

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 298**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2010 E 10150605 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2209005**

54 Título: **Utilización de formas complejas de la proteína de la piel similar a la calmodulina CLSP**

30 Prioridad:

13.01.2009 FR 0950162
27.01.2009 US 202077 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DONOVAN, MARK y
BERNARD, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 669 298 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

Utilización de formas complejas de la proteína de la piel similar a la calmodulina CLSP

- 5 [0001] La presente invención tiene como objeto principal el uso de formas complejas de la proteína de la piel similar a la calmodulina (CLSP), de fragmentos peptídicos de esta proteína o de análogos de esta, como marcador para la evaluación de un estado de envejecimiento cronológico de un epitelio, y particularmente de la epidermis.
- 10 [0002] Los epitelios son tejidos cuyas células están unidas y conectadas unas a otras y descansan sobre una membrana basal. Forman un revestimiento o bien externo, por ejemplo en la superficie de la piel, o epidermis, o bien interno, en la superficie de una mucosa. También pueden formar glándulas.
- 15 [0003] Más precisamente, estos epitelios son estructuras cuya homeostasis resulta de la puesta en marcha de un conjunto, cuidadosamente regulado, de señales intracelulares y extracelulares que actúan en todas las etapas de la proliferación, de la migración, de la diferenciación celular, así como de la síntesis de los diferentes componentes de la matriz extracelular. Estas señales pueden resultar particularmente de la acción de factores producidos por queratinocitos.
- 20 [0004] El mantenimiento de unas buenas funciones fisiológicas de un epitelio implica particularmente la diferenciación epitelial terminal y/o la síntesis de proteoglicanos.
- 25 [0005] En lo que se refiere más particularmente a la epidermis, se trata de un epitelio, convencionalmente dividido en una capa basal de queratinocitos que contiene, particularmente, células madre cutáneas y que constituye el estrato germinativo de la epidermis, un estrato denominado espinoso constituido por varias capas de células poliédricas dispuestas sobre la capa basal, un estrato denominado granuloso que comprende de una a tres capas dichas de células planas que contienen inclusiones citoplásmicas distintas, gránulos de queratohialina y, finalmente, un conjunto de capas superiores, denominado estrato córneo (o capa córnea), constituido por queratinocitos en la fase terminal de su diferenciación, denominados corneocitos.
- 30 [0006] El estrato córneo, la parte más externa de la piel que asegura la función de barrera entre el organismo y el entorno, y el tallo piloso, parte emergente del folículo piloso que constituye el cabello, representan ambos la culminación del proceso de diferenciación de los queratinocitos. La diferenciación epidérmica sigue un proceso de maduración en el cual los queratinocitos de la capa basal se diferencian y migran para dar lugar a la
- 35 formación de los corneocitos, células muertas totalmente queratinizadas. Esta diferenciación es la resultante de fenómenos perfectamente coordinados que llevan al mantenimiento de un grosor constante y aseguran así la homeostasis de la epidermis.
- 40 [0007] Muchos trastornos o patologías cutáneas pueden resultar de una alteración de la homeostasis de la epidermis.
- 45 [0008] De este modo, en el caso de la piel madura, esta alteración se manifiesta habitualmente en la aparición de arrugas (microrrelieve y arrugas profundas), pérdida de la elasticidad, tacto rugoso y sequedad. En el plano histológico, se observa un aplastamiento de la unión dermoepidérmica y una disminución del grosor de la dermis y de la epidermis. El contenido de colágeno y de glicosaminoglicanos disminuye. La función de barrera de la piel se ve alterada. El conjunto de estos fenómenos se ve acrecentado por la exposición solar crónica.
- [0009] Igualmente, esta alteración se puede ver exacerbada en mujeres, durante la menopausia.
- 50 [0010] La presente invención resulta más particularmente de la caracterización por los inventores, al nivel del estrato córneo, de formas complejas de la proteína CLSP, cuya expresión resulta ser modulada de manera diferente en el transcurso del envejecimiento cronobiológico de un epitelio.
- 55 [0011] La CLSP es una proteína de unión al calcio que pertenece a la familia de las calmodulinas cuya forma precursora comprende 146 aminoácidos. Presenta un peso molecular de aproximadamente 16 kDa y una homología de secuencias de aminoácidos de aproximadamente un 52 % con la calmodulina.
- 60 [0012] La estructura de la CLSP comprende 4 sitios potenciales de unión al calcio de tipo "mano EF", sitios potenciales de N-glicosilación, múltiples sitios potenciales de fosforilación y un sitio de miristilación.
- [0013] La unión del calcio a la CLSP induce un cambio de su configuración que comporta su activación, lo que permite particularmente su interacción con diferentes proteínas diana.
- 65 [0014] Se ha observado un aumento del ARNm codificante para la CLSP durante el envejecimiento fotoinducido (Urschitz, J. Et al., J. Invest. Dermatol., 2002,119 :3-13), es decir, envejecimiento resultante de una exposición

repetida de la piel a los rayos del sol, un proceso distinto del del envejecimiento cronológico, es decir, del envejecimiento fisiológico asociado al paso del tiempo.

5 [0015] Por su parte, el documento US 2004/0142335 observa por medio de un análisis transcriptómico un aumento de la expresión del ARNm codificante para la proteína CLSP en la piel de un individuo de edad avanzada en comparación con la de un individuo joven.

10 [0016] De este modo, la CLSP podría estar particularmente implicada en la diferenciación terminal de los queratinocitos (B. Mehl et al., J. Biol. Chem., 2000, Apr. 28,275(17) :12841-7), (EP 1 204 744).

15 [0017] Además, el documento FR2796646 sugiere la existencia de formas complejas de la CLSP y propone el uso de la proteína CLSP para tratar el envejecimiento cutáneo. Sin embargo, no menciona nada sobre el envejecimiento cronológico cutáneo ni sobre ninguna relación entre formas complejas de la CLSP y el envejecimiento cutáneo.

20 [0018] Más recientemente, los inventores han constatado de manera inesperada una disminución de la expresión de formas particulares de la CLSP en el estrato córneo de la epidermis humana de edad avanzada. Manifiestamente, las formas caracterizadas por los inventores corresponden a estadios de maduración de la proteína distintos de los de las formas de CLSP consideradas hasta ahora y particularmente mencionadas anteriormente.

25 [0019] Como se extrae de lo que sigue, los inventores han caracterizado las formas complejas gracias a la realización de una técnica de dosificación de tipo ELISA específica, particularmente descrita en el ejemplo 1, a continuación.

30 [0020] De este modo, según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere al uso de por lo menos una forma compleja de la proteína de la piel similar a la calmodulina o CLSP representada por un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1, o un análogo que presenta una homología de secuencia de por lo menos un 85 % con dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de proteólisis de la CLSP de secuencia peptídica elegida entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25, conjugado ya sea con una proteína diferenciada de la CLSP, ya sea con otra proteína CLSP o ya sea con un fragmento de proteólisis de dicha otra proteína CLSP de secuencia peptídica elegida entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25, como herramienta de caracterización *in vitro* o *ex vivo* de un estado de envejecimiento cronológico de un epitelio, y particularmente de una epidermis, siendo una disminución de la(s) forma(s) compleja(s) indicativa de un estado de envejecimiento cronológico.

45 [0021] Por "envejecimiento cronológico", en el contexto de la invención, se entiende que se alejan del alcance de la invención los fenómenos cutáneos que son consecuencia de una exposición al sol o a los rayos UV, es decir, el envejecimiento cutáneo fotoinducido.

50 [0022] En el sentido de la presente invención, el término "forma compleja" pretende cubrir cualquier conjugado de la proteína CLSP o derivado de esta, o bien con otra proteína diferenciada de la CLSP o un fragmento de esta, o bien con otra proteína CLSP o uno de sus fragmentos.

