen arterial o venoso. Se denominan trastornos tróficos ya que son el resultado de una mala nutrición de la piel que está mal irrigada.

Polipéptidos de acuerdo con la invención

55 Por "polipéptido" se entiende una molécula que comprende una cadena lineal de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

En la presente descripción, se utilizará el término polipéptido para designar tanto a una proteína como a un péptido.

60 Los polipéptidos de acuerdo con la invención tienen una longitud inferior o igual a 80 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido consta de 4 a 20, más preferentemente de 17 a 15 aminoácidos.

65 Una de las características esenciales de este polipéptido es que debe presentar al menos un dominio de glutamina (Q, Gln) - lisina (K, Lys) para poder servir de sustrato para las transglutaminasas.

De acuerdo con la invención, el polipéptido se selecciona entre los fragmentos de SEQ ID N° 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos y los análogos de fragmentos, presentando dichos fragmentos y análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys).

5 En el sentido de la presente invención, se entiende designar de manera general, salvo indicación contraria, por LCE6A, a la secuencia SEQ ID N° 2 de la proteína que haya experimentado, o no, modificaciones postraduccionales.

El polipéptido de acuerdo con la invención es un polipéptido aislado. Por polipéptido "aislado" se entiende un polipéptido aislado del cuerpo humano o de un organismo vivo, preferentemente en forma purificada.

10 Por "análogo de un polipéptido", se entiende designar cualquier polipéptido que presente (a) una homología de secuencia de aminoácidos, en particular con respecto a una de las secuencias características de dicho polipéptido o de sus fragmentos, así como (b) una actividad biológica de la misma naturaleza. La homología es de al menos 80 %, y puede ser, por ejemplo, de al menos 85 %, y por ejemplo de al menos 95 %. Esta homología de secuencia puede resultar de modificaciones procedentes de una o más mutaciones (sustituciones, inserciones o deleciones) en las secuencias de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Preferentemente, dichos polipéptidos comprenden solamente mutaciones de tipo sustitutivas. Estas sustituciones pueden ser conservadoras o no. Por porcentaje de homología se entiende el número de restos idénticos entre dos secuencias, estando dichas secuencias alineadas de manera que se obtenga una correspondencia máxima. Para medir la homología entre dos secuencias pueden utilizarse diferentes algoritmos conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, las secuencias de los polinucleótidos pueden compararse utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas del paquete informático de Wisconsin, Versión 10.0, de Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis. Como alternativa, las secuencias pueden compararse utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Gish and States, Nature Genet. 3: 266-272 (1993); Madden *et al.*, Meth. Enzymol. 266: 131-141 (1996); Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997); Zhang and Madden, Genome Res. 7: 649-656 (1997)), particularmente blastp o tblastn (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)).

30 Por "actividad biológica de la misma naturaleza", se entiende designar en particular un análogo o un fragmento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de acuerdo con la invención, que presente al menos una de las características o propiedades funcionales de los polipéptidos de acuerdo con la invención, particularmente por que (i) puede ser reconocido por un anticuerpo específico de un polipéptido de acuerdo con la invención; (ii) presenta al menos uno de los dominios o regiones, tales como los definidos a continuación; (iii) puede unirse a las transglutaminasas (TGM), tales como las TGM 1, 3 y 5 humanas, que participan en la formación de la envoltura córnea.

35 De acuerdo con un modo de realización preferido, el análogo del polipéptido de acuerdo con la invención difiere de la secuencia de la proteína LCE6A (SEQ ID N° 2) únicamente por la presencia de sustituciones conservativas. Como ejemplo de mutaciones conservativas que pueden considerarse en la presente invención, se puede mencionar, de manera no exhaustiva, el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos por un aminoácido de la misma clase, tales como las sustituciones de aminoácidos con cadenas laterales sin carga (tales como asparagina, glutamina, serina, cisteína, y tirosina), aminoácidos con cadenas laterales básicas (tales como lisina, arginina e histidina), aminoácidos con cadenas laterales ácidas (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), aminoácidos con cadenas laterales apolares (tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano).

45 Un polipéptido o análogo igualmente contemplado por la presente invención puede ser un polipéptido que ha experimentado una o más modificaciones postraduccionales.

50 Por "modificación(es) postraduccionales" se entiende englobar el conjunto de modificaciones que un polipéptido puede experimentar después de su síntesis en una célula, tal como, por ejemplo, una o más fosforilaciones, una o más tiolaciones, una o más acetilaciones, una o más glucosilaciones, una o más lipidaciones, tales como una pamitoilación, una reordenación estructuras de tipo formación de puentes disulfuro en el interior de la secuencia peptídica.

55 En el sentido de la invención, se entiende designar por "fragmento de polipéptido" cualquier parte de un polipéptido conforme a la invención que comprenda al menos 5, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 9 y más particularmente al menos 15 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido, presentando dicha parte adicionalmente una actividad biológica de la misma naturaleza.

60 De acuerdo con un modo de realización preferencial, un fragmento de polipéptido adecuado para la invención se selecciona entre las secuencias SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, y sus mezclas.

65 De acuerdo con otro modo de realización, un polipéptido adecuado para realizar la invención es también un polipéptido tal como se define anteriormente, fusionado con otro polipéptido, un agente de direccionamiento, hidrófilo o hidrófobo, un precursor de bioconversión, un agente de marcado luminiscente, radioactivo o colorimétrico. De manera no limitativa, como ejemplos de compuestos que pueden acoplarse con un polipéptido de acuerdo con la invención, pueden citarse proteínas fluorescentes, compuestos químicos fluorescentes tales como rodamina,

fluoresceína, compuestos fosforescentes, elementos radioactivos o agentes de marcado colorimétrico, como los sustratos cromogénicos sensibles a la acción de determinadas enzimas tales como la galactosidasa, la peroxidasa y la acetiltransferasa.

- 5 De acuerdo con la naturaleza de los compuestos que pueden acoplarse con un polipéptido de acuerdo con la invención, el acoplamiento puede realizarse por procedimientos químicos, particularmente mediante funciones químicas reactivas o por procedimientos de biología molecular conocidos por el experto en la materia.

- 10 El polipéptido de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente una o más modificaciones químicas que mejoren su resistencia a la degradación o su biodisponibilidad. Esta modificación debe ser biológicamente compatible y debe ser compatible con una utilización en el campo de los cosméticos o de la farmacia. Dichas modificaciones químicas o enzimáticas son muy conocidas por el experto en la materia. De manera no limitativa, se pueden citar, por ejemplo: las modificaciones del extremo C o N terminales de los polipéptidos (acetilación); las modificaciones del enlace entre dos aminoácidos (acilación o alquilación); los cambios de quiralidad.
- 15 Preferentemente, se utiliza una protección basada bien en la acilación o en la acetilación del extremo amino terminal, o en la amidación o la esterificación del extremo carboxilo terminal, o incluso en ambas.

- 20 De este modo la invención se refiere a un polipéptido tal como se define anteriormente, estando dicho polipéptido en forma protegida o no.

- 25 En el campo de los aminoácidos, la geometría de las moléculas es tal que pueden presentarse, teóricamente, en forma de isómeros ópticos diferentes. En efecto, existe una conformación molecular del aminoácido (AA) tal que se desvía a la derecha del plano de polarización de la luz (conformación dextrógira o D-aa), y una conformación molecular del aminoácido (aa) tal que se desvía a la izquierda del plano de polarización de la luz (conformación levógira o L-aa). La naturaleza solo ha conservado los aminoácidos naturales a la conformación levógira. En consecuencia, un polipéptido de origen natural solo estará constituido por aminoácidos de tipo L-aa. Por lo tanto, la síntesis química de laboratorio permite preparar aminoácidos que tengan las dos conformaciones posibles. A partir de este material de base, también es posible incorporar, durante la síntesis de los polipéptidos, aminoácidos en forma tanto dextrógira como levógira, de los isómeros ópticos.

- 30 De este modo, los aminoácidos que constituyen el polipéptido de acuerdo con la invención pueden estar en configuración L y D; de manera preferencial, los aminoácidos están en forma de L. El polipéptido de acuerdo con la invención puede estar por tanto en forma L, D o DL.

- 35 Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden ser de origen natural o sintético. Pueden sintetizarse por cualquier método bien conocido por el experto en la materia. Dichos métodos incluyen particularmente la síntesis química convencional (en fase sólida o en fase líquida homogénea), la síntesis enzimática (Kullman *et al*, J. Biol. Chem. 1980, 225, 8234) a partir de aminoácidos constitutivos o de sus derivados.

- 40 Los polipéptidos de acuerdo con la invención también pueden obtenerse por procedimientos de producción biológica tales como la fermentación de una cepa de bacterias modificadas o no, por ingeniería genética para producir los polipéptidos o fragmentos de acuerdo con la invención usando técnicas recombinantes (véanse los ejemplos), o incluso por extracción de proteínas de origen animal o vegetal seguido de una hidrólisis controlada que libera los fragmentos peptídicos de tamaño mediano y pequeño, objeto de la invención. El experto en la materia que sepa
- 45 cómo realizar la síntesis de extracción y purificación de proteínas y péptidos puede contemplar otros procedimientos más sencillos o más complejos.

