(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 628 505**

(51) Int. CI.:

***G01N 33/68*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2007 PCT/FR2007/001887**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008 WO08068422**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2007 E 07870293 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2089720**

(54) Título: **Uso cosmético de una proteína de la familia de las ribonucleasas**

(30) Prioridad:

**17.11.2006 FR 0654965**
**12.12.2006 US 874257 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**03.08.2017**

(73) Titular/es:

**L'ORÉAL (100.0%)**
**14, rue Royale**
**75008 Paris, FR**

(72) Inventor/es:

**DONOVAN, MARK;**
**BERNARD, DOMINIQUE;**
**CASTIEL, ISABELLE y**
**CHAUSSADE, VÉRONIQUE**

(74) Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso cosmético de una proteína de la familia de las ribonucleasas

[0001] La presente invención se refiere al uso, en cosmética y en terapéutica, de por lo menos una proteína antimicrobiana de la familia de las ribonucleasas, la ribonucleasa 7, o de polipéptidos derivados de esta proteína, como marcador para la evaluación de un estado de la epidermis de una piel seca.

[0002] Entre sus numerosas funciones fisiológicas, la epidermis posee la de constituir una barrera a la vez biológica, física y química contra la invasión del organismo por los microorganismos.

[0003] Las propiedades de barrera física de la epidermis están particularmente ligadas a su organización estructural.

[0004] De este modo, la epidermis se divide convencionalmente en una capa basal de queratinocitos que constituye la capa germinativa de la epidermis, una capa denominada espinosa constituida por varias capas de células poliédricas y, finalmente, un conjunto de capas superiores denominadas capas córneas (o estrato córneo), constituidas por queratinocitos en la fase terminal de su diferenciación llamados corneocitos.

[0005] Las propiedades de barrera química de la epidermis dependen particularmente de la liberación en la superficie de ésta de numerosas proteínas antimicrobianas tales como las catelicidinas, la antileucoproteasa inhibidora de serina proteasa, la dermcidina o las proteínas de la familia de las ß-defensinas.

[0006] Muchos trastornos o patologías cutáneas o del cuero cabelludo pueden resultar de una disfunción de la organización estructural celular epidérmica, o de un defecto de la función de barrera química de la epidermis, como la sequedad cutánea, la psoriasis, las dermatitis atópicas, la ictiosis, la hiperqueratosis, las reacciones inflamatorias, provocadas por infecciones microbianas, o estados de descamación.

[0007] A día de hoy, solamente se dispone de pocos marcadores biológicos que permitan determinar de manera eficaz y precisa el estado de una epidermis y, particularmente, que permitan relacionar un trastorno cutáneo o del cuero cabelludo con una disfunción de sus funciones fisiológicas.

[0008] Sticherling et al. (J. Invest. Dermatol., 121,2003), Harder & Schroder (J. Leukoc. Biol., 77,2005: 476) y la solicitud WO 2004/028479 describen la identificación de ciertas proteínas en pieles procedentes de pacientes de psoriasis.

[0009] EP 0943679 y Haisch et al. (Arch. Dermatol. Res., 2004,295: 364) describen la expresión de proteínas antimicrobianas en los queratinocitos.

[0010] WO 00/73452 describe el uso de una selección de proteínas para el tratamiento de enfermedades asociadas al sistema inmunitario y a la inflamación, las cuales pueden incluir enfermedades de la piel.

[0011] Por lo tanto, existe una necesidad de disponer de marcadores biológicos que permitan caracterizar de manera precisa un estado de una epidermis.

[0012] También existe una necesidad de disponer de un marcador biológico que pueda ser utilizado de manera fiable en un procedimiento de diagnóstico de un trastorno cutáneo o del cuero cabelludo.

[0013] También existe una necesidad de identificar, en la epidermis, nuevos objetivos cosméticos o terapéuticos.

[0014] También existe una necesidad de disponer de nuevas herramientas de cribado de moléculas susceptibles de ejercer una acción cosmética o terapéutica sobre la epidermis o las materias queratínicas en general. En el contexto de la invención, por "epidermis" se entiende tanto la piel como el cuero cabelludo.

[0015] También existe una necesidad de disponer de nuevos compuestos cosméticos o terapéuticos utilizables para el tratamiento de trastornos cutáneos o del cuero cabelludo resultantes de las disfunciones citadas anteriormente.

[0016] La presente invención tiene por objeto satisfacer el conjunto de estas necesidades.

[0017] En el sentido de la presente invención, se entiende por las expresiones "agente modulador" o "compuesto químico o biológico, susceptible o capaz de modular la actividad biológica y/o la expresión y/o la interacción con un elemento de una matriz extracelular" cualquier compuesto susceptible o capaz de actuar, directamente o indirectamente, sobre al menos un polipéptido conforme a la invención, una secuencia de ácidos nucleicos que lo codifica, sobre un elemento de una vía de señalización intra o extracelular o de una vía metabólica que implica dicho polipéptido, sobre un elemento de matriz extracelular o sobre un elemento implicado en la regulación de la

transcripción y/o la traducción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido.

[0018] Tales agentes moduladores se describen de manera más particular a continuación.

[0019] Según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de evaluación de un estado de una epidermis de una piel seca que comprende al menos las etapas consistentes en:

a) determinar un contenido de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, o SEQ ID Nº 3, un análogo de éstas que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza, o ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido, en una muestra de epidermis, y
b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia, donde el estado de la epidermis se caracteriza por una determinación de que el contenido determinado en la etapa a) es de 5 a 10 veces inferior al valor de referencia.