[0023] En el sentido de la presente invención, el término "derivado de la proteína CLSP" designa un fragmento de esta o un análogo como se define a continuación.

55 [0024] Más precisamente, una forma compleja puede derivar de la asociación de la proteína CLSP al completo o de uno de sus fragmentos o bien con ella misma, o bien con uno de sus fragmentos, o incluso con una proteína diana, incluso con una estructura proteica de tipo capa cornificada proteolizada en el estrato córneo.

60 [0025] De este modo, según una primera variante, las formas complejas consideradas según la invención pueden ser formas dimericas de la proteína CLSP, o incluso el conjugado de dos fragmentos peptídicos, idénticos o diferentes, de esta proteína.

65 [0026] Según otra variante, estas formas complejas pueden ser el producto resultante de la asociación de la proteína CLSP o uno de sus fragmentos con una proteína diana anexa. A título ilustrativo de estas proteínas diana susceptibles de interactuar con la CLSP y/o uno de sus fragmentos, se puede citar particularmente el polipéptido 14.3.3 Beta, el 14.3.3 Sigma, las anexinas II y V, las calreticulinas, ERp72, la nucleolina, la transglutaminasa 3, MAGED1 (gen antígeno del melanoma D1), PPP4C (proteína fosfatasa 4) y USF2 (factor de

transcripción upstream 2). También puede tratarse de motivos peptídicos tales como el motivo YWHAQ (14.3.3 Tau).

5 [0027] Contra todo pronóstico, los inventores han constatado que la cuantificación de estas formas complejas en el estrato córneo constituye un medio eficaz y fiable para calificar el estado de la epidermis correspondiente. Como se ha precisado antes, se observa una disminución de la expresión de estas formas complejas en el transcurso del envejecimiento cronológico.

10 [0028] Por ello, una disminución en las forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención es indicativa de un estado de envejecimiento cronológico de un epitelio.

[0029] La caracterización de estas formas complejas resulta, por lo tanto, particularmente útil para establecer un diagnóstico del estado de una epidermis.

15 [0030] Conforme a este diagnóstico, se podrá proponer ventajosamente al sujeto un tratamiento cosmético particularmente ajustado a su perfil. Por razones evidentes, este tipo de personalización en términos del tratamiento cosmético es particularmente buscada y apreciada por parte de los usuarios. La presente invención permite responder ventajosamente a esta demanda.

20 [0031] Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento, *in vitro* o *ex vivo*, de caracterización de un estado de un epitelio que comprende al menos las etapas consistentes en:

- 25 a) determinar, en una muestra de superficie de dicho epitelio, un contenido de al menos una forma compleja de la invención, y
b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un dato de referencia,

siendo una disminución de la(s) forma(s) compleja(s) indicativa de un estado de envejecimiento cronológico.

30 [0032] El presente texto también describe un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar, particularmente *in vitro* o *ex vivo*, el estado cronológico de una epidermis, que comprende al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa al nivel del estrato córneo de dicha epidermis de la expresión de por lo menos una forma compleja de la CLSP según la invención.

35 [0033] Según una variante de realización, el dato o valor obtenido mediante tal procedimiento se puede apreciar en comparación con un dato o valor de referencia, obtenido por ejemplo a partir de por lo menos un epitelio, particularmente una epidermis, distinto del que constituye el objeto de la caracterización, y cuyo estado se conoce.

40 [0034] Según uno de sus aspectos, el presente texto describe un procedimiento para caracterizar el estado cronológico de una epidermis como ya se ha mencionado, en el cual una disminución de las formas complejas conforme a la invención es indicativo de un estado de envejecimiento cronológico.

45 [0035] El presente texto también describe un procedimiento, particularmente cosmético, no invasivo, para caracterizar, particularmente *in vitro* o *ex vivo*, la eficacia de un tratamiento, cosmético o terapéutico, con el fin de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo asociados al envejecimiento cronológico de un individuo, tales como las arrugas y las arrugas superficiales, que comprende al menos la caracterización cualitativa o cuantitativa de por lo menos una forma compleja de la CLSP según la invención.

50 [0036] Por "signos del envejecimiento cutáneo" se entienden todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debidas al envejecimiento cronológico, como por ejemplo las arrugas y las arrugas superficiales, la piel marchita, la falta de elasticidad y/o de tono de la piel, el adelgazamiento de la dermis y/o el deterioro de las fibras de colágeno, lo que comporta la apariencia de piel blanda y arrugada.

55 [0037] Los signos del envejecimiento cutáneo considerados en la invención son aquellos asociados al envejecimiento cutáneo cronológico o resultantes de este.

[0038] En particular, los signos del envejecimiento cutáneo considerados en la invención son distintos de los asociados al envejecimiento cutáneo fotoinducido o resultantes de este.

60 [0039] Por envejecimiento fotoinducido se pretende designar particularmente los daños oxidativos ligados a la exposición de la epidermis a los rayos UV, y particularmente a los rayos UVA, que causa la síntesis de radicales libres, la glicación de las proteínas o la activación excesiva de ciertos receptores de superficie de las células y, en el plano tisular, el engrosamiento de las fibras de elastina.

65 [0040] La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo prevenir y/o tratar las manifestaciones cutáneas ligadas al envejecimiento cronológico, y particularmente no ligadas a una exposición a los rayos UV.

[0041] La presente invención está orientada de forma más particular a las manifestaciones del envejecimiento cutáneo cronológico resultante del desgaste y de la senescencia celular.

5 [0042] Particularmente, el envejecimiento cronológico se manifiesta, en el plano de las células de la epidermis, en una reducción de los telómeros, una disminución de la estimulación celular debida a un déficit de diferentes hormonas, tales como la DHEA, o de factores de crecimiento, o a causa de una disminución del número de receptores celulares y, en el plano tisular, particularmente por la desaparición de las fibras de elastina.

10 [0043] Tales fenómenos no están asociados a una exposición a los rayos UV ni, por lo tanto, al fotoenvejecimiento de la piel.

[0044] Las deficiencias celulares y tisulares como consecuencia del envejecimiento cronológico de la epidermis pueden manifestarse, particularmente, en xerosis, laxitud de la epidermis, arrugas y/o arrugas superficiales, flacidez cutánea, queratosis seborreica o angiomias cereza.

15 [0045] Más precisamente, el procedimiento como se ha definido antes puede comprender al menos las etapas consistentes en:

- 20 i. Obtener por lo menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
ii. Cuantificar al nivel de dicha muestra, particularmente mediante una técnica de dosificación ELISA, y en particular la descrita en el ejemplo 1 que aparece a continuación, al menos una forma compleja según la invención,
25 iii. Repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y
iv. Comparar los resultados obtenidos con el resultado de las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de extraer a partir de ellos una información relativa a al menos un efecto del tratamiento,

correspondiendo dicha primera y dicha segunda muestra de superficie cutánea a diferentes estadios de tratamiento.

30 [0046] El valor o dato de referencia de la etapa ii. puede ser un dato obtenido a partir del epitelio, particularmente de la epidermis, representativo del individuo que es objeto del tratamiento, antes de la administración de dicho tratamiento o dentro de un plazo cronológico más corto respecto de la fecha de inicio de tratamiento.

35 [0047] Según una forma de realización preferida, la primera muestra es representativa de un estado de pre-tratamiento y la segunda es representativa de un estado de tratamiento en curso o post-tratamiento.

[0048] El presente texto describe uno de los procedimientos precedentes, en el cual un aumento de la(s) forma(s) compleja(s) es indicativo de una eficacia de dicho tratamiento de los signos del envejecimiento cutáneo.

40 [0049] Según una variante de realización, uno de los procedimientos precedentes puede comprender, al final de la etapa de caracterización de formas complejas de la CLSP, también al menos una etapa complementaria para administrar a dicho sujeto una composición de cuidado, particularmente cosmético, establecida o seleccionada conforme a la información obtenida sobre dichas formas complejas. Esta etapa complementaria puede ser consecutiva a la etapa de caracterización.

