



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 605**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06742745 .0**

96 Fecha de presentación : **28.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2015726**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54

Título: **Composición cosmética para estimular la síntesis de las proteínas de la membrana basal.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2011

73

Titular/es: **DSM IP ASSETS B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72

Inventor/es: **Heidl, Marc;**
Stöckli, Martin;
Imfeld, Dominik y
Ziegler, Hugo

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 605 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

La presente invención se refiere a una composición cosmética, en particular, a una composición cosmética que se puede aplicar por vía tópica, que contiene por lo menos dos derivados peptídicos determinados, para la estimulación de la síntesis de las moléculas de la membrana basal, en particular, las proteínas de la misma, así como a la utilización de dichos derivados peptídicos determinados para la estimulación de la síntesis de las moléculas de la membrana basal, en particular, de las proteínas de la misma.

La membrana basal (MB) en la unión dérmica-epidérmica desempeña varias funciones, de las cuales la función más evidente es la unión estrecha de la epidermis con la dermis, garantizando de esta manera la unión mecánicamente estable de las dos capas de tejidos. La "polaridad" y la estructura de la epidermis también se ven afectadas por la membrana basal, constituyendo la MB al mismo tiempo un límite claro entre la epidermis y la dermis. Se supone que la MB inicia la diferenciación epidérmica de los queratinocitos y mantiene el estado proliferativo de la capa celular basal. En condiciones normales, la MB impide también el contacto directo de las células epidérmicas con la dermis. Sin embargo, tras una lesión que daña la MB se produce un contacto directo con la dermis, provocando un cambio en el comportamiento de las células y la iniciación del proceso de curación de la lesión.

Otra función importante de la MB es la comunicación correcta entre las células epidérmicas y dérmicas. Puesto que la epidermis y la dermis no funcionan una independientemente de la otra, la homeostasis dérmica normal necesita un pasaje regular de señales bioquímicas en ambos sentidos entre los dos tipos de células. Por lo general, se trata de moléculas pequeñas que se preparan en un compartimento y deben transportarse de forma selectiva a través de la MB, con el fin de enviar su "mensaje" al otro lado. En este caso, la MB desempeña la función importante de actuar como filtro activo y transportar las moléculas señal conforme a la demanda o justamente bloquearlas. El funcionamiento correcto de la comunicación epidérmica-dérmica es esencial para la piel.

La propia MB, a su vez, puede dividirse en tres capas, la lámina lúcida, la lámina densa y la lámina reticular. La lámina lúcida es la región entre las células epidérmicas y la lámina densa y contiene los hemidesmosomas, que son visibles en el EM como placas electrodensas. Los hemidesmosomas unen los queratinocitos basales capaces de proliferación a la MB y están constituidos, entre otros, por colágeno XVII (o bp 180) y las integrinas alfa6/beta4. Deleciones en el colágeno XVII pueden dar lugar a una piel frágil con frecuente formación de ampollas (Epidermolysis Bullosa Simplex). La lámina densa es una estructura plana (lámina) constituida principalmente por colágeno IV.

Los componentes principales de la MB son proteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Uno de los componentes importantes del complejo de inmovilización es la laminina V. La laminina V es esencial, entre otras cosas, para la adhesión epidérmica al tejido dérmico, puesto que mutaciones en laminina V también pueden dar lugar a formas graves de formación de ampollas de la piel (Herlitz junctional epidermolysis bullosa). Por un lado, la laminina V une las integrinas alfa6/beta4 transmembranas de los hemidesmosomas y, por otro lado, la laminina V está unida al colágeno VII, que, a su vez, forma fibrillas de inmovilización en la dermis. El colágeno VII es el componente principal de la lámina reticular. Por tanto, las proteínas estructurales colágeno IV, VII, XVII así como laminina V y las integrinas alfa6/beta4, además de otras proteínas, son los componentes principales esenciales para la estructura de la MB así como de los hemidesmosomas y por ello importantes para las funciones correctas y versátiles de la MB en la piel.

Es conocido que el envejecimiento endógeno (debido a la edad) o exógeno (debido a la luz) se manifiesta en una degeneración irreversible de los tejidos, en particular de la piel, y se hace visible progresivamente de forma macroscópica en forma de arrugas, flacidez, superficie rugosa, pigmentación irregular, etc. Dichos cambios son una consecuencia de la reducción de las reacciones anabólicas (síntesis) y un incremento de las reacciones catabólicas (degradación) de colágenos, entre otros, también de los componentes de proteína de la MB. Los cambios histológicamente visibles son una acumulación de fibras de elastina acortadas, no estructuradas (elastosis), una reducción de las fibras de colágeno, infiltración de mediadores de infección, una atrofia de la epidermis con queratinocitos atípicos, no polares. Por ejemplo, el número de fibrillas de inmovilización de la MB a la dermis y la cantidad de colágeno VII por el cual están constituidas la fibrillas, disminuyen rápidamente en la piel envejecida debido a la luz, con lo cual la estabilidad de la unión de la MB a la dermis se ve alterada. Las demás proteínas de la MB se degradan también en parte en la piel cambiada por el envejecimiento, y la organización estructural de la MB degenera con los años.