[0020] El procedimiento se puede efectuar *in vitro* o *ex vivo*.

[0021] En el contexto de la invención, el término «cosmético» debe entenderse según la definición dada por la directiva 76/768/CEE, y en particular pretende designar composiciones o tratamientos destinados a ser aplicados sobre las materias queratínicas, por ejemplo la piel, las mucosas, el vello y el cabello, con el fin de limpiarlas, perfumarlas, modificar su aspecto, particularmente estético y/o protegerlas o mantenerlas en buen estado.

[0022] Así, la presente invención se basa de forma más particular en la identificación por los inventores de la ribonucleasa 7 como agente y/u objetivo cosmético o farmacéutico en el nivel de la capa córnea de la epidermis, así como en el nivel del folículo piloso.

[0023] En particular, esta identificación resulta de la observación inesperada según la cual la RNasa 7 se expresa diferencialmente en la capa córnea de una epidermis normal y joven y de una epidermis seca, en particular una epidermis madura.

[0024] Por lo tanto, como se extrae de los ejemplos presentados a continuación, los inventores han determinado el contenido de proteína RNasa 7, cuya secuencia de aminoácidos está representada por la secuencia SEQ ID Nº 5, en la epidermis de individuos jóvenes y de individuos de mayor edad, y particularmente de mujeres jóvenes no menopáusicas y de mujeres de mayor edad menopáusicas. Los inventores han observado de manera sorprendente que el contenido de esta proteína era más elevado en la epidermis de las mujeres jóvenes que en la epidermis de las mujeres de mayor edad, y también era más elevado en las epidermis normalmente hidratadas que en las epidermis secas.

[0025] Se sabe que un aumento de la sequedad cutánea se observa a menudo con la edad; sin embargo tales estados de sequedad cutánea también pueden manifestarse en sujetos jóvenes. En efecto, el estado de sequedad cutánea es un estado fisiológico que puede estar presente en sujetos jóvenes, sin ninguna causa patológica, al menos aparente. El origen de esta sequedad puede ser constitucional o adquirido. De este modo, muchos factores exteriores pueden provocar el desecamiento de la piel o agravar el estado de una piel ya seca. Entre estos factores se puede citar las condiciones climáticas difíciles, los rayos solares, la exposición a ciertos agentes químicos o terapéuticos (por ejemplo los retinoides). Esta sequedad se manifiesta habitualmente en una sensación de tirantez y/o de tensión. La piel está rugosa al tacto y aparece cubierta de escamas.

[0026] De manera inesperada, los inventores han constatado que la ribonucleasa 7 constituye un objetivo para actuar eficazmente sobre estos trastornos cutáneos.

[0027] Ls ribonucleasa 7 (RNasa 7) es una endonucleasa que pertenece a la familia de las ribonucleasas y, particularmente, a la superfamilia A, que actualmente cuenta con trece miembros (Cho et al., Genomics, 2005,85:208-220).

[0028] Las ribonucleasas son enzimas hidrolíticas capaces de escindir enlaces nucleotídicos.

[0029] La RNasa 7 presenta en particular una actividad antimicrobiana.

[0030] Las ribonucleasa 7 fue identificada y localizada por HARDER & SCHROEDER (J. Biol. Chem., 2002,277: 46779-46784) en el estrato córneo de la epidermis y a partir de cultivos primarios de queratinocitos. Estos últimos también demostraron que esta proteína estaba dotada de propiedades antimicrobianas.

[0031] La RNasa 7 se sintetiza en forma de una proproteína de 156 aminoácidos (SEQ NO 4) con un sitio catalítico de tipo ribonucleasa pancreática y un péptido señal de 28 aminoácidos en el extremo N-terminal (SEQ NO 6).

La eliminación del péptido señal lleva a la generación de una enzima activa de 128 aminoácidos (proteína SEQ NO 5).

[0032] En el sentido de la presente invención, por RNasa 7 se pretende designar de manera general, excepto cuando se indique lo contrario, la forma proproteína (SEQ ID Nº 4), y la forma proteína (SEQ ID Nº 5).

Polipéptido según la invención

[0033] Según una forma de realización, un polipéptido conveniente para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada totalmente o en parte por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, o SEQ ID Nº 3, un análogo de ésta que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza.

[0034] Según una forma de realización particular, un polipéptido conveniente para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos representada totalmente o en parte por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 6, o SEQ ID Nº 7, o un análogo de ésta que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza.

[0035] Por "análogo de un polipéptido" se pretende designar cualquier polipéptido que presente una homología de secuencia, en particular frente a una de las secuencias características de dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza, llevada por ejemplo por secuencias peptidomiméticas.

[0036] La homología puede ser de por lo menos 85%, por ejemplo de por lo menos 90%, y por ejemplo de por lo menos 95 %. La homología se puede determinar por comparación visual o por cualquier medio informático habitualmente utilizado en el dominio.

[0037] La homología de secuencia puede resultar de modificaciones causadas por mutaciones o de variaciones en las secuencias de los péptidos según la invención, provenientes ya sea de la eliminación de uno o varios aminoácidos o de la inserción de uno o varios aminoácidos, o incluso de la sustitución de uno o varios aminoácidos en las secuencias características de los polipéptidos según la invención.