[0050] Según una forma de realización, esta composición también se puede seleccionar de entre una gama de composiciones, cada una de las cuales está adaptada de forma particular a un tipo de información que se puede obtener según el procedimiento de la invención.

50 [0051] Así, la presente invención tiene por interés proponer un método sencillo y rápido, por una parte para establecer la caracterización del estado fisiológico de un epitelio, en particular de la epidermis de la piel y, por otra parte, para ajustar en consecuencia un tratamiento adecuado para dicho epitelio o epidermis de la piel.

55 [0052] Los procedimientos de la invención se pueden efectuar *in vitro*, *ex vivo*.

[0053] Como se desprende de la descripción que sigue, los procedimientos según la invención son particularmente ventajosos en cuanto a que su aplicación no requiere operaciones invasivas.

60 [0054] En efecto, la localización por los inventores de estos nuevos biomarcadores del envejecimiento en el estrato córneo hace posible una caracterización cuantitativa o cualitativa de la expresión de estos mediante una sencilla toma muestra tópica.

65 [0055] De manera ventajosa, este procedimiento se puede realizar en una muestra de estrato córneo del sujeto considerado, simplemente extraída mediante *stripping*. El método de toma puede por ejemplo ser una técnica de tipo *stripping* que consiste en aplicar sobre el epitelio en cuestión, por ejemplo una epidermis, un trozo de cinta

adhesiva. Al despegar esta cinta adhesiva se extrae una fracción del epitelio, por ejemplo una fracción epidérmica. Después de la extracción proteica, esta se analiza a continuación mediante un ensayo ELISA tal como se considera en la presente invención.

5 [0056] Además, el presente texto también describe el uso de por lo menos una forma compleja conforme a la invención, como herramienta de cribado de compuestos biológicos o químicos capaces de modular, y en particular de favorecer, el aumento y/o la estabilidad y/o la actividad biológica de estas formas complejas.

10 [0057] En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de activos antienvjecimiento que comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) poner en contacto al menos un tipo celular que contiene al menos una forma compleja conforme a la invención con al menos un activo antienvjecimiento que se desea testar, en condiciones propicias para la expresión de dicha forma compleja, y
- 15 b) determinar un contenido de dicha forma compleja,
- c) comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma compleja determinado en ausencia del compuesto químico o biológico que se desea testar, siendo un aumento en la(s) forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención indicativo de un activo dotado de propiedades antienvjecimiento.

20 [0058] De este modo, ventajosamente, también se puede efectuar después de la etapa c) una etapa de selección del o de los activos para los cuales se observa un aumento del contenido de forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención.

25 [0059] El presente texto describe además el uso cosmético de una cantidad eficaz de forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención como agente útil para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo.

30 [0060] El presente texto describe el uso de una cantidad eficaz de forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención, para prevenir y/o tratar un adelgazamiento de una epidermis y/o una pérdida de firmeza, de elasticidad, de densidad y/o de tonicidad de una epidermis y/o la formación de arrugas y arrugas superficiales.

35 [0061] El presente texto también describe el uso de una cantidad eficaz de forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención, o de por lo menos un agente modulador de la formación de dicha(s) forma(s) compleja(s), para la preparación y/o la mejora de un modelo celular pluriestratificado, en particular un modelo de piel reconstruida.

[0062] El presente texto describe asimismo un procedimiento de preparación de una piel reconstruida aislada que comprende al menos la etapa consistente en poner en contacto al menos una forma compleja según la invención, con células capaces de generar una piel reconstruida aislada, y particularmente queratinocitos.

40 [0063] Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento cosmético *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo ligados al envejecimiento cronológico de un individuo, que comprende al menos la caracterización cuantitativa de por lo menos una forma compleja según la invención, siendo un aumento de las forma(s) compleja(s) indicativo de una eficacia de dicho tratamiento de los signos del envejecimiento cutáneo.

45 [0064] La presente invención se refiere además a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo*, no terapéutico, para caracterizar la eficacia de un tratamiento susceptible de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cronológico cutáneo de un individuo, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- 50 i. Obtener por lo menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
- ii. Cuantificar al nivel de dicha muestra, particularmente mediante una técnica de dosificación ELISA, al menos una forma compleja según la invención,
- iii. Repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y
- 55 iv. Comparar los resultados obtenidos al terminar las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de extraer a partir de ellos una información relativa a al menos un efecto de dicho tratamiento,

60 correspondiendo dichas primera y segunda muestras de superficie cutánea a distintos estadios de tratamiento, siendo un aumento de la(s) forma(s) compleja(s) indicativo de una eficacia de dicho tratamiento de los signos del envejecimiento cronológico cutáneo. Según otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de por lo menos una forma compleja según la invención, como herramienta de cribado de compuestos biológicos o químicos susceptibles de favorecer el aumento y/o la estabilidad y/o la actividad biológica de dichas formas complejas.

65 Definición de "formas complejas" de la CLSP

[0065] Como se ha precisado previamente, las formas complejas conformes a la invención se representan por un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1, o un análogo a esta o un fragmento de esta.

5 [0066] Una forma compleja de la CLSP puede ser particularmente un multímero derivado de la asociación de por lo menos la proteína CLSP al completo o unos de sus fragmentos ya sea con ella misma, ya sea con uno de sus fragmentos, o incluso con al menos una proteína diana, incluso con al menos una estructura proteica de tipo capa cornificada proteolizada en el estrato córneo.

10 [0067] Los fragmentos de CLSP conformes a la invención son fragmentos que presentan una longitud y una actividad propicia para su aplicación en forma de un complejo según la invención.

[0068] De forma más particular, una forma compleja de la CLSP puede ser un dímero, e incluso más particularmente un homodímero de CLSP completa, o fragmentos de CLSP.

15 [0069] Según una forma de realización particular, un dímero conforme a la invención puede comprender un primer monómero representado por la proteína CLSP completa o uno de sus fragmentos, y un segundo monómero representado por una estructura diferenciada de la CLSP completa o uno de sus fragmentos.

20 [0070] En calidad de monómero representado por una estructura diferenciada de la CLSP completa o uno de sus fragmentos que puede ser conveniente para la invención se pueden citar las proteínas mencionadas anteriormente y los fragmentos de estas aptos para dimerizarse con la CLSP completa o uno de sus fragmentos.

25 [0071] Según otra forma de realización particular, una forma compleja conveniente para la invención puede comprender un péptido procedente de la CLSP y distinto de la secuencia de la CLSP completa, en particular distinto de la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1.

30 [0072] En particular, un péptido procedente de la CLSP conveniente para la invención puede ser un fragmento de la CLSP, y particularmente un fragmento de la proteína codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1, que comprende una longitud suficiente y una actividad biológica propicias para su aplicación en forma de un complejo según la invención.

35 [0073] En el sentido de la presente invención, por "fragmento de secuencia de ácidos nucleicos" se pretende designar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica en parte las formas complejas conforme a la invención, o un análogo de esta, y en particular una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1 o un análogo de esta.

40 [0074] Por "análogo de una secuencia de ácidos nucleicos" se pretende designar toda secuencia de ácidos nucleicos, eventualmente resultante de la degeneración del código de los ácidos nucleicos, y codificante para al menos una parte de las formas complejas con secuencia idéntica o análoga a la del polipéptido codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos.

45 [0075] Las secuencias de ácidos nucleicos pueden provenir de cualquier origen posible, ya sea animal, en particular de mamíferos y aún más particularmente de humanos, ya sea vegetal, ya sea de microorganismos (virus, fagos, bacterias entre otras) o incluso de hongos, sin prejuzgar el hecho que estén presentes de manera natural o no en dicho organismo de origen.

50 [0076] Según una variante de realización, las formas complejas según la invención pueden ser solubles.