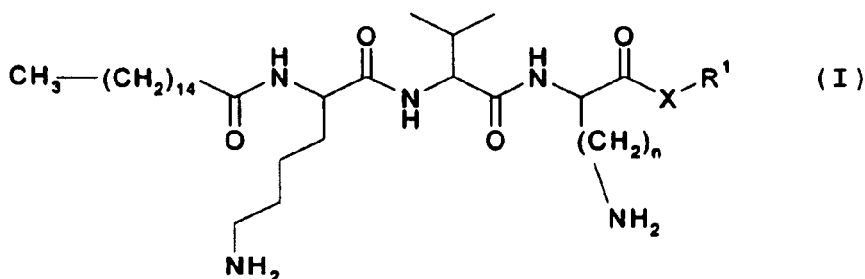
Las proteínas estructurales citadas de la MB se expresan predominantemente por medio de queratinocitos y en parte también por medio de fibroblastos. Las reacciones sintéticas en la matriz dérmica son reguladas principalmente por polipéptidos, los denominados factores de crecimiento y las citoquinas. Entre dichos péptidos, TGF- β 1 es uno de los reguladores más importantes involucrados en las reacciones sintéticas de dicha matriz dérmica. Es secretado también por los queratinocitos y los fibroblastos en la matriz. Los principios activos adicionados desde fuera, que pueden estimular la síntesis de las proteínas

MB, pueden compensar por un lado las degeneraciones debido a la edad y ya presentar también un efecto preventivo, frenando la disminución del contenido de las proteínas de la MB asociada al envejecimiento.

El documento WO 2004/099237 da a conocer tripéptidos para su utilización cosmética para el tratamiento del envejecimiento de la piel.

Ahora se ha hallado que sorprendentemente puede conseguirse una mejora sustancial del cuadro dérmico y una ralentización de la degradación de las proteínas de la MB debido a la edad si se utiliza una combinación de por lo menos un derivado de un tripéptido determinado, cosméticamente activo y por lo menos un derivado de un tetrapéptido determinado, cosméticamente activo (en adelante denominados "compuestos según la invención"), que están presentes en composiciones cosméticas aplicables por vía tópica. Esto se realiza haciendo que los compuestos según la invención difundan rápidamente y en una concentración suficiente por el estrato córneo y la epidermis al sitio de acción en el área límite entre la epidermis y la dermis, donde pueden efectuar una estimulación rápida y fuerte de la síntesis de las proteínas de la membrana basal. De esta forma, ha podido demostrarse que una combinación de por lo menos un derivado de un tripéptido determinado y por lo menos un derivado de un tetrapéptido determinado aumenta sustancialmente las concentraciones de colágeno IV, VII, XVII, laminina V y la de integrina beta4.

La presente invención se ha definido en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a una composición cosmética, en particular a una composición cosmética aplicable por vía tópica, que contiene por lo menos un compuesto de la fórmula general (I),



en la que

R^1 es H, C_1 - C_{20} -alquilo, cicloalquilo o arilo- C_1 - C_4 -alquilo,

n es 1-4,

X es -O-, -NH- o - NR^2 - y

R^2 es H o C_1 - C_{20} -alquilo,

así como por lo menos un compuesto según la fórmula (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido.

La presente invención se refiere también a la utilización de los compuestos de la fórmula (I) citada anteriormente juntos con los compuestos según la fórmula (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido, para la preparación de la composición definida anteriormente y a su utilización para la estimulación de la síntesis de las moléculas de la membrana basal, en particular de las proteínas de la misma.

La presente invención se refiere también a la utilización de los compuestos de la fórmula (I) citada anteriormente juntos con los compuestos según la fórmula (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido, para la estimulación de la síntesis de las moléculas de la membrana basal, en particular de las proteínas de la misma.

La presente invención se refiere también a los compuestos de la fórmula general (I) citada anteriormente en la que X significa - NR^2 - y tanto R^1 como R^2 es distinto de H, así como también a los compuestos según la fórmula general (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido, como tales.

En los compuestos de la fórmula (I) citada anteriormente y en los compuestos según la fórmula general (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido, los aminoácidos pueden estar presentes como racematos o en forma de los enantiómeros puros L y D.

Las expresiones generales utilizadas anteriormente se definen de la siguiente manera:

Por "alquilo", se entienden radicales de hidrocarburo saturados tanto lineales como ramificados. Entre los ejemplos, se incluyen metilo, etilo, propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-undecanilo, n-dodecanilo, n-tridecanilo, n-hexadecanilo, n-heptadecanilo, n-octadecanilo o n-nonadecanilo como radicales no ramificados e isopropilo, *terc.*-butilo, isobutilo, *sec.*-butilo, isoamilo como radicales ramificados.

Por "cicloalquilo", se entienden radicales de hidrocarburo saturados cíclicos con hasta 8 átomos de carbono, tales como por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

Por "arilo", se entienden radicales de hidrocarburo aromáticos mono- o policíclicos con hasta 10 átomos de carbono, que pueden estar mono- o polisustituidos por ejemplo con alquilo, alcoxi, halógeno y/o trifluorometilo, tales como por ejemplo fenilo, p-tolilo, o-tolilo, m-tolilo, 3,4-dimetoxifenilo, 2-naftilo o 3-naftilo. Además, "arilo" comprende también radicales de grupos heteroarilo, es decir, radicales heterocíclicos aromáticos, mono- o policíclicos, sustituidos adecuadamente o no sustituidos, tales como por ejemplo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-quinolinilo o 3-isoquinolinilo.