[0038] Por "secuencia característica del polipéptido", se hace referencia particularmente a la RNasa 7, la proproteína (SEQ ID Nº 4), la proteína activa (SEQ ID Nº 5), el péptido señal (SEQ ID Nº 6), el sitio activo que comprende los aminoácidos en la posición 43 y 151, y que comprende, según el caso, los aminoácidos que rodean estos aminoácidos, a razón, por ejemplo, de 1, incluso de 2, incluso de 3, incluso de 4, incluso de 5, incluso de 6, incluso de 7, incluso de 8 aminoácidos a ambas partes del sitio activo, los sitios de unión del substrato representado por la secuencia de aminoácidos 66 a 70 y el aminoácido en la posición 91, y que comprende, según el caso, los aminoácidos a ambas partes de este sitio de unión, a razón, por ejemplo, de 1, incluso de 2, incluso de 4, incluso de 8 aminoácidos a ambas partes de estos sitios, así como la secuencia SEQ ID Nº 7, que representa un epítopo derivado de la RNasa 7.

[0039] De manera general, los análogos polipeptídicos pueden comprender sustituciones conservadoras con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural.

[0040] Varias de estas modificaciones se pueden combinar.

[0041] Como ejemplo de mutaciones que se pueden considerar en la presente invención, se puede mencionar la sustitución de uno o varios residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos que tienen un índice hidropático similar sin afectar no obstante de manera sustancial a las propiedades biológicas del polipéptido y, particularmente, a su actividad biológica, por ejemplo a su actividad de ribonucleasa.

[0042] El índice hidropático es un índice atribuido a los aminoácidos en función de su hidrofobicidad y de su carga (Kyte y Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157: 105).

[0043] Un polipéptido o análogo igualmente previsto por la presente invención puede ser un polipéptido que ha sufrido una o varias modificación(es) post-traduccional(es).

[0044] Por "modificación(es) post-traduccional(es)", se pretende englobar el conjunto de las modificaciones que un péptido o una proteína es susceptible de sufrir tras su síntesis en una célula, tal y como por ejemplo una o varias fosforilación(es), una o varias glicosilación(es), una o varias lipidación(es), tales como una farnesilación o una palmitoilación, un reordenamiento estructural de tipo formación de puentes disulfuros y/o división dentro de la secuencia peptídica.

[0045] El análogo puede, además, presentar sustancialmente la misma actividad biológica que el polipéptido natural.

[0046] Según una forma de realización, un polipéptido que conviene para la realización de la invención también puede ser un polipéptido natural o sintético, según el caso susceptible de ser obtenido después de proteólisis de la RNasa 7 o por síntesis química o biológica o por extracción de un tejido biológico, como por ejemplo la piel, que exprese este polipéptido de manera natural o después de una transducción, así como las distintas formas post-traduccionales de éste, o incluso cualquier polipéptido natural o sintético cuya secuencia comprenda totalmente o parcialmente (en total o en parte) una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, por ejemplo las variantes y los análogos.

[0047] Según otra forma de realización, un polipéptido que conviene para la realización de la invención también puede ser un polipéptido como se ha definido previamente fusionado con otro polipéptido, un agente de direccionamiento hidrófilo o hidrófobo, un precursor de bioconversión, un agente de marcaje luminescente, radioactivo o colorimétrico.

[0048] De manera no limitativa, se puede citar como ejemplo de compuestos susceptibles de ser acoplados a un polipéptido conforme a la invención las proteínas fluorescentes como la proteína verde fluorescente o "Green Fluorescent Protein", los compuestos químicos fluorescentes tales como la rodamina, la fluoresceína, o el Texas Red, los compuestos fosforescentes, los elementos radioactivos, tales como $^{3}$H, $^{35}$5,$^{121}$I o $^{125}$I, o agentes de marcaje colorimétricos como los substratos cromógenos sensibles a la acción de la galactosidasa, de la peroxidasa, de la cloranfenicol acetiltransferasa, de la luciferasa o de la fosfatasa alcalina.

[0049] Según la naturaleza de los compuestos susceptibles de ser acoplados a un polipéptido conforme a la invención, el acoplamiento se puede llevar a cabo a través de procedimientos químicos, particularmente mediante funciones químicas reactivas o a través de procedimientos de biología molecular conocidos por el experto en la técnica.

Ácido nucleico según la invención

[0050] En el sentido de la presente invención, por "fragmento de secuencia de ácidos nucleicos" se entiende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido conforme a la invención, o un análogo de ésta que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza, y en particular una secuencia de ácidos nucleicos elegida de entre SEQ ID Nº 1 (que codifica la forma proproteína), SEQ ID Nº 2 (que codifica la forma proteína activa), SEQ ID Nº 3 (que codifica el péptido señal), un análogo de ésta, o un fragmento de ésta.

[0051] Por "análogo de una secuencia de ácidos nucleicos" se pretende designar cualquier secuencia de ácidos nucleicos, que resulte eventualmente de la degeneración del código de los ácidos nucléicos, y que codifique una secuencia de un polipéptido idéntica o análoga a la secuencia del polipéptido codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

[0052] Una secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención puede ser una secuencia sentido, anti-sentido o interferencial correspondiente a una secuencia que codifica un polipéptido conforme a la invención.

[0053] Las secuencias de ácidos nucleicos según la invención pueden utilizarse particularmente para preparar secuencias de ácidos ribonucleicos correspondientes, sentido o antisentido.

[0054] Una secuencia de ácidos nucleicos conveniente para la invención puede ser particularmente tal y como se ha definido previamente.

[0055] Según una forma de realización, una secuencia de ácidos nucleicos puede representar una secuencia de ácidos nucleicos sentido, anti-sentido o interferencial correspondiente a dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido conforme a la invención.