[0077] En el sentido de la presente invención, el término "soluble" pretende calificar la facultad de la forma peptídica complejada y considerada según la invención para solubilizarse en agua o en un medio acuoso sin sustancias desnaturalizantes de proteínas de tipo agente caotrópico o detergentes iónicos, por ejemplo por oposición a la CLSP nativa, únicamente extraíble en presencia de tales agentes.

55 [0078] Según otra forma de realización, las formas complejas conforme a la invención derivan al menos en parte de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos está representada por completo o en parte por la SEC ID N° 2, o un análogo de esta, o un fragmento de esta.

60 [0079] En el sentido de la presente invención, por CLSP se pretende designar de manera general, excepto cuando se indique lo contrario, la secuencia (SEC ID N° 2) de la proteína que haya sufrido o no modificaciones postraduccionales de tipo glicosilación en los residuos de asparagina en la posición 25 y/o 43, de tipo fosforilación y/o de tipo miristilación, susceptibles de modificar su peso molecular aparente o su punto isoelectrónico.

65

[0080] Por otro lado, se sabe que la secuencia primaria de un polipéptido, es decir, la cadena de sus aminoácidos, determina sitios específicamente reconocidos por enzimas de tipo proteasa, tales como la tripsina, que, una vez el reconocimiento de estos sitios es efectivo, inducen la división del polipéptido por proteólisis. Esta proteólisis resulta en la generación de diversos péptidos, o fragmentos de proteólisis, de las formas complejas de la CLSP.

[0081] Los inventores han detectado la presencia de tales péptidos en el estrato córneo.

[0082] En consecuencia, la invención se extiende a las formas complejas que comprenden al menos un fragmento de proteólisis de la CLSP de secuencia peptídica SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25.

[0083] De este modo, según una forma de realización particular, las formas complejas conformes a la invención derivan al menos de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos está representada por completo o en parte por una secuencia de aminoácidos elegida entre la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25 y sus mezclas.

[0084] Por "análogo de un polipéptido" se pretende designar todo polipéptido que presente una homología de secuencia, en particular respecto de una de las secuencias características de dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza.

[0085] Este análogo puede ser un agente peptidomimético.

[0086] La homología puede ser de por lo menos un 85%, por ejemplo de por lo menos un 90%, y por ejemplo de por lo menos un 95 %. La homología se puede determinar por comparación visual o mediante cualquier herramienta informática utilizada habitualmente en el dominio, tal como los programas BLAST disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov y utilizados con los parámetros configurados por defecto.

[0087] La homología de secuencia puede resultar de modificaciones causadas por una mutación o variación en las secuencias de los péptidos según la invención, provenientes o bien de la eliminación de uno o varios aminoácidos, o de la inserción de uno o varios aminoácidos, o bien de la sustitución de uno o varios aminoácidos en las secuencias características de un polipéptido según la invención.

[0088] En el contexto de la invención, por "fragmento" se pretende designar cualquier porción peptídica que comprenda al menos 4, al menos 6, en particular al menos 8, y particularmente al menos 12 aminoácidos consecutivos de la proteína CLSP, y una actividad biológica sensiblemente similar.

[0089] De manera general, los análogos polipeptídicos pueden comprender sustituciones conservadoras con respecto a la secuencia de aminoácidos natural.

[0090] Varias de estas modificaciones se pueden combinar.

[0091] Como ejemplo de mutaciones que se pueden tener en cuenta en la presente invención, se puede mencionar, de manera no exhaustiva, la sustitución de uno o varios residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos que tienen un índice hidropático similar sin, no obstante, afectar de manera sensible a las propiedades biológicas de las formas complejas según la invención.

[0092] El índice hidropático es un índice atribuido a los aminoácidos en función de su hidrofobicidad y de su carga (Kyte et al. (1982), J. Mol. Biol., 157: 105).

[0093] Las formas complejas igualmente consideradas por la presente invención pueden derivar de polipéptidos tales como los definidos anteriormente que han sufrido una o varias modificación(es) postraduccionales(es).

[0094] Por "modificación(es) postraduccionales(es)" se pretende englobar el conjunto de las modificaciones que un péptido o una proteína es susceptible de sufrir al final de su síntesis en una célula, tal y como, por ejemplo, una o varias fosforilación(es), una o varias tiolación(es), una o varias acetilación(es), una o varias glicosilación(es), una o varias lipidación(es), tales como una miristilación, una reorganización estructural de tipo formación de puentes disulfuro y/o de tipo escisión dentro de la secuencia peptídica.

[0095] El análogo presenta, además, sensiblemente la misma actividad biológica que el polipéptido natural.

[0096] Según una forma de realización, las formas complejas convenientes para la ejecución de la invención también pueden derivar de polipéptidos naturales o sintéticos, en su caso susceptibles de ser obtenidos después de lisis enzimática o química de la forma nativa de la CLSP o por síntesis química o biológica o por extracción a partir de un tejido biológico, como por ejemplo la piel, que expresan de forma natural estas formas complejas, así como sus distintas formas postraduccionales.

[0097] El experto en la técnica puede obtener las formas complejas conforme a la invención mediante procedimientos a base de ADN recombinante, como por ejemplo los descritos en el manual "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2nd edition), Sambrook et al., 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY, (Sambrook).

[0098] Según otra forma de realización, las formas complejas convenientes para la ejecución de la invención también se pueden fusionar con otro polipéptido distinto de los identificados previamente, un agente de cribado hidrófilo o hidrófobo, un precursor de bioconversión, un agente de marcaje luminescente, radioactivo o colorimétrico.

[0099] De manera no limitativa, como ejemplo de compuestos susceptibles de ser acoplados con las formas complejas conforme a la invención se pueden citar las proteínas fluorescentes como la "proteína verde fluorescente", los compuestos químicos fluorescentes tales como la rodamina, la fluoresceína, o el Texas Red®, los compuestos fosforescentes, los elementos radioactivos, tales como ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{121}I o ^{125}I , o los agentes de marcaje colorimétrico como los sustratos cromógenos sensibles a la acción de la galactosidasa, de la peroxidasa, de la cloranfenicol acetiltransferasa, de la luciferasa o de la fosfatasa alcalina.

[0100] Según la naturaleza de los compuestos susceptibles de ser acoplados con las formas complejas conforme a la invención, el acoplamiento se puede llevar a cabo mediante procedimientos químicos, particularmente mediante funciones químicas reactivas o a través de procedimientos de biología molecular conocidos por el experto en la técnica.

[0101] En calidad de métodos de detección de un polipéptido, se puede mencionar el Western blot, el Slot blot, el Dot blot, los métodos ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) de tipo singleplex o multiplex, métodos de proteómica o de glicómica, coloración de polipéptidos en un gel de poliacrilamida mediante un colorante a base de plata, por azul de Coomassie o por SYPRO, inmunofluorescencia, absorción UV, métodos inmunohistoquímicos en microscopía tradicional, electrónica o confocal, FRET (fluorescence resonance energy/transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), métodos de TR-FRET (time resolved FRET/FRET con resolución temporal), métodos de FLIM (fluorescencia lifetime imaging microscopy/obtención de imágenes por microscopía en tiempo de fluorescencia), los métodos de FSPIM (fluorescence lifetime imaging microscopy/obtención de imágenes por microscopía de tiempo de vida de fluorescencia), métodos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching/recuperación de fluorescencia después de 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 de focalización isoelectrica y ensayos enzimáticos, métodos que utilizan chips de péptidos, chips de azúcar, chips de anticuerpos, métodos de espectrometría de masa, métodos de espectrometría de tipo SELDI-TOF (CIPHERGEN).

[0102] Como se extrae de lo que sigue, se da preferencia a la detección de las formas complejas según la invención según un método ELISA.

Uso de formas complejas según la invención, con el fin de diagnosticar un estado de la epidermis y/o de cribado de activos antienviejimiento.