- 50 Preferentemente, los polipéptidos de acuerdo con la invención se obtienen por una síntesis química, siendo particularmente ventajosa esta tecnología por razones de pureza, de especificidad antigénica, de ausencia de productos de reacción secundarios no deseados y por su facilidad de producción.

- 55 De acuerdo con un modo de realización ventajoso de la invención, los polipéptidos anteriormente citados de acuerdo con la invención se disuelven previamente en uno o más disolventes cosméticos o farmacéuticamente aceptables. De manera convencional, el experto en la materia utiliza dichos disolventes tales como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, glicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de estos disolventes.

- 60 De acuerdo con otro modo de realización ventajoso de la invención, los polipéptidos anteriormente citados se disuelven previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o se adsorben en polímeros orgánicos en polvo, en soportes minerales como el talco y la bentonita, y más generalmente se disuelven en, o se fijan sobre, cualquier vector cosméticamente o farmacéuticamente aceptable.

La secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención

- 65 De acuerdo con un modo de realización la presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención y su aplicación en las diferentes utilidades de acuerdo con la

invención.

La expresión “ácido nucleico” significa un encadenamiento (hebras) de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprenden, opcionalmente, al menos un nucleótido modificado que permite la hibridación, que comprende, por ejemplo, un enlace modificado, una base púrica o pirimídica modificada, o un azúcar modificado.

El ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o ser una mezcla de ambos. También puede estar en forma de cadena simple (hebra simple) o doble (hebra doble), o ser una mezcla de ambas.

De este modo, se describe la utilización de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de acuerdo con la invención, particularmente las secuencias correspondientes a al menos un fragmento de la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEQ ID N° 1, o análogos de la misma para la preparación de una composición de acuerdo con la invención.

En el sentido de la presente invención, se entiende designar por “fragmento de secuencia de ácidos nucleicos”, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una parte de un polipéptido de acuerdo con la invención, o un análogo de la misma.

Por “análogo de una secuencia de ácidos nucleicos”, se entiende designar cualquier secuencia de ácidos nucleicos, opcionalmente resultante de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y que codifica un polipéptido de secuencia idéntica o análoga a la del polipéptido codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ARN mensajero, un ácido nucleico obtenido por una técnica de amplificación enzimática tal como la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, en español reacción en cadena de la polimerasa).

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden obtenerse de cualquier origen posible, es decir, animal, en particular de mamíferos o incluso más particularmente de seres humanos, de plantas, o de microorganismos (virus, fagos, 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.

De acuerdo con un modo de realización preferido, los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden utilizarse como cebador y/o sonda en los procedimientos que aplican particularmente la técnica de la PCR.

Esta técnica necesita la elección de pares de cebadores oligonucleotídicos que enmarcan el fragmento que debe amplificarse. Los fragmentos amplificados pueden identificarse, por ejemplo, después de una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, o después de una técnica cromatográfica como la filtración en gel o la cromatografía de intercambio de iones. La especificidad de la amplificación puede controlarse por hibridación molecular utilizando como sonda las secuencias nucleotídicas de los polinucleótidos de la invención, plásmidos que contienen estas secuencias o sus productos de amplificación.

Los fragmentos nucleotídicos amplificados pueden utilizarse como reactivos en reacciones de hibridación para poner de manifiesto la presencia, en una muestra biológica, de un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a la de dichos fragmentos nucleotídicos amplificados.

La invención también contempla los fragmentos nucleotídicos que pueden obtenerse por amplificación usando los cebadores de acuerdo con la invención.

Como alternativa a la PCR (similar a la PCR) pueden emplearse ventajosamente otras técnicas de amplificación del ácido nucleico diana, usando un par de cebadores de secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención. Por similar a la PCR se entenderá denominar todos los métodos que realicen reproducciones directas o indirectas de las secuencias de ácidos nucleicos, o bien en las que los sistemas de marcado se han amplificado, estas técnicas son muy conocidas, en general se trata de la amplificación del ADN por una polimerasa; si la muestra de origen es un ARN conviene efectuar previamente una transcripción inversa.

En el caso en el que el polinucleótido diana a detectar sea un ARN, por ejemplo, un ARNm, se utilizará ventajosamente, antes de realizar una reacción de amplificación usando los cebadores de acuerdo con la invención o de realizar un procedimiento de detección usando sondas de la invención, una enzima de tipo transcriptasa inversa para obtener un ADN complementario (ADNc) a partir del ARN contenido en la muestra biológica. El ADNc obtenido servirá después de diana para los cebadores o las sondas aplicados en el procedimiento de amplificación o de detección de acuerdo con la invención.

En este caso, la invención también está relacionada con la utilización de fragmentos de ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican los polipéptidos considerados de acuerdo con la invención.

Una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia en sentido, antisentido o interferencial correspondiente a una secuencia que codifique un polipéptido de acuerdo con la invención.

- 5 De este modo, se describe la utilización de secuencias de ácidos nucleicos, particularmente de ácidos desoxirribonucleicos, o de ácidos ribonucleicos, que codifican un polipéptido de acuerdo con la invención. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden utilizarse particularmente para preparar las secuencias de ácidos ribonucleicos correspondientes, en sentido o antisentido.
- 10 La cantidad de polipéptido o de secuencia de ácidos nucleicos conforme con la invención contenida en una composición de acuerdo con la invención, también denominada "cantidad eficaz" depende, por supuesto, de la naturaleza del compuesto y del efecto que se busca y puede por tanto variar en gran medida. Para dar un orden de magnitud, una composición puede contener un polipéptido o una secuencia de ácidos nucleicos conforme con la invención en una cantidad que represente del 0,00001 % al 20 % del peso total de la composición, en particular en
- 15 una cantidad que represente del 0,0001 % al 5 % del peso total de la composición, y más particularmente en una cantidad que represente del 0,003 % al 3 % del peso total de la composición.

La composición de acuerdo con la invención

- 20 De manera preferida, la composición de acuerdo con la invención se aplica sobre una piel seca patológica o no patológica. También puede aplicarse ventajosamente sobre la piel del rostro, del cuello y opcionalmente del escote o en una variante, sobre cualquier parte del cuerpo.

La composición cosmética y/o farmacéutica puede aplicarse por la mañana y/o por la noche, en el rostro, cuello y

25 opcionalmente, en el escote, incluso en todo el cuerpo.

La composición cosmética y/o farmacéutica realizada de acuerdo con la invención también comprende en general un medio fisiológicamente aceptable y, de manera preferente, cosméticamente aceptable, es decir, que es adecuado para su utilización en contacto con la piel humana sin riesgo de toxicidad, de incompatibilidad, de inestabilidad, de

30 respuesta alérgica y particularmente que no provoque sensación de molestia (enrojecimiento, tirantez, picor...) inaceptable para el usuario.

Preferentemente, el medio fisiológicamente aceptable está constituido por agua.

35 La composición cosmética y/o farmacéutica utilizada de acuerdo con la invención puede presentarse en cualquier forma adaptada a una aplicación tópica sobre la piel y en particular en forma de emulsión de aceite en agua, de agua en aceite o múltiple (E/H/E o H/E/H) que opcionalmente pueden estar en forma de microemulsiones o nanoemulsiones, o hidrodispersión, de solución, de gel acuoso o de polvo. Preferentemente esta composición se presenta en forma de una emulsión de aceite en agua.

40 Cuando esta composición se utiliza como producto de cuidado o de limpieza de la piel del rostro y/o del cuerpo, puede presentarse particularmente en forma de fluido, de gel o de espuma, acondicionada, por ejemplo, en un frasco con bomba dosificadora, un aerosol o un tubo, o en forma de crema acondicionada, por ejemplo, en un tarro. En una variante, puede tener forma de un producto de maquillaje y en particular de una base o de un polvo suelto o

45 compacto.

Además del polipéptido anteriormente descrito, la composición cosmética y/o farmacéutica de acuerdo con la invención también puede comprender al menos un aditivo habitual en el campo cosmético o farmacéutico, tal como por ejemplo un compuesto seleccionado entre un agente gelificante y/o espesante, un agente tensioactivo o

50 cotensioactivo, un cuerpo graso líquido o un aceite, una cera, un elastómero de silicona, un filtro solar, un colorante, un agente matizante o una carga, un pigmento, un agente tensor, un conservante, un secuestrante, un perfume y sus mezclas.