Los compuestos según la invención pueden formar sales mono- o polihídricas, uniformes o mixtas con ácidos, por ejemplo con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con ácidos carboxílicos adecuados, por ejemplo ácidos mono- o dicarboxílicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido ftálico, ácido cítrico, ácido láctico o ácido tartárico, o con ácidos carboxílicos aromáticos, tales como ácido benzoico o ácido salicílico, o con ácidos carboxílicos aromático-alifáticos, tal como ácido mandélico o ácido cinámico, o con ácidos heteroaromáticos, tal como ácido nicotínico, o con ácidos sulfónicos alifáticos o aromáticos, tal como ácido metanosulfónico o ácido toluenosulfónico. Se prefieren las sales dermatológicamente aceptables.

La fórmula general (I) comprende todas las formas isómeras, así como sus mezclas, por ejemplo, mezclas racémicas y mezclas de rotámeros.

Se prefieren las combinaciones de compuestos de la fórmula general (I) en la que R^1 es H o C_{1-20} -alquilo, n es 2 ó 4 y X es oxígeno, con compuestos según la fórmula general (I) en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X significa $-NH-$, es el radical de un alfa-aminoácido natural y n es 2.

Se prefieren en particular las combinaciones de compuestos de la siguiente Tabla 1:

- | | | |
|----|------|---|
| 30 | 1.1 | Palm-Lis-Val-Lis-OH |
| | 1.2 | Palm-Lis-Val-Orn-OH |
| | 1.3 | Palm-Lis-Val-Dab-OH |
| | 1.4 | Palm-Lis-Val-Dab-OMe |
| | 1.5 | Palm-Lis-Val-Dab-O-octilo |
| 35 | 1.6 | Palm-Lis-Val-Dab-O-cetilo |
| | 1.7 | Palm-Lis-Val-Dab-NH ₂ |
| | 1.8 | Palm-Lis-Val-Dab-NH-butilo |
| | 1.9 | Palm-Lis-Val-Dab-N(butilo) ₂ |
| | 1.10 | Palm-Lis-Val-Dab-NH-octilo |
| 40 | 1.11 | Palm-Lis-Val-Dab-N(octilo) ₂ |
| | 1.12 | Palm-Lis-Val-Dab-NH-cetilo |
| | 1.13 | Palm-Lis-Val-Dab-N(cetilo) ₂ o |
| | 1.14 | Palm-Lis-Val-Dap-OH |

con

- | | | |
|----|-----|-------------------------|
| 45 | 2.1 | Palm-Lis-Val-Lis-Ala-OH |
| | 2.2 | Palm-Lis-Val-Lis-Arg-OH |
| | 2.3 | Palm-Lis-Val-Lis-Gln-OH |

- 2.4 Palm-Lis-Val-Lis-Ser-OH
- 2.5 Palm-Lis-Val-Dab-Glu-OH
- 2.6 Palm-Lis-Val-Dab-Asp-OH
- 2.7 Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH
- 5 2.8 Palm-Lis-Val-Dab-Lis-OH
- 2.9 Palm-Lis-Val-Dab-Met-OH
- 2.10 Palm-Lis-Val-Dab-Asn-OH
- 2.11 Palm-Lis-Val-Dab-His-OH
- 2.12 Palm-Lis-Val-Dab-Nle-OH o
- 10 2.13 Palm-Lis-Val-Dab-Phe-OH

Los componentes de combinación más preferidos son Palm-Lis-Val-Dab-OH (1.3) y Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH (2.7).

Los compuestos según la invención pueden utilizarse en concentraciones que varían entre 0,5 y 5.000 ppm (p/p), preferentemente entre 1 y 1.000 ppm (p/p) en el producto final cosmético.

15 Los compuestos según la invención pueden utilizarse en forma de una solución, dispersión, emulsión o encapsulados en vehículos tales como macro-, micro- o nanocápsulas, en liposomas, quilomicrones, o encerrados en macro-, micro- o nanopartículas, o en microesponjas, o absortos en polímeros orgánicos pulverulentos, talco, bentonita y otros vehículos minerales.

20 Los compuestos según la invención pueden utilizarse en cualquier forma galénica: emulsiones aceite/agua y agua/aceite, leche, lociones, ungüentos, polímeros gelificantes y viscosos, tensoactivos y emulsificantes, pomadas, champúes, jabones, geles, polvos, sticks y lápices, sprays, aceites corporales, máscaras de la cara y parches.

25 Los compuestos según la invención pueden utilizarse juntos con cualquier otro ingrediente convencionalmente utilizado. Las composiciones de este tipo pueden contener lípidos de extracción y/o lípidos sintéticos, polímeros gelificantes y viscosos, tensoactivos y emulsificantes, principios activos solubles en agua o grasa, extractos de plantas, extractos de tejidos, extractos del mar, protectores solares, antioxidantes, agentes hidratantes y de barrera principios activos revitalizadores de la piel, principios activos para el cuidado de la piel adicionales o agentes protectores de la piel.