[0103] Como se ha precisado previamente, la presente invención se refiere según otro de sus aspectos a procedimientos no invasivos para caracterizar, particularmente de manera *in vitro* o *ex vivo*, el estado de superficie de una epidermis no patológica o incluso la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico para caracterizar cualitativamente o cuantitativamente la expresión de formas complejas formadas al menos en parte por la CLSP, por uno de sus derivados o fragmentos.

[0104] Estos procedimientos son particularmente ventajosos en la medida en que su ejecución no necesita recurrir obligatoriamente a una técnica operatoria para proceder a tal caracterización.

[0105] Los procedimientos según la invención, descritos a continuación, se pueden efectuar en una muestra, por ejemplo aislada, de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un individuo.

[0106] El procedimiento según la invención también se puede efectuar sobre una muestra de epitelio, y particularmente de epidermis, tomada de un modelo celular epitelial, y particularmente epidérmico, o de una piel aislada reconstruida con el fin de calificar su estado.

[0107] De este modo, se puede obtener un extracto de la epidermis por simple *stripping* y analizarlo directamente por el método ELISA tal como se describe en el ejemplo 1, a continuación.

5 [0108] La técnica del *stripping* consiste en aplicar una superficie adhesiva a la superficie de la epidermis, como Blenderm® de 3M, D'squam (adhesivo comercial de CuDERM), el adhesivo cianoacrilato. Gracias a estos *strippings*, los corneocitos adherentes y el contenido de sus espacios intercelulares se pueden tomar y después someter a una extracción que permite tener acceso al contenido proteico.

10 [0109] La toma de una muestra conveniente para el procedimiento también se puede efectuar de manera más directa mediante "lavados" de la superficie cutánea por medio de, por ejemplo, accesorios de tipo turbina de paletas, de tipo célula 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 en la superficie de la piel.

15 [0110] A título indicativo de otros métodos de extracción adaptados a la ejecución de la invención, se puede mencionar los métodos por raspado de la parte superior del estrato córneo mediante un sistema bilámina o biopsia por rasurado. Esta técnica permite recoger escamas que a continuación se pueden analizar directamente mediante diferentes técnicas para determinar los índices de minerales, aminoácidos o lípidos.

20 [0111] Tras la extracción, la muestra se caracteriza con el método ELISA.

[0112] Este método reside particularmente en la aplicación de anticuerpos apropiados para la detección de formas complejas consideradas según la invención. Un anticuerpo susceptible de ser utilizado como herramienta de evaluación de un estado de una epidermis se puede obtener mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, tal como se describe en "Antibodies: A Laboratory Manual », Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

25

[0113] Tal y como se describe en el ejemplo 1 siguiente, el método de detección de las formas complejas de la CLSP requiere particularmente el uso de dos tipos de anticuerpos monoclonales, desarrollados por la empresa covalAb, a saber un anticuerpo de captura (clon DB15C9) y un anticuerpo de selección marcado "sulfo-tag" (clon de CLSP DB7g12).

30

Procedimiento de diagnóstico de un estado de la epidermis

35 [0114] Según una forma de realización, un procedimiento diagnóstico *in vitro* o *ex vivo* de un estado de un epitelio, por ejemplo una epidermis, comprende al menos las etapas consistentes en:

- a) determinar, en una muestra de superficie de dicho epitelio, un contenido de al menos una forma compleja conforme a la invención, y
 - b) comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un dato de referencia.
- 40

[0115] Ventajosamente, un procedimiento de la invención es no invasivo.

45 [0116] Un dato de referencia puede ser, por ejemplo, un contenido de formas complejas determinado en una muestra de epidermis tomada de un epitelio, y particularmente una piel normal, es decir, satisfactoria en el plano fisiológico, a la imagen por ejemplo de una piel joven.

[0117] La medición de un valor de referencia se puede efectuar paralela o secuencialmente a la determinación de dicho contenido de dichas formas complejas.

50 [0118] Una comparación de un contenido determinado con un valor de referencia puede permitir evaluar una desviación con respecto a este valor.

[0119] El análisis de la intensidad y/o de la naturaleza de esta desviación (negativa o positiva) puede ser informativa del estado de la epidermis.

55

[0120] La caracterización de un estado de una epidermis puede ser indicativa de un eventual trastorno cutáneo que se puede corregir con el uso de compuestos susceptibles de modular la expresión de las formas complejas consideradas en la invención.

60 [0121] De este modo, una disminución de la(s) forma(s) compleja(s) de la invención es indicativa de un estado de envejecimiento cronológico.

65 [0122] Un procedimiento según la invención se puede aplicar en un procedimiento de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo* de un estado fisiológico de un epitelio, y particularmente de la epidermis, con el fin particular de apreciar su estado de envejecimiento cronobiológico y, por ejemplo, sus carencias y/o alteraciones asociadas en un individuo.

Cribado de compuestos biológicos o químicos

5 [0123] La presente invención se refiere al uso de las formas complejas conforme a la invención como herramienta de cribado de compuestos biológicos o químicos susceptibles de favorecer el aumento y/o la estabilidad y/o la actividad biológica de estas formas complejas.

10 [0124] La presente invención también se refiere a un procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de activos antienvjecimiento que comprende al menos las etapas consistentes en:

- 15 a) poner en contacto, con al menos un activo antienvjecimiento que se desee testar, al menos un tipo celular que contenga al menos una forma compleja conforme a la invención en condiciones propicias para la expresión de dicha forma compleja,
b) determinar un contenido de dicha forma compleja, y
c) comparar dicha contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma compleja determinado en ausencia del compuesto químico o biológico que se desea testar.

20 [0125] La comparación efectuada en la etapa c) puede permitir deducir una información en cuanto a la propiedad de dicho compuesto testado para modular la expresión de las formas complejas conforme a la invención.

[0126] Como se ha precisado antes, este procedimiento puede comprender además una etapa destinada a retener los activos para los cuales se observa un aumento del contenido de la(s) forma(s) compleja(s).

25 [0127] De forma más particular, el procedimiento útil para caracterizar la eficacia de un tratamiento susceptible de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo de un individuo puede comprender al menos las etapas consistentes en:

- 30 i. Disponer de por lo menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
ii. Cuantificar al nivel de dicha muestra, particularmente mediante la técnica de dosificación ELISA expuesta en el ejemplo 1, al menos una forma compleja considerada en la presente invención,
iii. Repetir las etapas i. y ii. en una segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
y
iv. Comparar los resultados obtenidos tras las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de deducir una información relativa a al menos un efecto del tratamiento,

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

40 [0128] En el supuesto de que una medición de valor de referencia se efectúe previamente a la aplicación del compuesto biológico o químico o del factor físicoquímico por testar, el método según la invención puede permitir además, en su caso, la eficacia potencial de dicho compuesto.

[0129] Esta cantidad puede no verse afectada por la presencia de dicho compuesto o, por el contrario, ser inhibida o estimulada.

45 [0130] En caso de que se constate un aumento, el compuesto testado es susceptible de ser utilizado, por ejemplo, como activo antienvjecimiento.

50 [0131] Según una variante de realización, los procedimientos tal como se han definido antes pueden comprender además al menos una etapa que consiste en administrar a un individuo una composición de cuidado cosmético establecida o seleccionada conforme a la información obtenida tras la etapa iv.

[0132] La determinación de un contenido de formas complejas conforme a la invención se efectúa mediante un método ELISA, particularmente el descrito específicamente en el ejemplo 1, a continuación.

55 [0133] Las formas complejas de la CLSP tal como se han descrito previamente se pueden utilizar en una composición cosmética o terapéutica.

[0134] Se entiende que el conjunto de las composiciones cosméticas o terapéuticas consideradas utilizan un medio fisiológicamente aceptable.