Particularmente, de acuerdo con un modo de realización preferido, la composición cosmética de acuerdo con la invención puede comprender, de manera no limitativa, uno o más de los siguientes aditivos:

55

- uno o más agentes gelificantes y/o espesantes de la fase acuosa, seleccionados, por ejemplo, entre los homo- y copolímeros reticulados o no, hidrófilos o anfífilos, del ácido acriloilmetilpropano sulfónico (AMPS) y/o de acrilamida y/o de ácido acrílico y/o de sales o de ésteres de ácido acrílico tales como el copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP y el copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/beheneth-25 metacrilato, particularmente los comercializados con las denominaciones Aristoflex® AVC y HMB de Clariant, o incluso los acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C10-30 comercializado con la denominación comercial PEMULEN® TR-1 o TR-2, Carbopol® 1382, Carbopol® Ultrez 20 por la compañía Novéon, los derivados celulósicos, las gomas de origen vegetal (acacia o arábica, agar, guar, algarroba, alginatos, carragenanos, pectina) o de origen microbiano (xantana, pululano), las arcillas (laponita). Dicho agente gelificante y/o espesante puede estar presente en la composición en una cantidad del orden de 0,01 a 5 % en peso, con respecto al peso
- 60
- 65

total de la composición;

- 5 - uno o más agentes tensioactivos, preferentemente emulsionantes, que sean no iónicos, aniónicos, catiónicos o anfóteros, y en particular los ésteres de ácidos grasos y de polioles tales como los ésteres de ácidos grasos y de glicerol oxialquilénados (más particularmente polioxietilénados), los ésteres de ácidos grasos y de sorbitán oxialquilénados, los ésteres de ácidos grasos oxialquilénados (oxietilénados y/u oxipropinélados) como la mezcla estearato de PEG-100 /estearato de glicerilo comercializado, por ejemplo, por la compañía Croda con la denominación Arlacel® 165 y los ésteres de ácidos grasos como el estearato de sacarosa; los éteres de alcohol graso y de azúcar, particularmente los alquilpoliglucósidos (APG) tales como el decilglucósido y el laurilglucósido, el cetostearylglucósido opcionalmente mezclado con alcohol cetostearylíco, comercializado por ejemplo con la denominación Montanov® 68 por la compañía Seppic, así como el araquidil glucósido, por ejemplo en forma de mezcla de alcoholes araquídico y behénico y de araquidilglucósido comercializado con la denominación Montanov® 202 por la compañía Seppic; los éteres de alcoholes grasos y de polietilenglicol; los polisiloxanos modificados con poliéteres; la betaina y sus derivados; los policuaternios; las sales de sulfato de alcoholes grasos etoxilados; los sulfosuccinatos; los sarcosinatos; los alquil y dialquilfosfatos y sus sales; y los jabones de ácidos grasos. Dicho agente tensioactivo puede estar presente en la composición en una cantidad del orden de 0,1 a 8 %, preferentemente de 0,5 a 3 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 20 - uno o más co-tensioactivos tales como los alcoholes grasos lineales de larga cadena carbonada (C14-C20) y en particular los alcoholes cetílico y estearílico, estando dicho agente tensioactivo presente en la composición a razón de 0,1 a 5 %, preferentemente de 0,5 a 2 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 25 - uno o más cuerpos grasos líquidos a temperatura ambiente, comúnmente denominados aceites, volátiles o no volátiles, hidrocarbonados, siliconados, lineales, cíclicos o ramificados, por ejemplo, los aceites de silicona tales como los polidimetilsiloxanos (dimeticonas), los polialquilociclosiloxanos (ciclometiconas) y los polialquilfenilsiloxanos (fenildimeticonas); los aceites sintéticos tales como los aceites fluorados, los alquilbenzoatos y los hidrocarburos ramificados tales como poliisobutileno, isododecano; los aceites minerales (parafina); vegetales (aceite de almendras dulces, de macadamia, de pepita de grosella, de jojoba o incluso de *Camelina sativa*, tal como el aceite comercializado con la denominación comercial Lipex® Omega 3/6 por la compañía Unipex); los alcoholes grasos, las amidas grasas, los ácidos o los ésteres grasos como el benzoato de alcoholes en C12-C15 comercializado con la denominación comercial Finsolv® TN por la compañía Innospec, los triglicéridos incluyendo los ácidos cáprico/caprílico, el dicaprilil carbonado comercializado con la denominación Cetiol® CC por la compañía Cognis; preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 10 %, preferentemente de 0,5 a 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 35 - una o más ceras (compuesto sólido o sustancialmente sólido a temperatura ambiente) y cuyo punto de fusión es generalmente superior a 35 °C, tales como la ozoquerita, la cera de polietileno, la cera de abeja o la cera de carnauba, preferentemente a razón de 0,01 a aproximadamente 5 %, preferentemente de 0,5 a 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 40 - uno o más elastómeros de silicona obtenidos particularmente por reacción, en presencia de un catalizador, de un polisiloxano que tiene al menos un grupo reactivo (hidrógeno o vinilo, particularmente) y que lleva al menos un grupo alquilo (particularmente metilo) o fenilo, terminal y/o lateral, con un organosilicio tal como un organohidrogenopolisiloxano, preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 20 %, preferentemente de 0,25 a 15 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 45 - uno o más filtros solares, particularmente los filtros orgánicos, tales como los derivados de dibenzoilmetano (como el butil metoxidibenzoilmetano comercializado en particular por DSM con el nombre comercial Parsol® 1789), los derivados de ácido cinámico (como el etilhexil metoxicinamato comercializado en particular por DSM con el nombre comercial Parsol® MCX), los salicilatos, los ácidos para-aminobenzoicos, los β-β'-difencilacrilatos, las benzofenonas, los derivados de benzilideno alcanfor, los fenilbenzimidazoles, las triazinas, los fenilbenzotriazoles y los derivados antranílicos; o los filtros inorgánicos, a base de óxidos minerales en forma de pigmentos o nanopigmentos, recubiertos o no, y en particular a base de dióxido de titanio o de dióxido de cinc; preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 30 %, mejor, de 0,5 a 20 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 50 - uno o más colorantes hidrosolubles tales como, por ejemplo, la sal disódica de amapola, la sal disódica del verde de alizarina, el amarillo de quinoleína, la sal trisódica de amaranto, la sal disódica de tartrazina, la sal monosódica de rodamina, la sal disódica de fucsina y la xantofila, preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 2 % en peso, con respecto al peso total de la composición;
- 55 - una o más cargas, en particular agentes matificantes o cargas con efecto flotador y en particular los polvos con efecto *soft-focus* (en español enfoque suave).
- 65 Por carga, es preciso comprender partículas incoloras o blancas, minerales o sintetizadas, laminares o no laminares, adaptadas para dar cuerpo o rigidez a la composición y/o suavidad, matización y uniformidad inmediata tras la

aplicación. Estas cargas pueden particularmente modificar, incluso ocultar las líneas por un efecto de camuflaje, o un efecto de difuminado.

5 Los agentes matificantes pueden seleccionarse entre los polímeros matificantes (en solución, en dispersión o en forma de partículas) y las partículas inorgánicas que reducen el brillo de la piel y unifican el rostro. El agente matificante podrá seleccionarse particularmente entre un almidón, talco, microperlas de celulosa, fibras vegetales, fibras sintéticas, en particular poliamidas (polvos de Nylon® tales como Nylon-12 (Orgasol® comercializado por la compañía Atochem), microesferas de copolímeros acrílicos particularmente de poli(met)acrilato de metilo (partículas PMMA o partículas Micropearl® M310 comercializadas por la compañía Seppic), los polvos de silicio, los polvos de resina de silicona, los polvos de polímeros acrílicos, los polvos de polietileno, los organopolisiloxanos reticulados elastoméricos (comercializados particularmente con la denominación KSG® por la compañía Shin-Etsu, con la denominación Trefil®, BY29® o EPSX® por la compañía Dow Corning o con la denominación Gransil® por la compañía Grant Industries), polvos compuestos de talco/dióxido de titanio/aluminio/silicio, polvos de silicatos y sus mezclas.

15 La carga con efecto “*soft focus*” (enfoque suave), puede dar transparencia al rostro y un efecto difuminado. Preferentemente, las cargas “*soft focus*” tienen un tamaño medio de partículas inferior o igual a 30 micras, más preferentemente inferior o igual a 15 micras. Estas cargas “*soft focus*” pueden tener cualquier forma y en particular pueden ser esféricas o no esféricas. También pueden seleccionarse entre los polvos de silicio y silicatos particularmente de aluminio, polvos de tipo polimetil metacrilato (PMMA o Micropearl® M310), talco, compuestos de sílice /TiO₂ o silicio/óxido de cinc, polvos de polietileno, polvos de almidón, polvos de poliamidas, polvos de copolímeros de estireno/acrílico, elastómeros de silicona y sus mezclas.

20 Preferentemente estos agentes matificantes o cargas con efecto soft-focus se utilizan a razón de 0,1 a aproximadamente 10 % en peso, con respecto al peso total de la composición, preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 7 % en peso.

30 Uno o más pigmentos blancos o con color, nacarados o no, minerales y/u orgánicos, recubiertos o no, insolubles en el medio, tienen por objeto dar color y/u opacificar la composición. También pueden tener un tamaño normal o nanométrico. Se pueden citar, entre los pigmentos minerales, el dióxido de titanio, opcionalmente tratado en la superficie, los óxidos de hierro o de cromo, el violeta de manganeso, el azul ultramar, el hidrato de cromo y el azul férrico. Entre los pigmentos orgánicos, se pueden citar el negro de carbono, los pigmentos de tipo D y C, y las lacas a base de carmín de cochinilla, bario, estroncio, calcio, aluminio. Los pigmentos nacarados o nácares son partículas irisadas que reflejan la luz. Estos pigmentos nacarados pueden seleccionarse entre los pigmentos nacarados blancos tales como la mica revestida de titanio o de oxiclورو de bismuto, pigmentos nacarados con color tales como la mica revestida de titanio con óxidos de hierro. Los pigmentos pueden haber experimentado un tratamiento en la superficie. Preferentemente, estos pigmentos se utilizan a razón de 0,1 a aproximadamente 10 % en peso, con respecto al peso total de la composición, preferentemente a razón de 0,1 a aproximadamente 5 % en peso.