30 Los compuestos según la invención pueden utilizarse combinados con cualquier otro principio activo convencionalmente utilizado para el cuidado de la piel. Entre los ejemplos de los principios activos adicionales para el cuidado de la piel, pueden mencionarse principios activos antiarruga/principios activos antiatróficos. Las composiciones según la invención pueden contener una cantidad segura y eficaz de uno o más principios activos antiarruga o principios activos antiatróficos. Entre los principios activos antiarruga/principios activos antiatróficos que son aptos para ser utilizados en las composiciones según la invención, se incluyen D- y L-aminoácidos azufrados y sus derivados y sales, en particular los derivados N-acetilo, de los cuales N-acetilo-L-cisteína es un ejemplo preferido; tioles, hidroxilácidos (por ejemplo α -hidroxilácidos tales como ácido láctico y ácido glicólico y β -hidroxilácidos tales como ácido salicílico y derivados de ácido salicílico, tales como los derivados octanoilo), ácido fitínico, ácido lipónico, ácido lisofosfatídico; agentes de peeling de la piel (por ejemplo fenol y similares); compuestos de vitamina B₃ y retinoides, que mejoran las ventajas de la presente invención para el suavizado de la piel.

a) Compuestos de vitamina B₃:

45 Las composiciones según la invención pueden contener una cantidad segura y eficaz de un compuesto de vitamina B₃. Los compuestos de vitamina B₃ son particularmente útiles para la regulación del estado de la piel, tal como se ha descrito en la solicitud de patente US en trámite al mismo tiempo con el n° de referencia 08/8734.010, presentada el 11 de abril de 1997 (correspondiente a la publicación internacional WO 97/39733 A1 publicada el 30 de octubre de 1997). Entre los derivados ejemplares de los compuestos de vitamina B₃ citados, se incluyen ésteres del ácido nicotínico no vasodilatadores (por ejemplo nicotinato de tocoferilo), nicotinil-aminoácidos, ésteres de ácidos carboxílicos con alcoholes nicotinílicos, N-óxido de ácido nicotínico y N-óxido de niacinamida.

50 b) Retinoides:

Las composiciones según la invención pueden contener también un retinoide. Tal como se ha utilizado en la presente memoria, un "retinoide" comprende todos los compuestos análogos naturales y/o

sintéticos de vitamina A o de compuestos del tipo retinol que presentan la actividad biológica de vitamina A en la piel, así como los isómeros geométricos y stereoisómeros de dichos compuestos. Preferentemente, el retinoide es un retinol, un éster de retinol (por ejemplo un éster C₂- a C₂₂-alquilo de retinol, incluidos palmitato de retinilo, acetato de retinilo y propionato de retinilo), retinal y/o ácido retínico (incluidos el ácido all-trans-retínico y/o ácido 13-cis-retínico), en particular un retinoide distinto del ácido retínico. Otros retinoides aptos son retinoato de tocoferilo [éster de ácido retínico con tocoferol (trans o cis)], adaptaleno {ácido 6-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]-2-naftoico} y tazaroteno (6-[2-(4,4-dimetiltiocroman-6-il)-etnil]nicotinato de etilo). Los retinoides preferidos son retinol, palmitato de retinilo, acetato de retinilo, propionato de retinilo, retinal y combinaciones de los mismos. Las composiciones según la invención pueden contener una cantidad segura y eficaz del retinoide, con lo cual la composición resultante es segura y eficaz para la regulación del estado del tejido corneal, preferentemente para la regulación de discontinuidades visibles y/o sensibles de la piel, en particular para la regulación de indicios del envejecimiento de la piel, especialmente para la regulación de discontinuidades visibles y/o sensibles de la condición de la superficie de la piel que están relacionados con el envejecimiento de la piel.

c) Hidroxiácidos:

Las composiciones según la invención pueden contener una cantidad segura y eficaz de un hidroxiácido. Entre los hidroxiácidos preferidos para ser utilizados en las composiciones según la invención, se incluyen el ácido salicílico y derivados del ácido salicílico.

d) Péptidos

Las composiciones según la invención pueden contener por lo menos un péptido adicional, incluidos, pero no limitados a, di-, tri-, tetra-, penta- y hexapéptidos. Los péptidos de este tipo y/o sus derivados pueden adicionarse a las composiciones según la invención en cantidades seguras y eficaces. Tal como se ha utilizado en la presente memoria, el término "péptidos" se refiere tanto a los péptidos que ocurren naturalmente como a los péptidos sintetizados y comprende también los peptidomiméticos y complejos metálicos de "péptidos". Las composiciones peptídicas que ocurren naturalmente y las que están disponibles en el mercado son útiles también aquí.

Entre los dipéptidos aptos para ser utilizados en las preparaciones según la invención, se incluyen carnosina (β -Ala-His) y, entre los tripéptidos aptos, se incluyen Gli-His-Lis, Arg-Lis-Arg y His-Gli-Gli. Entre los tripéptidos preferidos y sus derivados, se incluyen palmitoilo-Gli-His-Lis, que puede comprarse como biopéptido CLTM (100 ppm de palmitoilo-Gli-His-Lis, disponible en el mercado de Sederma, Francia), péptido CK (Arg-Lis-Arg), péptido CK+ (Ac-Arg-Lis-Arg-NH₂) y β -Ala-Pro-Dab-NH-bencilo, que puede comprarse de de Pentapharm, Suiza, bajo el nombre de SYN[®]-AKE. Entre los tetrapéptidos aptos para ser utilizados en las preparaciones según la invención, se incluyen el péptido E, Arg-Ser-Arg-Lis. Entre los ejemplos de pentapéptidos aptos, se incluyen Matrixyl (palmitoilo-Lis-Tre-Tre-Lis-Ser), obtenible de Sederma, Francia, y los descritos en el documento WO 03/037933 (Pentapharm, Suiza). Un hexapéptido apto para ser utilizado es Argireline (Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂), preparado por Lipotec, España.