60 [0135] En el sentido de la presente invención, por "medio fisiológicamente aceptable" se pretende designar un medio conveniente para la aplicación de una composición a un epitelio o una materia queratínica, tal como la piel, el cuero cabelludo, los labios, las mucosas y las fibras queratínicas como los cabellos, las uñas y los pelos, o según el caso por vía oral o parenteral.

65

[0136] En el contexto de la invención, por "cosmético/a" se pretende designar un uso destinado, principalmente, a procurar un efecto estético y/o de confort.

5 [0137] En el sentido de la presente invención, por "terapéutico/a" se pretende designar una composición que se puede utilizar en el marco de un tratamiento profiláctico y/o curativo, o de un método de evaluación de un estado de un epitelio, y particularmente de la epidermis.

[0138] Por "profiláctico/a" o "preventivo/a" en el contexto de la invención se entiende la disminución del riesgo de aparición de un fenómeno, por ejemplo una patología.

10 [0139] Según otra forma de realización, una composición cosmética o terapéutica puede comprender, además, al menos un agente activo cosmético y/o terapéutico.

15 [0140] Como ejemplos de agentes activos utilizables en el marco de la presente invención, se puede mencionar los aceites cosméticos, tales como los aceites de silicona, los aceites vegetales de tipo triglicéridos, los aceites hidrocarbonados tales como el aceite de Parleam y los ésteres de ácidos grasos y de alcohol graso.

20 [0141] También se pueden utilizar otros agentes activos que permiten mejorar el estado de la piel, tales como activos hidratantes o agentes activos que permiten mejorar la barrera lipídica natural, tales como las ceramidas, los sulfatos de colesterol y/o los ácidos grasos, y sus mezclas.

[0142] También se pueden utilizar enzimas que tienen una actividad sobre la piel, tales como proteasas, lipasas, glucosidasas, amidasas, cerebrosidasas y/o melanasas, y sus mezclas.

25 [0143] En general, cualquier composición se puede aplicar en la piel (en cualquier zona cutánea del cuerpo) o en las mucosas (bucal, malar, gingival, genital, conjuntival, ...).

30 [0144] De manera conocida, una composición cosmética puede contener también adyuvantes habituales en el dominio cosmético, tales como gelificantes hidrófilos o lipófilos, aditivos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, perfumes, cargas, filtros, absorbentes de olor y materias colorantes.

[0145] Las cantidades de los diferentes componentes de las composiciones son las que se utilizan habitualmente en los dominios considerados.

35 [0146] La cantidad de forma(s) compleja(s) conforme(s) a la invención contenida en una composición, también denominada "cantidad eficaz", depende, por supuesto, de la naturaleza del compuesto y del efecto deseado y, por lo tanto, puede variar en gran medida.

40 [0147] Para dar un orden de magnitud, una composición puede contener una forma compleja según la invención en una cantidad que represente del 0,00001 % al 50 % del peso total de la composición, en particular en una cantidad que represente del 0,001 % al 10 % del peso total de la composición, y particularmente en una cantidad que represente del 0,1 % al 1 % del peso total de la composición.

45 [0148] Una composición puede estar destinada de forma más particular a la reducción y/o al tratamiento de afecciones susceptibles de deteriorar el estado de un epitelio, y particularmente de una epidermis.

[0149] Dicho estado puede ser de origen cronológico (es decir, relacionado con el tiempo transcurrido, al igual que el envejecimiento cutáneo) y/o indicativo de un trastorno cutáneo, ligado, por ejemplo, al fotoenvejecimiento.

50 [0150] De este modo, una composición, particularmente cosmética, puede estar destinada en particular a prevenir y/o tratar un adelgazamiento de una epidermis y/o una pérdida de firmeza, de elasticidad, de densidad y/o de tonicidad de una epidermis y/o la formación de arrugas y arrugas superficiales.

55 [0151] Según otra forma de realización, una composición, en particular cosmética, puede estar destinada particularmente a prevenir y/o a tratar signos cutáneos de sequedad, en particular a prevenir y/o a tratar una deshidratación de una epidermis.

[0152] Según otra forma de realización, una composición, particularmente cosmética, puede estar destinada a prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento epidérmico.

60 [0153] Según otro aspecto, el presente texto se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético de los signos del envejecimiento cutáneo, que comprende al menos una etapa que consiste en aplicar sobre al menos una parte de la piel, las mucosas y/o las fibras queratínicas al menos una composición cosmética conforme a la invención.

65

[0154] Según otro aspecto más, el presente texto describe el uso, particularmente cosmético y/o terapéutico, de formas complejas de la proteína CLSP, de fragmentos peptídicos de esta proteína o de análogos de esta, o de un agente modulador de la actividad, de la expresión y/o de la estabilidad de un tal polipéptido, particularmente para prevenir los signos del envejecimiento cutáneo, particularmente para prevenir y/o tratar las pieles envejecidas.

[0155] El presente texto también describe el uso de una cantidad eficaz de formas complejas conforme a la invención para la preparación y/o la mejora de un modelo celular pluriestratificado, particularmente de tipo epidérmico o mucoso, y en particular un modelo de piel reconstruida.

[0156] Según el sentido del texto, por "modelo de piel reconstruida" se pretende designar un modelo en el cual están asociados diferentes tipos celulares, tales como particularmente los componentes naturales de la piel, a imagen, por ejemplo, de los queratinocitos, los fibroblastos, las células de Langerhans y los melanocitos.

[0157] Las células de tipo fibroblasto pueden ser irradiadas o no.

[0158] Tales modelos y su preparación son conocidos por el experto en la técnica.

[0159] De este modo, el presente texto también describe un procedimiento de preparación de una piel reconstruida aislada, que comprende al menos la etapa consistente en poner en contacto al menos una forma compleja según la invención con células capaces de generar una piel reconstruida aislada, y particularmente queratinocitos.

[0160] Los ejemplos y figuras que siguen se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Figura 1: ilustra la relación entre la edad y la cantidad de formas complejas según la invención presente al nivel de la piel del antebrazo y del rostro.

Figura 2: ilustra los efectos ligados a la aplicación de una composición cosmética, compuesta por un 10% de Bifidiobiotic (complejo CLR) y un 0,002% de Phytosphingosine-SLC (tratamiento "G") sobre la cantidad de formas complejas según la invención, al nivel de la piel del antebrazo y del rostro.

Ejemplo 1:

Desarrollo de un ensayo ELISA de alta sensibilidad que permite la dosificación de formas complejas de la CLSP conformes a la invención:

[0161] En esta prueba se utilizaron placas CLSP desarrolladas a medida con la tecnología MesoScale Discovery (MSD). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína recombinante CLSP "de longitud completa" fusionada con la GST fueron desarrollados por la empresa CovalAb (Lyon; Francia) (Mehul et 2006). El anticuerpo de captura (clon DB15C9) se depositó a una concentración de 200 µg/ml en una placa estándar de 96 pocillos de tipo "small spot (puntos pequeños)" (MesoScale).

[0162] Se estableció una curva de referencia (5 a 0,078 µg/ml) utilizando la proteína recombinante CLSP.

[0163] Cada placa se bloqueó con un tampón de bloqueo (MesoScale) durante 1 hora a temperatura ambiente. 25 µl de cada muestra y de estándares se depositaron por triplicado y se incubaron bajo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la placa se lavó 4 veces con tampón Tris (MesoScale). A continuación las placas se incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con 25 µl de anticuerpos de detección (MesoScale) marcados con "sulfo-tag" (clon de CLSP DB7g12) a una concentración de 1 µg/ml. Las placas se lavaron 4 veces con un tampón de Tris (MesoScale) antes de la adición de 150 µl de tampón 1 X "read buffer T" (MesoScale). Las placas se leyeron en el aparato "Sector Imager 6000". Los datos se estandarizaron en términos de ng de CLSP por µg de proteína total.

Ejemplo 2:

Caracterización del contenido de formas complejas de CLSP en diferentes muestras tomadas por stripping.