40 - uno o más agentes tensores. Por agente tensor, se entiende un compuesto adaptado a tensar la piel y, por efecto de tensión, alisar la piel y hacer disminuir incluso hacer desaparecer de manera inmediata las arrugas y las líneas. Como agentes tensores, se pueden citar los polímeros de origen natural; los silicatos mixtos; las partículas coloidales de cargas inorgánicas; los polímeros sintéticos; y sus mezclas. Se pueden citar particularmente: los polímeros de origen vegetal o microbiano, los polímeros obtenidos de faneras, las proteínas de huevo y látex de origen natural. Estos polímeros son preferentemente hidrófilos. Como polímeros de origen vegetal, se pueden citar en particular las proteínas y los hidrolizados de proteínas, y más particularmente los extractos de cereales, de leguminosas y de oleaginosas, tales como los extractos de maíz, de centeno, de trigo, de sarraceno, de sésamo, de escanda, de guisante, de tapioca, de haba, de lenteja, de soja y de altramuz. Otros agentes tensores que pueden aplicarse de acuerdo con la invención son los polisacáridos de origen natural, particularmente el almidón obtenido particularmente de arroz, de maíz de tapioca, de patata, de mandioca, de guisante; los carragenanos, las gomas de acacia (goma arábiga), alginatos, agares, gelanos, gomas xantanas, polímeros celulósicos y pectinas, ventajosamente en dispersión acuosa de micropartículas de gel, los derivados celulósicos y sus mezclas. Los polímeros sintéticos se presentan generalmente en forma de un látex o de un pseudolátex y pueden ser de tipo policondensado u obtenerse por polimerización radical. Particularmente pueden citarse las dispersiones de poliéster/poliuretano y de poliéter/poliuretano. Preferentemente, el agente tensor es un copolímero de PVP/dimeticonilacrilato y de poliuretano hidrófilo (Aquamere® S-2011® de la compañía Hydromer).

60 - uno o más conservantes;
- secuestrantes tales como las sales de EDTA;
- perfumes;
65 - y sus mezclas.

Se citan ejemplos de dichos aditivos particularmente el diccionario CTFA (International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook publicado por The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, undécima edición, 2006) que describe una gran variedad, sin limitación, de ingredientes cosméticos y farmacéuticos habitualmente utilizados en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para utilizarse como ingredientes adicionales en las composiciones de acuerdo con la presente invención.

El experto en la materia podrá seleccionar, entre el conjunto de estos aditivos opcionales, tanto la composición como la cantidad de los mismos que se añadirán a la composición, de tal manera que se conserve el conjunto de sus propiedades.

Además, la composición de acuerdo con la presente invención puede contener opcionalmente diversos agentes activos que pueden seleccionarse del grupo constituido por vitaminas, antioxidantes, agentes hidratantes, agentes anticontaminantes, agentes queratolíticos, astringentes, antiinflamatorios, agentes blanqueantes y agentes que favorecen la microcirculación.

Como ejemplos de vitaminas se incluyen las vitaminas A, B1, B2, B6, C y E y sus derivados, el ácido pantoténico y sus derivados y la biotina.

Como ejemplos de antioxidantes se incluyen el ácido ascórbico y sus derivados, tales como el palmitato de ascorbilo, el tetraisopalmitato de ascorbilo, el ascorbil glucósido, el ascorbil fosfato de magnesio, el ascorbil fosfato de sodio y el sorbato de ascorbilo; el tocoferol y sus derivados, tales como el acetato de tocoferol, el sorbato de tocoferol y otros ésteres de tocoferol; el BHT y BHA; los ésteres del ácido gálico, el ácido fosfórico, el ácido cítrico, el ácido maleico, el ácido malónico, el ácido succínico, el ácido fumárico, la cefalina, el hexametáfosfato, el ácido fítico y sus extractos de plantas, por ejemplo, raíces de *Zingiber officinale* (jengibre) tal como el jengibre azul malgache comercializado por la compañía BIOLANDES, de *Chondrus crispus*, de *Rhodiola*, *Thermus thermophilus*, la hoja de mate, la madera de roble, la corteza de *Rapet kayu*, las hojas de *Sakura* y las hojas de *ylang ylang*.

Como ejemplos de agentes hidratantes se incluyen el polietilenglicol, el propilenglicol, el dipropilenglicol, la glicerina, el butilenglicol, el xilitol, el sorbitol, el maltitol, los mucopolisacáridos, tales como el ácido condroitín sulfúrico, el ácido hialurónico de alto o bajo peso molecular o incluso el ácido hialurónico potencializado por un derivado de silanol tal como el activo Epidermosil® comercializado por la compañía Exymol, y el ácido mucoitinsulfúrico; el ácido carónico; las sales biliares, un componente principal del FHN (factor de hidratación natural) como una sal del ácido pirrolidón carboxílico y una sal de ácido láctico, un análogo de ácido aminado tal como la urea, la cisteína y la serina; un colágeno soluble de cadena corta, los PPG diglicerina, los homo y copolímeros de 2-metacrilolioxietilfosforilcolina como el Lipidure HM y el Lipidure PBM de NOF; la alantoína; derivados de glicerina tales como el PEG / PPG / polibutilen glicol-8/5/3 glicerina de NOF comercializado con la denominación comercial Wilbride® S753 o incluso el gliceril polimetacrilato de Sederma comercializado con la denominación comercial Lubragel® MS; la trimetilglicina comercializada con la denominación comercial Aminocoat® por la compañía Ashahi Kasei Chemicals y diversos extractos de plantas tales como los extractos de *Castanea sativa*, proteínas de avellana hidrolizadas, los polisacáridos de *Tuberosa polyanthes*, aceite de semilla de *Argania spinosa* y los extractos de nácar que contienen una conquiolina que se comercializan particularmente por la compañía Maruzen (Japón) con el nombre comercial Pearl Extract®.

Otros ejemplos de agentes hidratantes incluyen los compuestos estimulantes de la expresión de la matriptasa MT/SP1, tal como un extracto de la pulpa de algarrobo, así como agentes estimulantes de la expresión de FN3K; los agentes que aumentan la proliferación o la diferenciación de los queratinocitos tales como los extractos de *Thermus thermophilus* o de flor de *Camellia japonica Alba Plena* o de cáscaras de granos de *Theobroma cacao*, los extractos hidrosolubles de maíz, los extractos peptídicos de *Voandzeia subterranea* y la niacinamida; los lípidos epidérmicos y los agentes que aumentan la síntesis de lípidos epidérmicos, bien directamente, bien estimulando determinadas β -glucosidasas que modulan la desglucosilación de precursores lipídicos como la glucosilceramida en ceramidas, tales como los fosfolípidos, las ceramidas, los hidrolizados de proteína de altramuç.

Como ejemplos de agentes anticontaminantes se incluyen el extracto de granos de *Moringa pterygosperma* (por ejemplo, el Purisoft® de LSN); el extracto de manteca de karité (por ejemplo, Detoxyl® de Silab), una mezcla de extracto de hiedra, de ácido fítico, de extracto de grano de girasol (por ejemplo, el Osmopur® de Sederma).

Como ejemplos de agentes queratolíticos se incluyen los α -hidroxiácidos (por ejemplo, los ácidos glicólico, láctico, cítrico, málico, mandélico o tártrico) y los β -hidroxiácidos (por ejemplo, el ácido salicílico) y sus ésteres, tales como los alquil lactatos C12-13 y los extractos de plantas que contienen estos hidroxiácidos, tales como los extractos de *Hibiscus sabdriffa*.

Como ejemplos de agentes anti-inflamatorios se incluyen el bisabolol, la alantoína, el ácido tranexámico, el óxido de cinc, el óxido de azufre y sus derivados, el sulfato de condroitina, el ácido glicirizínico y sus derivados tales como los glicirizinatatos.

Como ejemplos de astringentes se incluyen los extractos de *hamamelis*.

Como ejemplos de agentes blanqueantes se incluyen la arbutina y sus derivados, el ácido ferúlico (tal como el Cytovector®: agua, gicol, lecitina, ácido ferúlico, hidroxietilcelulosa, comercializado por BASF) y sus derivados, el ácido kójico, el resorcinol, el ácido lipoico y sus derivados tal como el monolipoato de diacetato de resveratrol tal como se describe en la solicitud de patente WO2006134282, el ácido elágico, el leucodopacromo y sus derivados, la vitamina B3, el ácido linoleico y sus derivados, las ceramidas y sus homólogos, un péptido tal como se describe en la solicitud de patente WO2009010356, un bioprecursor tal como se describe en la solicitud de patente WO2006134282 o una sal de tranexamato tal como la sal de clorhidrato de tranexamato cetílico, un extracto de regaliz (extracto de *Glycyrrhiza glabra*), que comercializa particularmente la compañía Maruzen con el nombre comercial Licorice extract®, un agente blanqueante que también tenga un efecto antioxidante, como los compuestos de vitamina C y que comprende las sales de ascorbato, los ésteres de ascorbilo de ácidos grasos o de ácido sórbico y de otros derivados del ácido ascórbico, por ejemplo, los fosfatos de ascorbilo, tales como el magnesio de ascorbil fosfato y el sodio ascorbil fosfato, o los ésteres de sacárido de ácido ascórbico, que incluyen, por ejemplo, el arcorbil-2-glucósido, el L-ascorbato de 2-O-alfa-D-glucopiranosilo, o el L-ascorbato de 6-O-beta-D-galactopiranosilo. Un agente activo de este tipo lo comercializa en particular la compañía DKSH con el nombre comercial Ascorbyl glucoside®.