Los compuestos según la invención y las composiciones cosméticas que los contienen se utilizan para productos para el cuidado de la piel, en particular, para la mejora del cuadro dérmico y para contrarrestar los efectos adversos del envejecimiento de la piel, causados por la degradación de las proteínas de la membrana basal.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención sin limitarla. Las abreviaturas utilizadas en el texto y en los Ejemplos 1-9 son:

AcOH:	Ácido acético
ACN:	Acetonitrilo
AC:	Anticuerpo
Ala:	Alanina
Arg:	Arginina
Asn:	Asparagina
Asp:	Ácido aspártico
Boc:	terc.-Butiloxycarbonilo
BSA:	Seroalbúmina bovina
CTR:	Resina clorotritilo

5	Dab:	Ácido 2,4-diaminobutírico
	Dap:	Ácido 2,3-diaminopropiónico
	DBU:	1,8-Diazabicyclo[5,9,0]undec-7-eno (1,5-5)
	DCC:	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
	DCM:	Diclorometano
10	DIC:	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
	DIPEA:	Diisopropiletilamina
	DMEM:	Medio Eagle modificado de Dulbecco
	DMF:	Dimetilformamida
	ME:	Microscopio electrónico
15	EtOAc:	Acetato de etilo
	FCS:	Suero fetal bovino
	Fmoc:	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
	GF/A:	Microfiltro de fibras de vidrio
	Gln:	Glutamina
20	Glu:	Ácido glutámico
	HaCaT:	Queratinocitos inmortalizados humanos
	HOBt	1-Hidroxibenzotriazola
	Ile:	Isoleucina
	LH20:	Resina de exclusión por tamaño Amersham
25	Lis:	Lisina
	Met:	Metionina
	EM:	Espectrometría de masas
	NMM:	N-metilmorfolina
	RMN	Resonancia magnética nuclear
30	Nle:	Norleucina
	Orn:	Ornitina
	Palm:	Palmitoilo
	PBS:	Solución salina tamponada de fosfato
	PE:	Éter de petróleo
35	Fen:	Fenilalanina
	TA:	Temperatura ambiente
	Ser:	Serina
	tBu:	<i>terc.</i> -Butilo
	TBTU:	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	TCTU:	Hexafluorofosfato de O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
	TGF- β 1/2:	Factor de crecimiento de transformación β 1 o β 2

TFA:	Ácido trifluoroacético
THF:	Tetrahidrofurano
Tre:	Treonina
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween-20:	Solución de monolaurato de polietilenglicolsorbitol
Val:	Valina
Z	Benciloxycarbonilo

EJEMPLO 1: Determinación de la estimulación de la síntesis de laminina V en cultivos de células de queratinocitos de la línea de células HaCaT por tratamiento con los derivados de péptidos según la invención

La producción de laminina V por célula en queratinocitos HaCaT cultivados in vitro se detectó por medio de un ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En presencia de los principios activos peptídicos, se cuantificó el incremento de la producción de laminina V de las células, utilizando este método. Los queratinocitos HaCaT humanos eran un regalo del profesor Fusenig del Centro Alemán de Investigación de Cáncer en Heidelberg y se cultivaron en un medio de cultivo según los métodos estándares de cultivo celular. Tras un periodo de incubación de 72 horas con los péptidos correspondientes (principio activo), se realizó la determinación cuantitativa con un anticuerpo específico para laminina V. Después de determinar el contenido en laminina V, se determinó el número de células por medio de CyQUANT® de la empresa Molecular Probes. A partir de los valores individuales, se calculó el contenido en laminina V por célula como "units".

Material:

Medio cultivo:

- DMEM
- FCS al 10%
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomina

Tampón de lavado:

- Tris 0,05 M, pH 8,5
- NaCl 0,15 M
- BSA al 0,1%
- Tween-20 al 0,1%

Solución de dilución de AC:

- 50 ml de SuperBlock (37515; Pierce)
- 450 ml de H₂O
- Tween al 0,05%

Medio de prueba:

- DMEM
- ningún FCS
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomina

Solución de leche:

- Tampón de lavado
- Polvo de leche al 5%

Solución de sustrato:

- 1 ImmunoPure® OPD Tablet (34006; Pierce)
- 9 ml de H₂O
- 1 ml de Stable Peroxide Substr. Buffer, 10x (34062; Pierce)

Con la solución de dilución de AC, el anticuerpo nº 1 (P3H9-2; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se diluyó 1/60.000 y el anticuerpo nº 2 (31430; Socochem S.A.) 1/500.

Método:

Los queratinocitos se sembraron con una densidad de aproximadamente 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 3 días y se incubaron hasta su confluencia en el medio cultivo (37°C/CO₂ al 10%). El medio se reemplazó con el medio de prueba con tres concentraciones distintas de la sustancia de prueba. En cada placa, se ensayaron también los siguientes controles:

	<u>Controles negativos:</u>	<u>Controles positivos:</u>
	A)	A)
	- con células	- con células
	- sin AC nº 1, con AC nº 2	- con AC nº 1 y nº 2
5	B)	B)
	- sin células	- con células
	- con AC nº 1 y AC nº 2	- con AC nº 1 y nº 2
		- con 10 ng/ml de TGF-β2
10	C) Para cada péptido, se ensayó un pozo sin células, para excluir una unión no específica de las dos AC.	
	Las placas se incubaron durante otras 72 horas. Tras finalizar este periodo de incubación, la laminina V depositada se detectó y se cuantificó según el siguiente protocolo:	
	▪ Descartar el medio y lavar con 200 µl/pozo de PBS ▪ Fijar con 100 µl/pozo de metanol →15 min/TA/vibrador 600 rpm	
15	▪ Descartar metanol y bloquear con 200 µl/pozo de solución de leche →30 min/TA/vibrador 600 rpm ▪ Descartar solución de leche e incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 1 →2 h/TA/vibrador 600 rpm ▪ Descartar dil. de AC nº 1 y lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado	
20	▪ Incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 2 →3 h/TA/vibrador 600 rpm ▪ Descartar dil. de AC nº 2, lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado y una vez con 100 µl/pozo de PBS ▪ Adicionar 100 µl/pozo de solución de sustrato →15 min/TA/vibrador 600 rpm ▪ Parar la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ (2 M) y medir a 492 nm.	
25	▪ Se descartó la solución de coloración, se lavó la placa con H₂O bidest. y la mezcla resultante se congeló a -80°C durante aprox. 16 horas. ▪ La placa se descongeló, y el nº de células se midió por medio del ensayo CyQUANT siguiendo el procedimiento del fabricante.	
30	La producción de laminina V por célula se calculó según la siguiente fórmula: (Valor OD _{laminina} /Valor RFU _{nº de células}) x 100. Los valores calculados son unidades arbitrarias.	