[0164] Esta caracterización se realiza con ayuda de la prueba ELISA descrita en el ejemplo 1.

[0165] Se llevaron a cabo dos estudios clínicos: un estudio de conocimiento (2 grupos de 20 sujetos mujeres, de piel caucásica: 30-35 años y 60-65 años) con tomas en el antebrazo y la cara, y un estudio llevado a cabo durante 56 días, o 2 meses (1 grupo de 24 sujetos mujeres, de piel caucásica, mayores de 40-45 años) con tomas efectuadas únicamente sobre el antebrazo.

[0166] El producto es un suero compuesto por un 10 % de Bifidiobiotic (complejo CLR) y 0,002 % de Phytosphingosine-SLC (tratamiento "G").

5 [0167] El complejo CLR se refiere a un lisado registrado con el nombre INCI: Bifidat ferment Lysate, con el nombre EINECS: Bifidobacterium longum, con el N° EINECS: N° 306-168-4 y con el N° CAS: N° 96507-89-0.

[0168] Un tal lisado es particularmente comercializado con el nombre Repair Complex CLR® por la empresa K. RICHTER GmbH.

10 [0169] La denominación Phytosphingosine-SLC corresponde a un derivado fitoesfingosina-salicilato comercializado por la empresa EVONIK GOLDSCHMIDT.

15 [0170] Para los dos estudios se realizaron tomas con D-Squame al nivel de la cara (mejilla) y del antebrazo (cara posterior). Las muestras obtenidas con Corneodiscs de D-Squame tomadas en el antebrazo sirvieron para la valoración de los efectos producidos.

A) Extracción de las proteínas de los Corneodiscs de D-Squame:

20 [0171] El Corneodisc se coloca en un tubo Eppendorf de 2 ml, con la cara adhesiva hacia adentro, al cual se agregan 550 µl de tampón de extracción llamado "Native+" (TBS, 1 % Triton X-100, 1M NaCl) y una bola de acero inoxidable por tubo. A continuación se coloca en los soportes del molino mezclador MM400 (Retsch). La extracción se realiza por molienda por vibración durante un ciclo de 2 min a 30 Htz. A continuación el medio se recupera y se filtra en una columna Millipore Ultrafree de 0,45 µm seguido de un centrifugado de 5 min a 5000 g a 4 °C. El sobrenadante se conserva a -20 °C a la espera de ser analizado.

25

B) Análisis estadístico

30 [0172] El análisis de los biomarcadores para los efectos de la edad (joven vs. mayor) y zona (brazo vs. rostro) se realiza con ayuda de un modelo mixto de análisis de varianza con los factores edad, zona, e interacción edad*zona como efectos fijos, y el factor sujeto como aleatorio. El efecto zona para una clase de edad y el efecto edad para una zona se realizaron con ayuda de contrastes.

35 [0173] El análisis de los biomarcadores, para el efecto tratamiento, se realiza con ayuda de un modelo mixto de análisis de varianza sobre las diferencias emparejadas Activo - Placebo con el factor tiempo como efecto fijo y el factor sujeto como efecto aleatorio.

[0174] El efecto tratamiento a J0 y J56 se testa con ayuda de contrastes.

40 [0175] Las variables, cuando fue necesario, se transformaron logarítmicamente por adelantado para hacer que su distribución fuera más Gaussiana.

[0176] Se utiliza el software SPSS versión 14 para los análisis descriptivos (gráficos de las medias y diagramas de caja), y el software SAS Enterprise Guide versión 3 para la parte inferencial.

45 [0177] El riesgo alfa de primera especie se fijó en 5 % con un enfoque bilateral.

[0178] Los resultados de estos dos estudios se ilustran en las figuras 1 y 2.

50 [0179] Los datos revelan una disminución de las formas complejas de la CLSP con la edad, tal como se representa en la figura 1.

[0180] El kit ELISA de alta sensibilidad desarrollado permite verificar con exactitud que la expresión de formas complejas de la CLSP disminuye con la edad.

55 [0181] Por su parte, la figura 2 representa el efecto del producto testado sobre la cantidad de formas complejas. Se constata de forma manifiesta un aumento significativo de la cantidad de formas complejas, lo que demuestra el efecto activador de este producto. Este último presenta, por lo tanto, un efecto antienvjecimiento real.

LISTADO DE SECUENCIAS

60

[0182]

<110> L'OREAL

65

<120> Utilización de formas complejas de la proteína de la piel similar a la calmodulina CLSP

<130> BR87468/96081/KLP/PLC/se

ES 2 669 298 T3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 858

5 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

aattcccgga tcctgcggc tgcctgcaact ctggaccacg agctctgaga gcagcagggt      60
gagggccggt gggcagcagc tcggaggctc cgcgagggtc aggagacgca ggcattggccg      120
gtgagctgac tcctgaggag gaggcccagt acaaaaaggc tttctccgcg gttgacacgg      180
atggaaacgg caccatcaat gcccaggagc tgggcgcggc gctgaaggcc acgggcaaga      240
acctctcgga ggcccagcta aggaaactca tctccgaggt tgacagcgac ggcgacggcg      300
aaatcagctt ccaggagttc ctgacggcgg caaggaaggc cagggccggc ctggaggacc      360
tgcaggtcgc cttccgcgcc ttcgaccagg atggcgacgg ccacatcacc gtggacgagc      420
tcaggcgggc catggcgggg ctggggcagc cgctgccgca ggaggagctg gacgccatga      480
tccgcgaggc cgacgtggac caggacgggc ggggtgaacta cgaggagttc gcgaggatgc      540
tcgcccagga gtgaggctcc ccgcctgtgt cccctggct gcgctctgag ccttcagggc      600
caccgcccgc tgctgctttt gtgctgggac tctccgggga aacctggtcg gtggatggga      660
aactgcctcc ccctgggagg aaggctttgc gctccggggc ctggatgagg cgccctcggg      720
ccgcctgcga gccctctctt gccttcagac cttgggcaga aggaggcctc cttgggcctg      780
gtcccccttt gccctgcagt ggaatgaggg ccccttaacc ccgcattgat ctaaataaag      840
10 gactgccgag ttccaaaa                                     858

```

<210> 2

<211> 146

15 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

Met Ala Gly Glu Leu Thr Pro Glu Glu Glu Ala Gln Tyr Lys Lys Ala
1           5           10           15
Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln Glu
20           25           30
Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Thr Gly Lys Asn Leu Ser Glu Ala Gln
35           40           45

```

ES 2 669 298 T3

Leu Arg Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile
 50 55 60

Ser Phe Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg Lys Ala Arg Ala Gly Leu
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Gln Val Ala Phe Arg Ala Phe Asp Gln Asp Gly Asp Gly
 85 90 95

His Ile Thr Val Asp Glu Leu Arg Arg Ala Met Ala Gly Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Leu Pro Gln Glu Glu Leu Asp Ala Met Ile Arg Glu Ala Asp Val
 115 120 125

Asp Gln Asp Gly Arg Val Asn Tyr Glu Glu Phe Ala Arg Met Leu Ala
 130 135 140

Gln Glu
 145

5 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 3

Ala Phe Asp Gln Asp Gly Asp Gly His Ile Thr Val Asp Glu Leu Arg
 1 5 10 15

15 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 4

Ala Phe Asp Gln Asp Gly Asp Gly His Ile Thr Val Asp Glu Leu Arg
 1 5 10 15

20 Arg
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

25 <400> 5

Ala Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln
 1 5 10 15

30 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 6

Ala Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln
 1 5 10 15

Glu Leu Gly Ala Ala Leu Lys
 20

5 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 7

Ala Gly Glu Leu Thr Pro Glu Glu Glu Ala Gln Tyr Lys
 1 5 10

15 <210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

20 <400> 8

Ala Gly Glu Leu Thr Pro Glu Glu Glu Ala Gln Tyr Lys Lys
 1 5 10

25 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 9

Ala Gly Leu Glu Asp Leu Gln Val Ala Phe Arg
 1 5 10

30 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10

Ala Met Ala Gly Leu Gly Gln Pro Leu Pro Gln Glu Glu Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Met Ile Arg