Como ejemplos de agentes que favorecen la microcirculación se incluyen un extracto de altramuz (tal como el Eclaline® de Silab), de rusco, de castaño de Indias, de hiedra, de ginseng o de meliloto, la cafeína, el nicotinato y sus derivados, un extracto de alga de *Corallina officinalis* tal como el comercializado por CODIF; y sus mezclas. Estos agentes activos sobre la microcirculación cutánea pueden utilizarse para evitar la pérdida de brillo del rostro y/o mejorar la homogeneización y el brillo del rostro.

La composición utilizada de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente, además del polipéptido de acuerdo con la invención, al menos un activo seleccionado entre: los agentes que estimulan la expresión de la tensina 1 tal como un extracto de elemi; los agentes estimulantes de la expresión de la FN3K y/o de la FN3K RP tal como un extracto de *Butea frondosa*; los agentes que estimulan la expresión de CERT o de ARNT2; los agentes que estimulan la producción de factores de crecimiento; los agentes antiglicación o desglucantes, los agentes que aumentan la síntesis de colágeno o que previenen su degradación (agentes anticlagenasas, particularmente inhibidores de metaloproteinasas de la matriz) en particular los agentes que aumentan la síntesis de colágeno IV y/o de hialuronato y/o de fibronectina, tal como al menos un oligopéptido acilado, particularmente el comercializado por la compañía SEDERMA con la denominación comercial Matrixyl® 3000; los agentes que aumentan la síntesis de elastina o que previenen su degradación (agentes antielastasas); los agentes que aumentan la síntesis de glucosaminoglicanos o proteoglicanos o que previenen su degradación (agentes antiproteoglicanasas) tal como el activo Epidermosil® (ácido hialurónico asociado a metilsilanotriol) comercializado por la compañía Exsymol; los agentes que estimulan la síntesis de integrinas por los fibroblastos; los agentes que aumentan la proliferación de fibroblastos; los agentes que facilitan la absorción percutánea tales como los alcoholes, los alcoholes grasos y los ácidos grasos y sus derivados de éster o de éter, las pirrolidonas, los 4-alkil-oxazolidín-2-onas tal como la 4-decicloxazolidín-2-ona; los terpenos, los aceites esenciales y los α -hidroxácidos; y sus mezclas, sin que esta lista no sea limitativa.

La invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos no limitativos.

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación del ADN complementario que codifica LCE6A y la síntesis por ingeniería genética del polipéptido LCE6A

La demandante ha clonado el ADN complementario (ADNc) que codifica la LCE6A humana, y ha producido en forma recombinante bacteriana la proteína LCE6A en fusión con la glutatión S transferasa (GST).

Protocolo:

1- Clonación del ADN complementario que codifica la LCE6A humana

La solicitante ha obtenido ADN producidos a partir de una fracción enriquecida en queratinocitos granulosa humanos, como se describe en los trabajos previamente publicados (Toulza *et al.*, Large scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function, Genome Biology 2007, 8: R107). Estos ADNc se utilizaron para clonar el ADN que codifica la LCE6A por amplificación en cadena de la polimerasa (en inglés PCR por "polymerase chain reaction") usando los cebadores 5'atgtcacagcagaagcagca3' y 5'gtcgccttcacactctcctc3'. El producto de la PCR, de un tamaño de 240 pares de bases, se introdujo en el vector pCR®2.1-TOPO® utilizando el kit de clonación TOPO TA Cloning® (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionó un clon positivo y se denominó pCR2.1-TOPO-LCE6A. El plásmido pCR2.1-TOPO-LCE6A se digirió con la enzima de restricción EcoRI, y el fragmento correspondiente al ADNc de LCE6A de 258 pares de bases se purificó y se

subclonó en el vector de expresión procariota pGEX6P1 (GE Healthcare) digerido por EcoRI. El cribado dirigido de los clones obtenidos ha permitido seleccionar un clon denominado pGEX6P1-LCE6A.

2- Síntesis por ingeniería genética del polipéptido LCE6A

5 Se transformaron bacterias *E. coli* BL21-CodonPlus®-DE3-RIL (Stratagene) con el plásmido pGEX6P1- LCE6A y la producción de la proteína LCE6A recombinante se realizó de la siguiente manera: las bacterias transformadas se cultivaron una noche con agitación a 250 rotaciones por minuto (rpm) a 37 °C en 10 ml de medio LB-ampicilina-cloramfenicol (NaCl 10 g/l, triptona 10 g/l, extracto de levadura 8 g/l, ampicilina 100 mg/l, cloranfenicol 50 mg/ml, pH 7). Este cultivo se utilizó al día siguiente para sembrar 500 ml de medio LB-ampicilina-cloramfenicol y proseguir el cultivo durante aproximadamente 2 h, hasta obtener una densidad óptica de 600 nm del cultivo comprendida entre 0,6 y 0,8. La producción de la proteína recombinante LCE6A fusionada con la glutatión S transferasa (GST) en su extremo N terminal (denominado en adelante GST-LCE6A) se indujo después prolongando el cultivo durante 4 h en presencia de isopropil tio-β-D-galactósido (IPTG) 0,1 mM. El cultivo bacteriano se colocó después en hielo durante 10 minutos, después se centrifugó durante 10 minutos a 6.000 rpm a +4 °C. Después de la eliminación del sobrenadante, el sedimento se almacenó como mínimo 12 h a -20 °C.

20 El lisado bacteriano se obtiene de la siguiente manera: el sedimento bacteriano se suspende en 50 ml de tampón de solubilización (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, con adición de 100 µl de cóctel de inhibidores de proteasas bacterianas (P8465, Sigma)), después se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 rpm a +4 °C. El sobrenadante se elimina y el sedimento se suspende en 50 ml de tampón de solubilización. Se añaden 5 ml de lisozima a 100 mg/ml y se incuba durante 15 minutos en hielo. A continuación, se añaden 500 µl de ditiotreitól 1 M y 7,75 ml de sarcosil 10 %, se mezcla por inversión y la suspensión se somete a ultrasonido (alterador de células ultrasónico XL2000, Misonix) 3 veces durante 20 segundos, y de vuelta al hielo durante 5 minutos entre cada tratamiento ultrasónico. A continuación, el lisado se centrifuga durante 30 minutos a 10.000 rpm a +4 °C. El sobrenadante se recupera y se añaden 20 ml de Triton-X-100 al 10 % y 16,75 ml de tampón de solubilización. La lisis finaliza con una incubación de esta solución durante 30 minutos con agitación suave a una temperatura ambiente, y después el lisado se filtra (poros de 0,45 µm de diámetro).

30 La GST-LCE6A se purifica de este lisado bacteriano por afinidad sobre una columna "glutatión-sefarosa 4 de flujo rápido (*fast flow*)" (2,5 ml de matriz) (GE-Healthcare Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. El filtrado se deposita en la columna y la fracción no retenida se elimina. La columna se lava con 40 ml de tampón "solución salina tamponada con fosfato" (PBS) (KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 0,9 mM, pH 7,4) y la elución se realiza depositando 8 ml de glutatión a 10 mM en tampón Tris 50 mM pH 8, después 4 ml de PBS. A la salida de la columna se recogen doce fracciones de elución de 1 ml. Una alícuota de 12,5 µl de cada una de estas fracciones se separa por electroforesis en condiciones desnaturalizantes con SDS-PAGE al 15 % ("electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS") y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia. Esta membrana se utiliza después para analizar, con el método denominado "*Western Blot*" (inmunotransferencia), la presencia de la proteína recombinante en las fracciones de elución. El anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal que reconoce la GST (mAb de ratón 26H1, Cell Signaling Technology) utilizado a 1/10000^e, el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (peroxidasa de rábano picante conjugada con anti IgG de ratón de cabra (H+L), Zymed) se utiliza a 1/10000^e y el revelado se realiza con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Las fracciones de elución que contienen la proteína recombinante bacteriana se reagrupan, se dializan contra 1.000 volúmenes de PBS usando budines de diálisis (MWCO (límite nominal de peso molecular) 3500) una noche a +4 °C con agitación. A continuación, el dializado se dosifica con el método de Bradford usando el kit "ensayo de proteína BioRad" (BioRad).

El promedio del rendimiento es 3 mg de proteína recombinante por 500 ml de cultivo bacteriano.