Tabla 2: Estimulación de laminina V en el ensayo ELISA:

nº	Sustancia	Conc. [µmol/l]	Estimulación en %, relativo al control
	TGF-β (control positivo)	10 ng/ml	40-90
1.3	Palm-Lis-Val-Dab-OH	25 50 100	34-71 48-75 64-83
1.10	Palm-Lis-Val-Dab-NH-octilo	2,5 5,0 10,0	40-45 154-200 772-940
1.11	Palm-Lis-Val-Dab-N(octilo) ₂	0,25 0,5 1,0	15-31 28-31 32-75

EJEMPLO 2: Determinación de la estimulación de la síntesis de colágeno IV en cultivos de células de queratinocitos de la línea de células HaCaT por tratamiento con los derivados de péptidos según la invención

La producción de colágeno IV por célula en queratinocitos HaCaT cultivados in vitro se detectó por medio de un ensayo ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"). En presencia de los principios activos peptídicos, se cuantificó el incremento de la producción de colágeno IV de las células, utilizando este método. Los queratinocitos HaCaT humanos eran un regalo del profesor Fusenig del Centro Alemán de Investigación de Cáncer en Heidelberg y se cultivaron en un medio de cultivo según los métodos estándares de cultivo celular. Tras un periodo de incubación de 72 horas con los péptidos correspondientes (principios activos), se realizó la determinación cuantitativa con un anticuerpo específico para colágeno IV. Después de determinar el contenido en colágeno IV, se determinó el número de células por medio de CyQUANT® de la empresa Molecular Probes. A partir de los valores individuales, se calculó el contenido en colágeno IV por célula como "units".

Material:

Medio cultivo:

- DMEM
- FCS al 10%
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomycin

Tampón de lavado:

- Tris 0,05 M, pH 8,5
- NaCl 0,15 M
- BSA al 0,1%
- Tween-20 al 0,1%

Solución de dilución de AC:

- 50 ml de SuperBlock (37515; Pierce)
- 450 ml de H₂O
- Tween al 0,05%

Medio de prueba:

- DMEM
- ningún FCS
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomycin

Solución de leche:

- Tampón de lavado
- Polvo de leche al 5%

Solución de sustrato:

- 1 ImmunoPure® OPD Tablet (34006; Pierce)
- 9 ml de H₂O
- 1 ml de Stable Peroxide Substr. Buffer, 10x (34062; Pierce)

Con la solución de dilución de AC, el anticuerpo nº 1 (H-234; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se

diluyó 1/200 y el anticuerpo nº 2 (31460; Socochim S.A.) 1/500.

Método:

Los queratinocitos se sembraron con una densidad de aproximadamente 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 3 días y se incubaron hasta su confluencia en el medio cultivo (37°C/CO₂ al 10%). El medio se reemplazó con el medio de prueba con tres concentraciones distintas de la sustancia de prueba. En cada placa, se ensayaron también los siguientes controles:

Controles negativos:

Controles positivos:

A)

A)

- con células

- con células

- sin AC nº 1, con AC nº 2

- con AC nº 1 y nº 2

B)

B)

- sin células

- con células

- con AC nº 1 y AC nº 2

- con AC nº 1 y nº 2

- con 10 ng/ml de TGF-β2

C) Para cada péptido, se ensayó un pozo sin células, para excluir una unión no específica de las dos AC.

Las placas se incubaron durante otras 72 horas. Tras finalizar este periodo de incubación, el colágeno IV depositado se detectó y se cuantificó según el siguiente protocolo:

- Descartar el medio y lavar con 200 µl/pozo de PBS
- Fijar con 100 µl/pozo de metanol → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar metanol y bloquear con 200 µl/pozo de solución de leche → 30 min/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar solución de leche e incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 1 → 2 h/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar dil. de AC nº 1 y lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado
- Incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 2 → 3 h/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar dil. de AC nº 2, lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado y una vez con 100 µl/pozo de PBS
- Adicionar 100 µl/pozo de solución de sustrato → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Parar la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ (2 M) y medir a 492 nm.
- Se descartó la solución de coloración, se lavó la placa con H₂O bidest. y la mezcla resultante se congeló a -80°C durante aprox. 16 horas.
- La placa se descongeló, y el nº de células se midió por medio del ensayo CyQUANT siguiendo el procedimiento del fabricante.
- La producción de colágeno IV por célula se calculó según la siguiente fórmula:

$$(\text{Valor OD}_{\text{colágeno IV}} / \text{Valor RFU}_{\text{no. de células}}) \times 100$$

Los valores calculados son unidades arbitrarias.