[0056] Las secuencias de ácidos nucleicos pueden provenir de cualquier origen posible, ya sea animal, en particular de mamíferos y aún más particularmente humano, ya sea vegetal, ya sea 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.

Proceso de evaluación del estado de una epidermis según la invención

[0057] Según una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de evaluación de un estado de una epidermis de una piel seca que comprende al menos las etapas consistentes en:

a) determinar, en una muestra de epidermis, un contenido de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, o SEQ ID Nº 3, un análogo de éstas que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza, o ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido, y

b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia, donde el estado de la epidermis se caracteriza por una determinación de que el contenido determinado en la etapa a) es de 5 a 10 veces inferior al valor de referencia.

[0058] Un procedimiento según la invención se puede llevar a cabo *in vitro* o *ex vivo*.

[0059] Según una forma de realización, un procedimiento según la invención se puede llevar a cabo sobre una muestra de epidermis extraída de un individuo.

[0060] Un procedimiento según la invención también se puede llevar a cabo sobre una muestra de epidermis tomada sobre una piel aislada reconstruida con el fin de calificar su estado.

[0061] La determinación de un estado de una epidermis puede ser indicativa de un eventual trastorno cutáneo o del cuero cabelludo. En particular, un estado de la epidermis puede ser indicativo de un eventual trastorno cutáneo, particularmente elegido de entre una sequedad excesiva de la epidermis, una xerosis, una ictiosis, una atopía, una dermatitis atópica, una psoriasis, una hiperqueratosis, un eczema, una rosácea, un líquen, un prurito, una rosácea, una dermatitis seborreica, una queratodermia palmoplantar y un prurigo.

[0062] Un procedimiento según la invención también puede llevarse a cabo sobre un cuero cabelludo.

- Modos de toma de la muestra

[0063] La toma de una muestra de epidermis puede hacerse por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0064] Estos métodos se pueden llevar a cabo a través de técnicas denominadas de *stripping*.

[0065] Estos *stripping* son superficies con pegamento aplicadas a la superficie de la epidermis como el blenderm de 3M, el D'squam (adhesivo comercial de CuDERM), la cola cianoacrilato o el método de *stripping* con un barniz. Gracias a estos *stripping*, los corneocitos adheridos y el contenido de sus espacios intercelulares se pueden tomar y someter después a una extracción que permite tener acceso al contenido proteico.

[0066] La toma de una muestra conveniente para el procedimiento también se puede efectuar de manera más directa por "lavados" de la superficie cutánea por medio de, por ejemplo, accesorios de tipo turbina con aletas, de tipo célula con espiral (como se describe en la patente FR 2 667 778) asociada a un circuito de fluido, o simplemente por adición/extracción de una gota de tampón a la superficie de la piel.

[0067] A título indicativo de otros métodos de toma de muestras adaptados a la puesta en práctica de la invención se puede mencionar los métodos por raspado de la parte superior de la capa córnea por medio de un sistema bilámina.
Esta técnica permite recoger escamas que a continuación pueden ser analizadas directamente por diferentes técnicas para determinar los índices de minerales, aminoácidos o lípidos. Las muestras se pueden conservar en el congelador y analizar a continuación mediante técnicas conocidas por el experto, tales como el análisis LC/ESI/MS.

- Valor de referencia

[0068] Un valor de referencia puede ser, por ejemplo, un contenido de polipéptido o de secuencia de ácidos nucleicos determinado sobre una muestra de epidermis tomada de una piel que presenta una hidratación normal y, en particular, de una piel joven. En el marco de la presente invención, se ha observado que el índice de polipéptidos de tipo RNasa 7 puede disminuir de manera fisiológica en las pieles de sujetos mayores que superan los 45 años y en particular de mujeres.

[0069] Por lo tanto, por piel joven se entiende una piel de un sujeto mayor de menos de 45 años aproximadamente, por oposición a una piel madura.

[0070] Los valores de RNasa 7 se pueden expresar en unidades arbitrarias o calcular gracias al establecimiento de una curva de calibración efectuada gracias a una proteína recombinante o purificada de una epidermis. En todos los casos, el índice de RNasa 7 medido se puede expresar con respecto a la cantidad total de proteínas presentes en el extracto. La cantidad total de proteínas se puede medir, por ejemplo, por el método de Bradford.

[0071] La medición de un valor de referencia se puede efectuar de manera paralela o secuencial a la determinación de dicho contenido de un polipéptido o de una secuencia de ácidos nucleicos.

[0072] Una comparación de un contenido determinado con un valor de referencia puede permitir evaluar una desviación con respecto a este valor.

[0073] El análisis de la intensidad y/o de la naturaleza de esta desviación (negativa o positiva) puede ser informativa del estado de la epidermis.

[0074] Así, por ejemplo, un contenido de polipéptido determinado de 5 a 10 veces inferior a un valor de referencia obtenido de una piel normal puede ser indicativo de un trastorno cutáneo. De manera convencional, una piel normal califica una piel sana que no es ni seca ni grasa.

[0075] De forma más particular, los trastornos cutáneos o del cuero cabelludo susceptibles de ser identificados por la aplicación de un procedimiento de evaluación según la invención pueden ser aquellos resultantes de una deficiencia o de una sobreexpresión de la proteína RNasa 7, como por ejemplo los indicados a continuación.

- Modos de determinación del polipéptido

[0076] Un polipéptido conveniente para la realización de un procedimiento según la invención puede ser ventajosamente la proteína RNasa 7.

[0077] La determinación de un contenido de polipéptido conforme a la invención o de ácidos nucléicos conforme a la invención en una muestra de epidermis se puede efectuar por cualquier protocolo conocido por el experto en la técnica.