50 **Ejemplo 2: Estudio de la expresión y de la localización de la proteína LCE6A en la epidermis humana normal**

Protocolo:

1. Producción y purificación de antisuero de conejo que reconoce específicamente la proteína LCE6A:

55 Después de analizar la secuencia primaria de la proteína LCE6A, la solicitante ha elegido el polipéptido de 15 aminoácidos CHSSSRPEVQKPRR, que corresponde a los restos 42 a 56 de LCE6A, no homólogo a las otras proteínas de la familia LCE, denominado en lo sucesivo en el presente documento SEQ ID N° 6. Este polipéptido se ha producido y utilizado para inmunizar a dos conejos (4 inyecciones sucesivas la semana 1, 4, 7 y 9). El antisuero se extrajo la undécima semana. Estas etapas las realizó la compañía Génosphère Biotechnologies. Después, la Solicitante purificó por afinidad el suero contra el péptido. Para esto, el polipéptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 6 se inmovilizó en perlas de agarosa usando el kit Sulfolink® (Pierce). Las perlas se incubaron con 10 ml de antisuero diluido a 1/2 en tampón de carga «tampón de unión Ag/Ab moderada, *Gentle Ag/Ab binding buffer*» (Pierce) durante 1 h a una temperatura ambiente con una agitación suave. Las perlas se sedimentaron sobre la columna y el líquido no retenido se eliminó. La columna se lavó con 25 ml de tampón de carga al que se añadió NaCl 0,5 M, después 5 ml de tampón de carga. El suero contra el péptido LCE6A se eluyó

depositando en la columna 9 ml de tampón de elución «*Gentle Ag/Ab elution buffer*» (Pierce) y la reactividad de cada una de las 9 fracciones de elución se analizó por «transferencia de Western» sobre la proteína recombinante GST-LCE6A. La incubación se realizó con una alícuota de cada una de las fracciones de elución diluida a 1/50^e, después con un anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de conejo acoplado a peroxidasa diluido a 1/10000^e (Zymed). El revelado se realizó con el kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Las fracciones que presentaban la reactividad más fuerte contra la proteína recombinante se reagruparon y dializaron contra 1.000 volúmenes de tampón TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6) usando budines de diálisis (MWCO 3500) una noche a +4 °C con agitación. El dializado se concentró aproximadamente 20 veces por ultrafiltración (Vivaspin 15R, 30000 MWCO, Vivascience). El dializado concentrado, correspondiente al antisuero purificado, se tituló sobre la proteína recombinante por «transferencia de Western». Se reconocen 100 ng de GST-LCE6A hasta una dilución de 1/2000^e.

2. Detección de la proteína LCE6A por inmunohistología:

La expresión y la localización de la proteína LCE6A en la epidermis humana normal se analizó por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia usando suero contra el péptido LCE6A. Se fijaron muestras de piel abdominal humana normal en formol durante 24 h y se incluyeron en parafina. La inmunodetección se realizó en las secciones después del desmarcado del antígeno por incubación durante 40 minutos con glicina-HCl 50 mM, pH 3,5 a 95 °C.

En los experimentos de inmunohistoquímica, la inmunodetección se realizó con el kit «Impress rabbit» (Vector Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el suero contra el péptido LCE6A diluido a 1/250^e.

En los experimentos de inmunofluorescencia, se realizó un doble marcado usando suero contra el péptido LCE6A diluido a 1/100^e y un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la (pro)filagrina (AHF3, Simon *et al.*, J Invest Dermatol 1995, 105 :432) diluido a 1/1000^e. Los anticuerpos secundarios son inmunoglobulinas anti inmunoglobulina de ratón acopladas a AlexaFluor488 e inmunoglobulinas anti inmunoglobulina de conejo acopladas a AlexaFluor555 (Invitrogen), utilizadas a 1/1000^e.

Resultados:

El marcado obtenido por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia con el suero contra el péptido LCE6A apareció tardíamente durante la diferenciación epidérmica, en la transición de la capa granulosa / capa córnea y en la parte basal de la capa córnea. La comparación de los marcados obtenidos con el suero contra el péptido LCE6A y el anticuerpo monoclonal contra la (pro)filagrina en inmunofluorescencia, ha permitido poner de manifiesto que las dos proteínas, la LCE6A y la filagrina, se expresan a nivel de la capa granulosa y basal de la capa córnea de la epidermis humana.

Ejemplo 3: Estudio de la expresión y de la localización de la proteína LCE6A en la epidermis humana sorriásica

Protocolo:

1. Antisuero de conejo que reconoce específicamente la proteína LCE6A:

El antisuero de conejo utilizado, que reconoce específicamente la proteína LCE6A humana, es el mismo que el de la producción y purificación que se describen en el ejemplo 2.

2. Detección de la proteína LCE6A por inmunohistología:

La expresión y la localización de la proteína LCE6A en la epidermis humana normal se analizó por inmunofluorescencia indirecta usando suero contra el péptido LCE6A. Las muestras provienen de piel abdominal humana normal o de lesiones sorriásicas previamente extraídas de 15 individuos con soriasis. Estas muestras de piel se criofijaron y conservaron a - 80 °C. Se realizaron criosecciones, se secaron al aire libre durante aproximadamente 2 horas, se fijaron con acetona durante 10 minutos y después se conservaron a -80 °C. La inmunodetección se realizó por inmunofluorescencia sobre las secciones después del desmarcado del antígeno por incubación durante 20 minutos en la solución «*target retrieval solution pH 9*, en español solución de recuperación de diana a pH 9» (Dako) a 95 °C. Es suero contra el péptido LCE6A se utilizó a una dilución de 1/250^e. El anticuerpo secundario es una inmunoglobulina anti inmunoglobulina de conejo acoplada a AlexaFluor555 (Invitrogen), utilizada a 1/1000^e.

Resultados:

La observación de las secciones de piel con lesiones procedentes de 15 individuos con soriasis, muestra una disminución importante de la expresión de LCE6A en la capa granulosa y la basal de la capa córnea de la epidermis en comparación con la piel normal. Parece por tanto que esta patología, que presenta una profunda alteración de la proliferación y de la diferenciación de los queratinocitos, así como un problema importante de la función de la barrera epidérmica, presenta una cantidad de proteína LCE6A, expresada por el queratinocito granuloso después incorporada en la envoltura córnea, considerablemente reducida.

Ejemplo 4: Caracterización bioquímica y funcional de LCE6A – Ensayo de unión con transglutaminasas

La Solicitante ha realizado ensayos de unión con transglutaminasas *in vitro* usando la LCE6A recombinante que posee una etiqueta de histidina C-terminal (LCE-His).

1. Clonación de la proteína LCE6A-His y purificación:**Protocolo:**

Para clonar el ADNc que codifica la LCE6A-His, el ADNc de LCE6A se amplificó por PCR a partir del vector pGEX6P1 - LCE6A usando cebadores 5'catatgtcacagcagaagcagcaa3' y 5'ctcgaggtcgcccttcacactc3'. El producto de la PCR, de un tamaño de 248 pares de bases, se introdujo en el vector pCR2.1-TOPO® utilizando el kit de clonación TOPO TA Cloning® (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionó un clon positivo denominado pCR2.1-TOPO- LCE6A-Ndel-XhoI. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción Ndel y XhoI y el fragmento correspondiente al ADNc de LCE6A de 248 pares de bases se purificó y se subclonó en el vector de expresión procariota pET41b (Novagen) digerido por Ndel y XhoI. El cribado de los clones obtenidos ha permitido seleccionar un clon denominado pET41b- LCE6A-His.

Se transformaron bacterias de *E. coli* BL21-CodonPlus®-DE3-RIL (Stratagene) con el plásmido pET41b- LCE6A-His y la producción de la proteína recombinante se realizó de la siguiente manera: las bacterias transformadas se cultivaron durante una noche con agitación a 250 rpm a 37 °C en 10 ml de medio LB-kanamicina-cloramfenicol (NaCl 10 g/l, triptona 10 g/l, extracto de levadura 8 g/l, kanamicina 50 mg/l, cloramfenicol 50 mg/l, pH 7). Este cultivo se utilizó al día siguiente para sembrar 500 ml de medio LB-kanamicina -cloramfenicol y proseguir el cultivo durante aproximadamente 2 h, hasta obtener una densidad óptica a 600 nm del cultivo comprendida entre 0,6 y 0,8. La producción de la proteína recombinante LCE6A-His se indujo después prolongando el cultivo durante 4 h en presencia de isopropil tio-β-D-galactósido (IPTG) 0,1 mM. El cultivo bacteriano se puso después en hielo durante 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 6.000 rpm a +4 °C. Después de la eliminación del sobrenadante, el sedimento se conservó durante un mínimo de 12 h a -20 °C.