En este ensayo, los compuestos 1.1, 1.10, 1.11 y 2.5-2.7 de la Tabla 1 demostraban una acción estimulante buena hasta muy buena.

EJEMPLO 3: Determinación de la estimulación de la síntesis de colágeno VII en cultivos de células de queratinocitos de la línea de células HaCaT por tratamiento con los derivados de péptidos según la invención

La producción de colágeno VII por célula en queratinocitos HaCaT cultivados in vitro se detectó por medio de un ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En presencia de los principios

activos peptídicos, se cuantificó el incremento de la producción de colágeno VII de las células, utilizando este método. Los queratinocitos HaCaT humanos eran un regalo del profesor Fusenig del Centro Alemán de Investigación de Cáncer en Heidelberg y se cultivaron en un medio de cultivo según los métodos estándares de cultivo celular. Tras un periodo de incubación de 72 horas con los péptidos correspondientes (principios activos), se realizó la determinación cuantitativa con un anticuerpo específico para colágeno VII. Después de determinar el contenido en colágeno VII, se determinó el número de células por medio de CyQUANT® de la empresa Molecular Probes. A partir de los valores individuales, se calculó el contenido en colágeno VII por célula como "units".

Material:

Medio cultivo:

- DMEM
- FCS al 10%
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomycin

Medio de prueba:

- DMEM
- ningún FCS
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomycin

Tampón de lavado:

- Tris 0,05 M, pH 8,5
- NaCl 0,15 M
- BSA al 0,1%
- Tween-20 al 0,1%

Solución de leche:

- Tampón de lavado
- Polvo de leche al 5%

Solución de dilución de AC:

- 50 ml de SuperBlock (37515; Pierce)
- 450 ml de H₂O
- Tween al 0,05%

Solución de sustrato:

- 1 ImmunoPure® OPD Tablet (34006; Pierce)
- 9 ml de H₂O
- 1 ml de Stable Peroxide Substr. Buffer, 10x (34062; Pierce)

Con la solución de dilución de AC, el anticuerpo nº 1 (C-16; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se diluyó 1/200 y el anticuerpo nº 2 (31402; Socochem S.A.) 1/500.

Método:

Los queratinocitos se sembraron con una densidad de aproximadamente 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 3 días y se incubaron hasta su confluencia en el medio cultivo (37°C/CO₂ al 10%). El medio se reemplazó con el medio de prueba con tres concentraciones distintas de la sustancia de prueba. En cada placa, se ensayaron también los siguientes controles:

Controles negativos:

- A)
- con células
 - sin AC nº 1, con AC nº 2
- B)
- sin células
 - con AC nº 1 y AC nº 2

Controles positivos:

- A)
- con células
 - con AC nº 1 y nº 2
- B)
- con células
 - con AC nº 1 y nº 2
 - con 10 ng/ml de TGF-β2

C) Para cada péptido, se ensayó un pozo sin células, para excluir una unión no específica de las dos AC.

Las placas se incubaron durante otras 72 horas. Tras finalizar este periodo de incubación, el colágeno VII depositado se detectó y se cuantificó según el siguiente protocolo:

- Descartar el medio y lavar con 200 µl/pozo de PBS
- Fijar con 100 µl/pozo de metanol →15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar metanol y bloquear con 200 µl/pozo de solución de leche →30 min/TA/vibrador 600 rpm
- 5 ▪ Descartar solución de leche e incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 1 →2 h/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar dil. de AC nº 1 y lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado
- Incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 2 →3 h/TA/vibrador 600 rpm
- 10 ▪ Descartar dil. de AC nº 2, lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado y una vez con 100 µl/pozo de PBS
- Adicionar 100 µl/pozo de solución de sustrato →15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Parar la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ (2 M) y medir a 492 nm.
- Se descartó la solución de coloración, se lavó la placa con H₂O bidest. y la mezcla resultante se congeló a -80°C durante aprox. 16 horas.
- 15 ▪ La placa se descongeló, y el nº de células se midió por medio del ensayo CyQUANT siguiendo el procedimiento del fabricante.
- La producción de colágeno VII por célula se calculó según la siguiente fórmula:

$$(\text{Valor OD}_{\text{colágeno VII}} / \text{Valor RFU}_{\text{no. de células}}) \times 100$$

Los valores calculados son unidades arbitrarias.

20 En este ensayo, los compuestos 1.10 y 2.5-2.7 de la Tabla 1 demostraban una acción estimulante buena hasta muy buena.

EJEMPLO 4: Determinación de la estimulación de la síntesis de integrina beta4 en cultivos de células de queratinocitos de la línea de células HaCaT por tratamiento con los derivados de péptidos según la invención

25 La producción de integrina beta4 por célula en queratinocitos HaCaT cultivados in vitro se detectó por medio de un ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En presencia de los principios activos peptídicos, se cuantificó el incremento de la producción de integrina beta4 de las células, utilizando este método. Los queratinocitos HaCaT humanos eran un regalo del profesor Fusenig del Centro Alemán de Investigación de Cáncer en Heidelberg y se cultivaron en un medio de cultivo según los métodos estándares de cultivo celular. Tras un periodo de incubación de 72 horas con los péptidos correspondientes (principio activo), se realizó la determinación cuantitativa con un anticuerpo específico para integrina beta4. Tras determinar el contenido en integrina beta4, se determinó el número de células por medio de CyQUANT® de la empresa Molecular Probes. A partir de los valores individuales, se calculó el contenido en integrina beta4 por célula como "units".