40 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

45 <400> 11

Glu Ala Asp Val Asp Gln Asp Gly Arg
 1 5

ES 2 669 298 T3

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

5

<400> 12

Lys Ala Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala
1 5 10 15

Gln Glu Leu Gly Ala Ala Leu Lys
20

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10

<400> 13

15

Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Gly Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe
1 5 10 15

Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg
20

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

20

<400> 14

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

25

<210> 15
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

30

<400> 15

Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe
1 5 10 15

Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Lys
20

<210> 16
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

35

<400> 16

40

Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe
1 5 10 15

Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg

20

5 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 17

Leu Ile Ser Glu Val Asp Gly Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg
 20

15 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 18

20 Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu
 1 5 10

25 <210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 19

Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Glu Phe Leu Thr Ala Ala Lys
 20

30 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

35 <400> 20

Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg
 20

40 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

45 <400> 21

Asn Leu Ser Glu Ala Gln Leu Arg
1 5

5 <210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 22

Asn Leu Ser Glu Ala Gln Leu Arg
1 5

15 <210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 23

20 Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn
1 5 10

25 <210> 24
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 24

Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln Glu Leu
1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Lys
20

30 <210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

35 <400> 25

Val Asn Tyr Glu Glu Phe Ala Arg
1 5

40

REIVINDICACIONES

1. Uso de por lo menos una forma compleja de la proteína de la piel similar a la calmodulina o CLSP representada por un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID N° 1, o un análogo que presenta una homología de secuencia de por lo menos el 85 % con dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza, o un fragmento de proteólisis de la CLSP de secuencia peptídica elegida de entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25, conjugado o bien con una proteína diferenciada de la CLSP, o con otra proteína CLSP, o con un fragmento de proteólisis de dicha otra proteína CLSP de secuencia peptídica elegida de entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25, como herramienta de caracterización *in vitro* o *ex vivo* de un estado de envejecimiento cronológico de un epitelio, una disminución de la(s) forma(s) compleja(s) siendo indicativa de un estado de envejecimiento cronológico.
2. Uso según la reivindicación 1, en el cual el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos representada por completo o en parte por una secuencia representada por la SEC ID N° 2, o un análogo a ésta que presente una homología de secuencia de por lo menos el 85 % con dicho polipéptido, así como una actividad biológica de la misma naturaleza.
3. Uso según la reivindicación 1, en el cual el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos representada por completo o en parte por una secuencia de aminoácidos elegida de entre SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la proteína diferenciada de dicho polipéptido es una proteína diana elegida de entre el polipéptido 14.3.3 Beta, 14.3.3 Sigma, las anexinas II y V, las calreticulinas, ERp72, la Nucleolina, la transglutaminasa 3, MAGED1 (gen antígeno del melanoma D1), PPP4C (proteína fosfatasa 4) y USF2 (factor de transcripción upstream 2), y el motivo YWHAQ (14.3.3 Tau).
5. Procedimiento, *in vitro* o *ex vivo*, de caracterización de un estado de un epitelio que comprende al menos las etapas consistentes en:
- determinar, en una muestra de superficie de dicho epitelio, un contenido de al menos una forma compleja tal y como se define según una de las reivindicaciones 1 a 4, y
 - comparar dicho contenido determinado en la etapa a) con un valor de referencia,
- siendo una disminución de la(s) forma(s) compleja(s) indicativa de un estado de envejecimiento cronológico.
6. Procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de activos antienvjecimiento que comprende al menos las etapas consistentes en:
- poner en contacto al menos un tipo celular que contiene al menos una forma compleja tal y como se define según una de las reivindicaciones 1 a 4, con al menos un activo antienvjecimiento que se desee testar, en condiciones propicias para la expresión de dicha forma compleja,
 - determinar un contenido de dicha forma compleja, y
 - comparar dicho contenido determinado en la etapa b) con un contenido de dicha forma compleja determinado en ausencia de compuesto químico o biológico que se desea testar,
- siendo un aumento de la(s) forma(s) compleja(s) tal y como se define según una de las reivindicaciones 1 a 4 indicativo de un activo dotado de propiedades antienvjecimiento.
7. Procedimiento cosmético *in vitro* o *ex vivo* para caracterizar la eficacia de un tratamiento cosmético o terapéutico para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo ligados al envejecimiento cronológico en un individuo, que comprende al menos la caracterización cuantitativa de por lo menos una forma compleja tal y como se define según una de las reivindicaciones 1 a 4, siendo un aumento de la(s) forma(s) compleja(s) indicativo de una eficacia de dicho tratamiento de los signos del envejecimiento cutáneo.

8. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo*, no terapéutico, para caracterizar la eficacia de un tratamiento susceptible de prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cronológico cutáneo de un individuo, que comprende al menos las etapas consistentes en:

- 5 i. Obtener por lo menos una primera muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo,
ii. Cuantificar al nivel de dicha muestra, particularmente mediante una técnica de dosificación ELISA, al
menos una forma compleja tal y como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
iii. Repetir las etapas i. y ii. en un segunda muestra de superficie cutánea representativa de dicho individuo, y
10 iv. Comparar los resultados obtenidos tras las etapas ii. y iii., particularmente con el fin de deducir una
información relativa a al menos un efecto de dicho tratamiento,

correspondiendo dichas primera y segunda muestras de superficie cutánea a diferentes estadios de tratamiento,
siendo un aumento de la(s) forma(s) compleja(s) indicativo de una eficacia de dicho tratamiento de los signos del
envejecimiento cronológico cutáneo.

- 15 9. Uso de por lo menos una forma compleja tal y como se define según una de las reivindicaciones 1 a 4 como
herramienta de cribado de compuestos biológicos o químicos susceptibles de favorecer el aumento y/o la
estabilidad y/o la actividad biológica de dichas formas complejas.

Figura 1

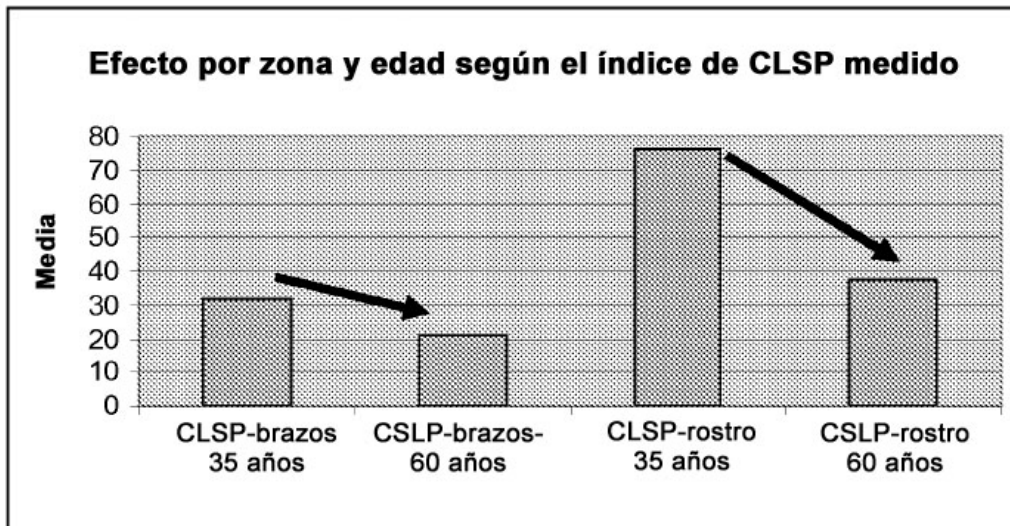


Figura 2