El lisado bacteriano se obtuvo de la siguiente manera: el sedimento bacteriano se suspendió en 100 ml de tampón de lisina (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8, lisozima 0,1 mg/ml, con adición de 100 µl de cóctel de inhibidores de proteasas bacterianas (P8465, Sigma)) y se incubó durante hora y media con agitación suave a +4 °C. El lisado se sometió a ultrasonido (alterador celular ultrasónico XL2000, Misonix) 6 veces durante 5 segundos, de vuelta al hielo durante 5 minutos entre cada ultrasonido y después se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm a +4 °C. El sobrenadante se recuperó y se filtró (poros de 0,45 µm de diámetro) antes de la purificación por afinidad en una columna de níquel (1 ml de matriz) «His-Trap High Performance, en español alto rendimiento His-Trap» (Amersham Biosciences). La columna se equilibró con 10 volúmenes de tampón de lisis y después el lisado se cargó. El líquido no retenido se eliminó y la columna se lavó con 15 volúmenes de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8). La elución se realizó con 10 volúmenes de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 0,5 M, pH 8). La presencia de la proteína recombinante en las fracciones de elución se detectó por «transferencia de Western». El anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal contra cuatro His (IgG1 monoclonal de ratón «*Tetra-His antibody*, anticuerpo tetra His», Qiagen) utilizado a 1/2000^o, el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (anti IgG de ratón (H+L) de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante, Zymed) se utilizó a 1/10000^o y el revelado se realizó con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Las fracciones de elución que contenían la proteína recombinante bacteriana se reagruparon y se dializaron contra 1.000 volúmenes de PBS usando budines de diálisis (MWCO 3500) una noche a +4 °C con agitación. A continuación, el dializado se dosificó con el método de Bradford usando el kit «BioRad protein assay» (BioRad). El promedio del rendimiento es de 3 mg de proteína recombinante por 500 ml de cultivo bacteriano.

2. Ensayo de unión *in vitro* a la transglutaminasa 2 (TGM2):**Protocolo:**

Se realizó un ensayo de unión *in vitro* de LCE6A con la transglutaminasa 2 (transglutaminasa purificada de hígado de cobaya, Sigma T5398).

En un primer experimento, la Solicitante ha ensayado la capacidad de la TGM2 para formar puentes entre la LCE-His y una molécula portadora de un enlace amina, la monodansil-cadaverina (MDC). Para esto, se incubó TGM2 (10 ng/µl) en presencia de 0,35 µg de LCE6A-His en solución en un tampón de Tris 50 mM, DTT 100 mM, pH 7,4, al que se añadió CaCl₂ 10 mM y MDC 500 µM (Fluka). Después de la incubación durante 2 h o 18 h a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA a una concentración final de 25 mM. El control negativo corresponde al mismo experimento realizado en ausencia de CaCl₂ y en presencia de EDTA 100 mM después de incubación durante 18 h. El producto de la reacción se separó por SDS-PAGE al 15 % y después se visualizó con luz UV.

En un segundo experimento, la Solicitante también ensayó la capacidad de la TGM2 para formar puentes de la

LCE6A consigo misma. Para esto, la TGM2 (10 ng/μl) se incubó en presencia de 0,35 μg de LCE6A- His en un tampón de Tris 50 mM, DTT 100 mM, pH 7,4, al que se añadió CaCl₂ 10 mM. Después de incubación durante 2 h o 18 h a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA a una concentración final de 25 mM. El control negativo corresponde al mismo experimento realizado en ausencia de CaCl₂ y en presencia de EDTA 100 mM después de incubación durante 18 h. El producto de la reacción se separó por SDS-PAGE al 15 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Los enlaces intermoleculares se visualizaron mediante «Western Blot, transferencia Western» como se ha descrito anteriormente con un anticuerpo contra His (IgG 1 monoclonal de ratón «anticuerpo Tetra-His», Qiagen).

10 **Resultados:**

En el primer experimento, después de 2 h de incubación se detectaron varias bandas fluorescentes que migraban a la altura de la MDC libre (frente de migración), o de la LCE6A-His (aproximadamente 17 kDa). Otras bandas de más alto peso molecular, de débil intensidad, migraban al tamaño de dímeros o de multímeros de LCE6A-His. No se detectó ninguna banda fluorescente, salvo la correspondiente a la MDC libre, cuando se realizó el mismo experimento en presencia de EDTA 100 mM y en ausencia de calcio.

En el segundo experimento, el resultado del «Western Blot» mostró una banda de aproximadamente 17 kDa correspondiente a la LCE6A-His monomérica, y varias bandas de más alto peso molecular que migraban a un tamaño equivalente al de los dímeros o multímeros de LCE6A-His. Solo se detectó la banda correspondiente a la LCE6A-His monomérica cuando el experimento se realizó en las mismas condiciones, pero en ausencia de calcio y en presencia de EDTA 100 mM.

Por consiguiente, estos experimentos permiten confirmar que la proteína LCE6A es bien un sustrato de la transglutaminasa 2. La LCE6A se comporta a la vez como donante y como aceptora de restos de aminoácidos necesarios para la unión de ε-(γ-glutamínil)lisil con la transglutaminasa.

3. Ensayo de unión *in vitro* con la transglutaminasa 3 (TGM3):

Se realizó un ensayo de unión *in vitro* de LCE6A con la transglutaminasa 3 (transglutaminasa 3 humana recombinante, R&D Systems). Estos ensayos se realizaron siguiendo el mismo protocolo experimental que el descrito en el ejemplo 4, párrafo 2 con la transglutaminasa 2.

En un primer experimento, la Solicitante ha ensayado la capacidad de la TGM3 para formar puentes entre la LCE-His y la monodansil-cadaverina (MDC). Para esto, la TGM3 (10 ng/μl) se incubó en presencia de 0,35 μg de LCE6A-His en solución en un tampón DE Tris 50 mM, DTT 100 mM, pH 7,4, al que se añadió CaCl₂ 10 mM y MDC 500 μM (Fluka). Después de incubación durante 2 h o 18 h a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA a una concentración final de 25 mM. El control negativo corresponde al mismo experimento realizado en ausencia de CaCl₂ y en presencia de EDTA 100 mM después de incubación durante 18 h. El producto de la reacción se separó por SDS-PAGE al 15 % y después se visualizó con luz UV.

En un segundo experimento, la Solicitante ensayó la capacidad de la TGM3 para formar puentes de la LCE6A consigo misma. Para esto, la TGM3 (10 ng/μl) se incubó en presencia de 0,35 μg de LCE6A- His en un tampón de Tris 50 mM, DTT 100 mM, pH 7,4, al que se añadió CaCl₂ 10 mM. Después de incubación durante 2 h o 18 h a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA a una concentración final de 25 mM. El control negativo corresponde al mismo experimento realizado en ausencia de CaCl₂ y en presencia de EDTA 100 mM después de incubación durante 18 h. El producto de la reacción se separó por SDS-PAGE al 15 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Los enlaces intermoleculares se visualizaron mediante «Western Blot» como se describe anteriormente con un anticuerpo anti-His (IgG 1 monoclonal de ratón «Tetra-His antibody», Qiagen).

Resultados:

En el primer experimento, después de 2 h de incubación, se detectaron varias bandas fluorescentes que migraban a la altura de la MDC libre (frente de migración), o de la LCE6A-His (aproximadamente 17 kDa). Otras bandas de más alto peso molecular, de débil intensidad, migraban al tamaño de los dímeros o de los multímeros de LCE6A-His. No se detectó ninguna banda fluorescente, salvo la correspondiente a la MDC libre, cuando se realizó el mismo experimento en presencia de EDTA 100 mM y en ausencia de calcio.

En el segundo experimento, el resultado de la transferencia de Western muestra una banda de aproximadamente 17 kDa que corresponde a LCE6A-His monomérica, y varias bandas de más alto peso molecular que migran a un tamaño equivalente al de los dímeros o multímeros de LCE6A-His. Solo se detectó la banda correspondiente a la LCE6A-His monomérica cuando el experimento se realizó en las mismas condiciones, pero en ausencia de calcio y en presencia de EDTA 100 mM.

Por consiguiente, estos experimentos permiten confirmar que la proteína LCE6A es bien un sustrato de la transglutaminasa 3. La LCE6A se comporta a la vez como donante y como aceptora de restos de aminoácidos

necesarios para la unión de ϵ -(γ -glutaminil)lisil con la transglutaminasa. Las transglutaminasas 1, 3 y 5, que catalizan la misma reacción que la TGM2, están implicadas *in vivo* en la formación de la capa córnea y en la formación de enlaces isopeptídicos necesarios para la resistencia y la insolubilidad de la envoltura córnea. Por tanto, la LCE6A es *in vitro*, el sustrato de al menos una de las transglutaminasas implicadas *in vivo* en la formación de la envoltura córnea.

Ejemplo 5: Caracterización de la secuencia peptídica de LCE6A implicada en las uniones con las transglutaminasas

Protocolo:

Para determinar qué región de la proteína LCE6A era necesaria para la unión con las transglutaminasas, la Solicitante solicitó a la compañía MilleGen sintetizar diferentes polipéptidos, biotinilados en su extremo N terminal, de una longitud de 9 a 13 aminoácidos, correspondientes a diferentes regiones de la secuencia de aminoácidos de la LCE6A.

Estos polipéptidos se utilizaron en ensayos de unión *in situ*. Criosecciones de piel abdominal humana, saturadas por incubación en presencia de albúmina bovina al 1 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, se pusieron en presencia de Tris 100 mM (pH 7,4) que contenía 100 μ M de polipéptido biotinilado y 5 mM de CaCl_2 . Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo EDTA a 25 mM durante 5 minutos. Las secciones se incubaron después en PBS que contenía SDS al 1 % para destruir los enlaces no covalentes.

La presencia de polipéptidos biotinilados unidos a las envolturas córneas por las transglutaminasas presentes y activas en los tejidos se detectó por incubación de secciones con estreptavidina-AlexaFluor555 a 5 μ g/ml (Invitrogen) y visualización con el microscopio confocal.