[0078] En calidad de método de detección de un polipéptido, se puede hacer mención al Western Blot, Slot blot, Dot blot, métodos ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) de tipo singleplex o multiplex, métodos de protéomica, de coloración de polipéptidos en un gel de poliacrilamida con un colorante a base de plata, con azul de Coomassie o con SYPRO, immunofluorescencia, absorción UV, métodos inmunohistoquímicos en microscopía tradicional, electrónica o confocal, FRET (fluorescence resonance energy transfer/transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), métodos de TR-FRET (time resolved FRET/FRET con resolución temporal), métodos de FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy/obtención de imágenes por microscopía de tiempo de vida de fluorescencia), métodos de FSPIM (fluorescence espectral imaging microscopy/obtención de imágenes por microscopía de espectro de fluorescencia), métodos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching/recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo), métodos por gen reportero, métodos de AFM (atomic force microscopy/microscopía de fuerza atómica), métodos de resonancia plasmónica de superficie, métodos de microcalorimetría, métodos de citometría de flujo, métodos con biosensores, métodos de radioinmunoensayos (RIA), métodos que utilizan chips de péptidos, chips de azúcar, chips de anticuerpos, métodos de espectrometría de masas, métodos de espectrometría de tipo SELDI-TOF (Ciphergen).

[0079] De manera más general, se puede utilizar en particular métodos de dosificación immunoenzimáticos a partir de soluciones de proteínas, más cuantitativos y sensibles. Estos métodos de tipo ELISA asocian pares de anticuerpos de captura y de detección específicos del antígeno dirigido. Se puede utilizar anticuerpoa comerciales o anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes desarrollados específicamente. También se pueden aplicar técnicas ELISA multiplex de gran capacidad. También se puede citar el enfoque multiplex de tipo anticuerpo sobre bolas Luminex (por ejemplo Bioplex de Bio-Rad), de tipo anticuerpo sobre superficie plana ("antibodies-arrays") (por ejemplo, el enfoque propuesto por la empresa Meso scale Discovery).

[0080] En particular, puede ser ventajoso detectar la presencia de un polipéptido conforme a la invención por medio de un anticuerpo, en su caso en una forma marcada. Tal anticuerpo se puede marcar mediante una sustancia detectable directamente o detectable por reacción con otro reactivo.

[0081] Por "anticuerpo" se pretende designar de manera general anticuerpos monoclonales o policlonales, así como fragmentos de inmunoglobulina susceptibles de ligar un antígeno y que se pueden producir mediante cualquier técnica de ingeniería genética conocida por el experto en la técnica o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

[0082] Así, según uno de sus aspectos, la presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo que se liga específicamente a un polipéptido conforme a la invención como herramienta de evaluación de un estado de una epidermis.

[0083] Según una forma de realización, un anticuerpo conveniente para la invención puede ligarse específicamente a un polipéptido representado por la secuencia SEQ ID Nº 4, o epítopos presentes en esta secuencia, o análogos de éstos, particularmente a un epítopo de secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID Nº 7, o un análogo de ésta.

[0084] Un anticuerpo susceptible de ser utilizado como herramienta de evaluación de un estado de una epidermis puede obtenerse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, como se describe en "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

[0085] De este modo, según uno de sus aspectos, la presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo recombinante de tipo monovalente o bivalente que se puede obtener por un procedimiento de presentación de bacteriófagos (bacteriophage display) como propone la empresa Antibodies By Design.

- Modos de determinación del ácido nucleico

[0086] Una secuencia de ácidos nucleicos conveniente para la realización de un procedimiento según la invención puede ser ventajosamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la RNasa 7, por ejemplo de tipo ARNm.

[0087] Como ejemplo de métodos de detección de secuencias de ácidos nucleicos, se puede hacer mención a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (Q-PCR), el Northern blot, el RPA (ensayo de protección de ribonucleasas), los chips de ADN, los chips de oligonucleótidos, los chips transcriptómicos y métodos de hibridación *in situ*.

[0088] Como ejemplo de agentes convenientes para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos, y en particular de ARNm, se puede hacer mención a una sonda de ácidos nucleicos marcada que se puede hibridar a dicha secuencia.

[0089] Tales sondas de ácidos nucleicos se pueden obtener fácilmente por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

[0090] De este modo, las secuencias de ácidos nucleicos conforme a la invención se pueden utilizar para realizar oligonucléotidos cebadores sentido y/o antisentido, que se hibridan a la secuencia SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, o SEQ ID Nº: 3, o un fragmento de ésta o un análogo de ésta.

[0091] Ventajosamente, la actividad biológica cuyo valor se puede determinar puede ser una actividad enzimática de tipo ribonucleasa.

[0092] Cualquier método de medición de una actividad enzimática conocido por el experto en la técnica se puede utilizar en un procedimiento conforme a la invención.

[0093] Por ejemplo, se puede utilizar un método que realiza una medición de la hidrólisis de un substrato fluorescente específico para una ribonucleasa utilizando una preparación de RNasa 7 purificada a partir de estrato córneo (SC).
La medición de la hidrólisis de dicho substrato fluorescente es o bien de tipo "punto final" o bien de tipo "cinético", y la actividad enzimática se puede obtener por la cantidad de proteínas totales de las muestras.

[0094] Por "actividad biológica", se pretende designar particularmente, conforme a la RNasa 7, la actividad biológica de la proproteína (SEQ ID Nº 4), del péptido señal (SEQ ID Nº 6), la actividad biológica de la proteína RNasa 7 que se traduce en una actividad endonucléasica (SEQ ID Nº 5) así como las propiedades inmunógenas de un epítopo identificado por la secuencia SEQ ID Nº 7.