Se realizó un control positivo en un experimento similar, pero incubando las secciones con 100 μ M de cadaverina acoplada a AlexaFluor555 (Invitrogen) en lugar de con polipéptidos. Para los controles negativos, las criosecciones se incubaron con cada polipéptido biotinilado o con la cadaverina acoplada a AlexaFluor555, pero la incubación se realizó en presencia de EDTA 100 mM y en ausencia de calcio.

Resultados:

El control positivo muestra un marcado del contorno de los queratinocitos granulados, que corresponde a la región de la sección donde se encuentran las transglutaminasas activas. Los polipéptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 3, 4 y 5 muestran un marcado similar al obtenido después de incubación con la cadaverina-AlexaFluor555, mientras no se obtuvo ningún marcado cuando se incubaron estos mismos polipéptidos o la cadaverina-AlexaFluor555 en presencia de EDTA y en ausencia de calcio. La incubación de secciones en presencia de calcio con el polipéptido RPAPPPISGGGYRAR, cuya secuencia no corresponde a ningún fragmento de LCE6A, no proporciona ningún marcado pericelular de los queratinocitos de la capa granulosa. Finalmente, el polipéptido MSQAKQSW (SEQ ID N° 7) que corresponde a la SEQ ID N° 3 mutada, y el polipéptido EVAKPRRARQALR (SEQ ID N° 8) que corresponde a la SEQ ID N° 5 mutada, no proporcionan ningún marcado pluricelular de los queratinocitos de la capa granulosa.

Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos SEQ ID N° 3, 4 y 5 contienen los restos necesarios para las transglutaminasas presentes en la capa granulosa de la epidermis humana para establecer los enlaces covalentes con la envoltura córnea. La pérdida de capacidad para unir las envolturas córneas de los polipéptidos correspondientes a las SEQ ID N° 1 y N° 3 mutadas sugiere que, para permitir esta unión, es necesario el encadenamiento de un resto de glutamina (Q) y de un resto de lisina (K) en la secuencia de la proteína LCE6A.

Ejemplo 6: Composición cosmética (suero H/E)

El experto en la materia puede preparar la siguiente composición de manera convencional. Las cantidades indicadas a continuación se expresan en porcentajes en peso. Los ingredientes en mayúsculas se identifican de acuerdo con la denominación del INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

Nombre INCI	% (peso/peso)
Agua	CSP 100,00
Agente quelante	0,05
Ajustador de pH	0,05
Conservante	0,05
Glicol	3,25
COPOLÍMERO DE ACRILOILDIMETILTAURATO DE AMONIO/VP	1,20
ACRILATOS/POLÍMERO RETICULADO DE ACRILATO DE ALQUILO C10-30	0,20
GLICERINA	3,00

ES 2 615 131 T3

GLICERILPOLIMETACRILATO	4,18
HIALURONATO SÓDICO ACETILADO	0,05
Aceite	10,00
ALCOHOL	8,00
PERFUMES	0,30
Polipéptido SEQ ID N° 4 obtenido según el ejemplo 4	0,05

Esta composición puede aplicarse diariamente, por la mañana y/o por la noche, en pieles particularmente deshidratadas y/o expuestas a agresiones ambientales, para mejorar su bienestar y uniformizar el rostro.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chanel parfums Beauté et Centre National de la Recherche Scientifique

10 <120> Polipéptido expresado en la capa córnea y su utilización

<130> BFF100137

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 641

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

acacaaggcc tccagactcc tcctgggata acttgtccac acatcttcca ctagggtaag      60
gctactttctg gctgaggaga cacttggatg tagctcaagt gctgcttagg cagtctctgat      120
ctctcctctc gtctcttccc agggagctga aaagccagat tcgacctggt agccaagcaa      180
tgtcacagca gaagcagcaa tcttggaaagc ctccaaatgt tcccaaatgc tcccctcccc      240
aaagatcaaa cccctgccta gctccctact cgactccttg tgggtgctccc cattcagaag      300
gttgtcattc cagttcccaa aggctgagg ttcagaagcc taggagggct cgtcaaaagc      360
tgcgctgcct aagtaggggc acaacctacc actgcaaaga ggaagagtgt gaaggcgact      420
gagcccagaa gagttgaggc acaggtgcag ttactctctc cotgccccac ctttgggtac      480
taattcccc ttgaaagcc aggcctcaa cctctcattt ggactgagaa acacttctctg      540
atccccagct ctagagaagc gagaactagg ctgagccacg ctgctactgc tctcttccat      600
tcacccttc agctcagcaa caataaagct gctttacttg g                                641
    
```

25 <210> 2

<211> 80

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 615 131 T3

Met Ser Gln Gln Lys Gln Gln Ser Trp Lys Pro Pro Asn Val Pro Lys
1 5 10 15

Cys Ser Pro Pro Gln Arg Ser Asn Pro Cys Leu Ala Pro Tyr Ser Thr
20 25 30

Pro Cys Gly Ala Pro His Ser Glu Gly Cys His Ser Ser Ser Gln Arg
35 40 45

Pro Glu Val Gln Lys Pro Arg Arg Ala Arg Gln Lys Leu Arg Cys Leu
50 55 60

Ser Arg Gly Thr Thr Tyr His Cys Lys Glu Glu Glu Cys Glu Gly Asp
65 70 75 80

5 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido diseñado en función de la homología con los restos de aminoácidos 1 a 9 de la proteína LCE6A
10 <400> 3

Met Ser Gln Ala Lys Gln Gln Ser Trp
1 5

15 <210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Péptido diseñado en función de la homología con los restos de aminoácidos 45 a 55 de la proteína LCE6A
<400> 4

Ser Ser Gln Arg Pro Glu Val Gln Lys Pro Arg
1 5 10

25 <210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> Péptido diseñado en función de la homología con los restos de aminoácidos 50 a 62 de la proteína LCE6A
35 <400> 5

Glu Val Gln Lys Pro Arg Arg Ala Arg Gln Lys Leu Arg
1 5 10

40 <210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
45 <223> Péptido diseñado en función de la homología con los restos de aminoácidos 42 a 56 de la proteína LCE6A

ES 2 615 131 T3

<400> 6

Cys His Ser Ser Ser Gln Arg Pro Glu Val Gln Lys Pro Arg Arg
1 5 10 15

5 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido mutado de SEQ ID NO°3

<400> 7

Met Ser Gln Ala Lys Gln Gln Ser Trp
1 5

15 <210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido mutado de SEQ ID N°5

25 <400> 8

Glu Val Ala Lys Pro Arg Arg Ala Arg Gln Ala Leu Arg
1 5 10

30

REIVINDICACIONES

1. Utilización cosmética de una cantidad eficaz de un polipéptido aislado, natural o sintético, que pertenece a la familia de proteínas tardías de la envoltura córnea (LCE), seleccionándose dicho polipéptido entre:

- los fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas; y
- los análogos de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que presentan al menos 80 % de homología con uno de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas,

para prevenir y/o tratar los signos de sequedad cutánea.

2. Utilización cosmética de una cantidad eficaz de un polipéptido aislado, natural o sintético, que pertenece a la familia de proteínas tardías de la envoltura córnea (LCE), seleccionándose dicho polipéptido entre:

- los fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos fragmentos al menos un dominio glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas; y
- los análogos de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que presentan al menos 80 % de homología con uno de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas,

para prevenir y/o tratar los signos de envejecimiento cutáneo.

3. Polipéptido aislado, natural o sintético, que pertenece a la familia de proteínas tardías de la envoltura córnea (LCE), seleccionándose dicho polipéptido entre:

- los fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos fragmentos al menos un dominio glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas; y
- los análogos de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que presentan al menos 80 % de homología con uno de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos análogos al menos un dominio glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas,

para su utilización para prevenir y/o tratar los trastornos tróficos cutáneos o los consecutivos a trastornos de la cicatrización.

4. Polipéptido aislado, natural o sintético, que pertenece a la familia de proteínas tardías de la envoltura córnea (LCE), seleccionándose dicho polipéptido entre:

- los fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas; y
- los análogos de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que presentan al menos 80 % de homología con uno de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas,

para su utilización para prevenir y/o tratar la disminución de la epidermis en particular de la capa córnea y/o tratar la fragilidad excesiva del revestimiento cutáneo y/o inducir el engrosamiento de la capa córnea.

5. Polipéptido aislado, natural o sintético, que pertenece a la familia de proteínas tardías de la envoltura córnea (LCE), seleccionándose dicho polipéptido entre:

- los fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, que tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos consecutivos, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos fragmentos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas; y
- los análogos de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2 que presentan al menos 80 % de homología con uno de dichos fragmentos de la secuencia SEQ ID N° 2, presentando dichos análogos al menos un dominio de glutamina (Gln) - lisina (Lys) que sirve de sustrato para las transglutaminasas,

para su utilización para tratar la hiperqueratosis, la xerosis, la ictiosis, la soriasis, las lesiones tumorales hiperqueratósicas benignas o malignas o la queratosis reactiva.

5 6. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado por que** el polipéptido es un fragmento con una longitud de al menos 7, preferentemente de al menos 9, y más particularmente de al menos 15 aminoácidos consecutivos.

10 7. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado por que** el polipéptido tiene una secuencia seleccionada entre SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, y sus mezclas.