[0095] Según una forma de realización, la actividad biológica del polipéptido se puede comparar con un valor de referencia.

[0096] Un valor de referencia se puede obtener efectuando un procedimiento conforme a la invención en ausencia de todo compuesto biológico o químico por testar.

[0097] Según otra forma de realización, la determinación de la propiedad de un compuesto químico o biológico para modular la actividad biológica de un polipéptido conforme a la invención también se puede determinar por determinación de la capacidad de dicho compuesto para modular la unión de dicho polipéptido a un substrato.

[0098] Ventajosamente, un polipéptido aplicado en un procedimiento según la presente invención puede ser la proteína RNasa 7.

[0099] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos se puede determinar, por ejemplo, mediante sondas de oligonucléotidos, mediante protocolos conocidos por el experto en la técnica.

[0100] La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención se puede comparar a un valor de referencia obtenido, por ejemplo, efectuando un procedimiento conforme a la invención en ausencia de compuesto por testar.

[0101] En el contexto de la invención, se entiende por "prevención de un problema" la reducción del riesgo de que ocurra el trastorno considerado, particularmente como se ha definido previamente.

[0102] En el sentido de la presente invención, se entiende por la expresión "cantidad eficaz" la cantidad mínima necesaria para la observación del efecto esperado, a saber un efecto cosmético o un efecto terapéutico, entendiéndose que las cantidades eficaces necesarias para la obtención de un efecto cosmético o de un efecto terapéutico pueden ser, según el caso, idénticas o diferentes.

[0103] En el sentido de la presente invención, se entiende por "medio fisiológicamente aceptable" un medio conveniente para la aplicación de una composición sobre una materia queratínica, tal como la piel, el cuero cabelludo, los labios, las mucosas y las fibras queratínicas como los cabellos, las uñas y el vello.

[0104] En el sentido de la presente invención, se entiende por "terapéutica" una composición que se puede aplicar en el marco de un tratamiento profiláctico y/o curativo, o de un método de diagnóstico, de un trastorno cutáneo o del cuero cabelludo.

[0105] Los trastornos cutáneos considerados de forma más particular por la presente invención pueden ser piel seca, piel muy seca y de individuos cuya piel presenta un aspecto envejecido, particularmente en mujeres que superan los 45 años y/o menopáusicas, incluso muy mayores, y los polipéptidos, las secuencias nucleicas, los agentes moduladores y las composiciones conforme a la invención también se pueden adaptar al tratamiento de las xerosis y las pieles dañadas por los rayos UV.

[0106] En el sentido de la presente invención, "un/a" debe entenderse, excepto si se indica lo contrario, en el sentido de "al menos un/a".

[0107] Los ejemplos que se enumeran a continuación se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Figura

[0108] Figura 1: ilustra un histograma que muestra la expresión media de la RNasa 7 en 4 tipos distintos de epidermis (columna gris izquierda: piel seca madura; columna negra: piel madura normal; columna blanca: piel joven seca; columna gris derecha: piel joven normal).

[0109] La expresión en unidades relativas representa la intensidad de la banda identificada en el Western Blot como correspondiente a la RNasa 7 respecto a los controles internos.

**Ejemplo**

**Ejemplo I**- evaluación de la expresión de la ribonucleasa 7 en la epidermis

[0110] Para el estudio se reclutaron voluntariamente mujeres sanas con piel normal o piel seca y se dividieron en dos grupos, en función de la edad: edad denominada post-menopausia (55-60 años) y edad denominada premenopausia (35-40 años).

[0111] De este modo, se obtuvieron cuatro grupos: mujeres de edad denominada post-menopausia con piel normal (n=13), mujeres de edad denominada post-menopausia con piel seca (n=15), mujeres de edad denominada premenopausia con piel normal (n=14) y mujeres de edad denominada premenopausia con piel seca (n=16).

[0112] Se tomaron muestras del estrato córneo mediante la técnica denominada del "*stripping* con barniz" en cada individuo utilizando un protocolo modificado de LUNDSTROM y EGELRUD (Acta Derm Venereol, 1991, 71:471).

[0113] Las tiras de "*stripping* con barniz" se lavaron con acetona enfriada en hielo y los corneocitos se recuperaron después de filtración y centrifugado.

[0114] Las proteínas solubles se extrajeron en un tampón PBS-0,1 % TX-100.

[0115] Cada muestra se ajustó a la concentración de 0,15 mg/ml antes del análisis por Western Blot.

[0116] 10 µg de proteína se separaron sobre un gel 4-20 % SDS-NuPage (InVitrogen).

[0117] Las proteínas separadas se transfirieron a continuación sobre una membrana PDVF (Millipore) utilizando un sistema X-cell Blot (InVitrogen) según las instrucciones del fabricante.

[0118] Después la membrana se saturó con 1 % de leche descremada en TBS-0,05 % Tween (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0119] A continuación la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal anti-RNasa 7 en dilución de 1:1000 durante la noche a 4 °C.

[0120] El anticuerpo policlonal anti-RNasa 7 se obtuvo por inmunización de conejos con la secuencia peptídica N-terminal SEQ ID Nº 7 de la proteína RNasa 7.

[0121] El anticuerpo obtenido se purificó con el mismo péptido que el utilizado para la inmunización de los conejos.

[0122] Después se lavó la membrana con el tampón TBS-T y luego se incubó en presencia de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente en dilución de 1:4000.

[0123] Luego se lavó la membrana como se ha descrito anteriormente.

[0124] La detección por quimioluminiscencia se realizó con ECLplus (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante.

[0125] Las imágenes se adquirieron a lo largo de un período de un minuto por un Multi-imager Fluor-S max (BIORAD).

[0126] La intensidad de cada banda se cuantificó utilizando Quantity One (BIORAD).

[0127] Los datos se normalizaron con respecto a un control proteico interno marcado con negro de amida sobre la propia membrana y se calcularon en forma de una relación entre la intensidad de la banda de la proteína de interés y la intensidad de la banda del control interno.

[0128] Los resultados representados en figura 1 indican que la expresión de la proteína RNasa 7 está fuertemente disminuida en el estrato córneo de las pieles secas y también en las mujeres en la edad denominada post-menopausia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0129]

**SEQ ID NO 1**

```
1       atggcaccgg ccagagcagg attctgcccc cttctgctgc ttctgctgct ggggctgtgg
61      gtggcagaga tcccagtcag tgccaagccc aagggcatga cctcatcaca gtggtttaaa
121     attcagcaca tgcagcccag ccctcaagca tgcaactcag ccatgaaaaa cattaacaag
181     cacacaaaac ggtgcaaaga cctcaacacc ttcctgcacg agcctttctc cagtgtggcc
241     gccacctgcc agaccccaa aatagcctgc aagaatggcg ataaaaactg ccaccagagc
301     cacgggcccg tgtccctgac catgtgtaag ctcacctcag ggaagtatcc gaactgcagg
361     tacaaagaga agcgacagaa caagtcttac gtagtggcct gtaagcctcc ccagaaaaag
421     gactctcagc aattccacct ggttcctgta cacttggaca gagtccttta g
```

**SEQ ID NO 2**

```
1       aagcccaagg gcatgacctc atcacagtgg tttaaaattc agcacatgca gcccagccct
61      caagcatgca actcagccat gaaaaacatt aacaagcaca caaaacggtg caaagacctc
121     aacaccttcc tgcacgagcc tttctccagt gtggccgcca cctgccagac ccccaaaata
181     gcctgcaaga atggcgataa aaactgccac cagagccacg ggcccgtgtc cctgaccatg
241     tgtaagctca cctcagggaa gtatccgaac tgcaggtaca aagagaagcg acagaacaag
301     tcttacgtag tggcctgtaa gcctccccag aaaaaggact ctcagcaatt ccacctggtt
361     cctgtacact tggacagagt cctttag
```

**SEQ ID NO 3**

```
1       atggcaccgg ccagagcagg attctgcccc cttctgctgc ttctgctgct ggggctgtgg
61      gtggcagaga tcccagtcag tgcc
```

**SEQ ID NO 4**

```
1       MAPARAGFCP LLLLLLLGLW VAEIPVSAKP KGMTSSQWFK IQHMQPSPQA CNSAMKNINK
61      HTKRCKDLNT FLHEPFSSVA ATCQTPKIAC KNGDKNCHQS HGPVSLTMCK LTSGKYPNCR
121     YKEKRQNKSY VVACKPPQKK DSQQFHLVPV HLDRVL
```

**SEQ ID NO 5**

```
1       KPKGMTSSQW FKIQHMQPSP QACNSAMKNI NKHTKRCKDL NTFLHEPFSS VAATCQTPKI
61      ACKNGDKNCH QSHGPVSLTM CKLTSGKYPN CRYKEKRQNK SYVVACKPPQ KKDSQQFHLV
121     PVHLDRVL
```

**SEQ ID NO 6**

1 MAPARAGFCP LLLLLLLGLW VAEIPVSA

**SEQ ID NO 7**

1 SAKPKGMTSS QWFKI SEQUENCE LISTING

<110> L'OREAL

<120> Uso cosmético de una proteína de la familia de las ribonucleasas

<130> BR80830/CR/HG/klp

<140> 06 54965
<141> 2006-11-17

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 471
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 1

atggcaccgg ccagagcagg attctgcccc cttctgctgc ttctgctgct ggggctgtgg 60
gtggcagaga tcccagtcag tgccaagccc aagggcatga cctcatcaca gtggtttaaa 120
attcagcaca tgcagcccag ccctcaagca tgcaactcag ccatgaaaaa cattaacaag 180
cacacaaaac ggtgcaaaga cctcaacacc ttcctgcacg agcctttctc cagtgtggcc 240
gccacctgcc agacccccaa aatagcctgc aagaatggcg ataaaaactg ccaccagagc 300
cacgggcccg tgtccctgac catgtgtaag ctcacctcag ggaagtatcc gaactgcagg 360
tacaaagaga agcgacagaa caagtcttac gtagtggcct gtaagcctcc ccagaaaaag 420
gactctcagc aattccacct ggttcctgta cacttggaca gagtccttta g 471

<210> 2
<211> 387
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 2

aagcccaagg gcatgacctc atcacagtgg tttaaaattc agcacatgca gcccagccct 60
caagcatgca actcagccat gaaaaacatt aacaagcaca caaaacggtg caaagacctc 120
aacaccttcc tgcacgagcc tttctccagt gtggccgcca cctgccagac ccccaaaata 180
gcctgcaaga atggcgataa aaactgccac cagagccacg ggcccgtgtc cctgaccatg 240
tgtaagctca cctcagggaa gtatccgaac tgcaggtaca aagagaagcg acagaacaag 300
tcttacgtag tggcctgtaa gcctccccag aaaaaggact ctcagcaatt ccacctggtt 360
cctgtacact tggacagagt cctttag 387

<210> 3
<211> 84
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 3

atggcaccgg ccagagcagg attctgcccc cttctgctgc ttctgctgct ggggctgtgg 60

gtggcagaga tcccagtcag tgcc 84

<210> 4
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 4

Met Ala Pro Ala Arg Ala Gly Phe Cys Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Trp Val Ala Glu Ile Pro Val Ser Ala Lys Pro Lys Gly
20 25 30

Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met Gln Pro Ser Pro
35 40 45

Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn Lys His Thr Lys Arg
50 55 60

Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His Glu Pro Phe Ser Ser Val Ala
65 70 75 80

Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile Ala Cys Lys Asn Gly Asp Lys Asn
85 90 95

Cys His Gln Ser His Gly Pro Val Ser Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr
100 105 110

Ser Gly Lys Tyr Pro Asn Cys Arg Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys
115 120 125

Ser Tyr Val Val Ala Cys Lys Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln
130 135 140

Phe His Leu Val Pro Val His Leu Asp Arg Val Leu
145 150 155

<210> 5
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 5

```
Lys Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met
1               5                  10                  15

Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn Lys
            20                  25                  30

His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His Glu Pro Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile Ala Cys Lys Asn
    50                  55                  60

Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro Val Ser Leu Thr Met
65                  70                  75                  80

Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn Cys Arg Tyr Lys Glu Lys
                85                  90                  95

Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala Cys Lys Pro Pro Gln Lys Lys
            100                 105                 110

Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val Pro Val His Leu Asp Arg Val Leu
        115                 120                 125
```

<210> 6
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 6

```
Met Ala Pro Ala Arg Ala Gly Phe Cys Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1               5                  10                  15

Leu Gly Leu Trp Val Ala Glu Ile Pro Val Ser Ala
            20                  25
```

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 7

```
Ser Ala Lys Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile
1               5                  10                  15
```

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de evaluación de un estado de una epidermis de una piel seca que comprende al menos las etapas consistentes en:

a) determinar un contenido de un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, o SEQ ID Nº 3, un análogo de éstas que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza, o ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido, en una muestra de epidermis, y
b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia, donde el estado de la epidermis **se caracteriza por** una determinación de que el contenido determinado en la etapa a) es de 5 a 10 veces inferior al valor de referencia.

2. Procedimiento según la reivindicación precedente, en la cual el contenido de polipéptido se determina por medio de un anticuerpo que se liga específicamente a un polipéptido de secuencia de aminoácidos representada por una secuencia elegida de entre SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 6, o SEQ ID Nº 7, o un análogo de éstas que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza.

3. Procedimiento según la reivindicación precedente, en la cual el anticuerpo se liga a un epítopo de secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID Nº 7, o un análogo de ésta que presenta una homología de secuencia de por lo menos 85% y una actividad biológica de la misma naturaleza.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el estado de una epidermis de una piel seca es indicativo de un eventual trastorno cutáneo elegido de entre una sequedad excesiva, una xerosis, una ictiosis, una atopia, una dermatitis atópica, una psoriasis, una hiperqueratosis, un eczema, una rosácea, un líquen, un prurito, una rosácea, una dermatitis seborreica, una queratodermia palmoplantar y un prurigo.

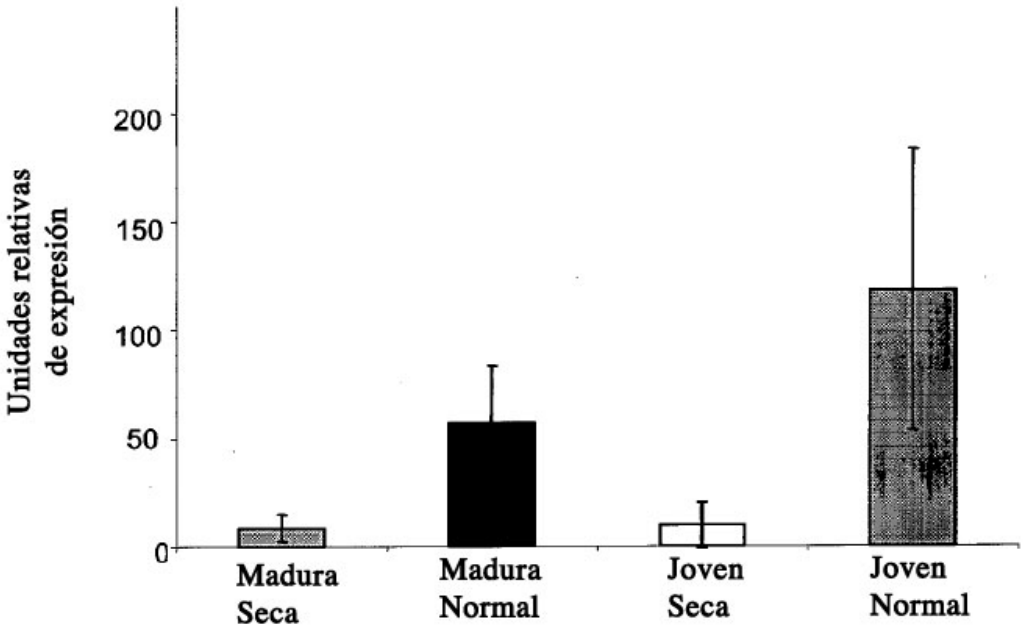
Unidades relativas de expresión
200
150
100
50
0
Madura Seca
Madura Normal
Joven Seca
Joven Normal

FIGURA 1