35 Material:

Medio cultivo:

- DMEM
- FCS al 10%
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomina

Medio de prueba:

- DMEM
- ningún FCS
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomina

Tampón de lavado:

- Tris 0,05 M, pH 8,5
- NaCl 0,15 M
- BSA al 0,1%
- Tween-20 al 0,1%

Solución de leche:

- Tampón de lavado
- Polvo de leche al 5%

Solución de dilución de AC:

Solución de sustrato:

- 50 ml de SuperBlock (37515; Pierce)

- 1 ImmunoPure® OPD

Tablet (34006; Pierce)

- 450 ml de H₂O

- 9 ml de H₂O

- Tween al 0,05%

- 1 ml de Stable Peroxide Substr. Buffer, 10x (34062; Pierce)

Con la solución de dilución de AC, el anticuerpo nº 1 (A9; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se diluyó 1/200 y el anticuerpo nº 2 (31430; Socochem S.A.) 1/500.

Método:

Los queratinocitos se sembraron con una densidad de aproximadamente 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 3 días y se incubaron hasta su confluencia en el medio cultivo (37°C/CO₂ al 10%). El medio se reemplazó con el medio de prueba con tres concentraciones distintas de la sustancia de prueba. En cada placa, se ensayaron también los siguientes controles:

Controles negativos:

Controles positivos:

A)

A)

- con células

- con células

- sin AC nº 1, con AC nº 2

- con AC nº 1 y nº 2

B)

B)

- sin células

- con células

- con AC nº 1 y AC nº 2

- con AC nº 1 y nº 2

- con 10 ng/ml de TGF-β2

C) Para cada péptido, se ensayó un pozo sin células, para excluir una unión no específica de las dos AC.

Las placas se incubaron durante otras 72 horas. Tras finalizar este periodo de incubación, la integrina β4 depositada se detectó y se cuantificó según el siguiente protocolo:

- Descartar el medio y lavar con 200 µl/pozo de PBS
- Fijar con 100 µl/pozo de metanol → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar metanol y bloquear con 200 µl/pozo de solución de leche → 30 min/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar solución de leche e incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 1 → 2 h/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar dil. de AC nº 1 y lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado
- Incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 2 → 3 h/TA/vibrador 600 rpm
- Descartar dil. de AC nº 2, lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado y una vez con 100 µl/pozo de PBS
- Adicionar 100 µl/pozo de solución de sustrato → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
- Parar la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ (2 M) y medir a 492 nm.
- Se descartó la solución de coloración, se lavó la placa con H₂O bidest. y la mezcla resultante se congeló a -80°C durante aprox. 16 horas.
- La placa se descongeló, y el nº de células se midió por medio del ensayo CyQUANT siguiendo el procedimiento del fabricante.
- La producción de integrina β4 por célula se calculó según la siguiente fórmula:

$$(\text{Valor OD}_{\text{integrina } \beta 4} / \text{Valor RFU}_{\text{no. de células}}) \times 100$$

Los valores calculados son unidades arbitrarias.

En este ensayo, los compuestos 1.1 y 2.5-2.7 de la Tabla 1 demostraban una acción estimulante buena hasta muy buena.

EJEMPLO 5: Determinación de la estimulación de la síntesis de colágeno XVII en cultivos de células de queratinocitos de la línea de células HaCaT por tratamiento con los derivados de péptidos según la invención

La producción de colágeno XVII por célula en queratinocitos HaCaT cultivados in vitro se detectó por medio de un ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En presencia de los principios activos peptídicos, se cuantificó el incremento de la producción de colágeno XVII de las células, utilizando este método. Los queratinocitos HaCaT humanos eran un regalo del profesor Fusenig del Centro Alemán de Investigación de Cáncer en Heidelberg y se cultivaron en un medio de cultivo según los métodos estándares de cultivo celular. Tras un periodo de incubación de 72 horas con los péptidos correspondientes (principios activos), se realizó la determinación cuantitativa con un anticuerpo específico para colágeno XVII. Después de determinar el contenido en colágeno XVII, se determinó el número de células por medio de CyQUANT® de la empresa Molecular Probes. A partir de los valores individuales, se calculó el contenido en colágeno XVII por célula como "units".

Material:

Medio cultivo:

- DMEM
- FCS al 10%
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomicina

Medio de prueba:

- DMEM
- ningún FCS
- 100 IU/ml de penicilina
- 0,1 mg/ml de estreptomicina

Tampón de lavado:

- Tris 0,05 M, pH 8,5
- NaCl 0,15 M
- BSA al 0,1%
- Tween-20 al 0,1%

Solución de leche:

- Tampón de lavado
- Polvo de leche al 5%

Solución de dilución de AC:

- 50 ml de SuperBlock (37515; Pierce)
- 450 ml de H₂O
- Tween al 0,05%
- 10x (34062; Pierce)

Solución de sustrato:

- 1 ImmunoPure® OPD Tablet (34006; Pierce)
- 9 ml de H₂O
- 1 ml de Stable Peroxide Substr. Buffer,

Con la solución de dilución de AC, el anticuerpo nº 1 (STO-115; Davids Biotechnologie) se diluyó 1/200 y el anticuerpo nº 2 (31430; Socochim S.A.) 1/500.

Método:

Los queratinocitos se sembraron con una densidad de aproximadamente 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 3 días y se incubaron hasta su confluencia en el medio cultivo (37°C/CO₂ al 10%). El medio se reemplazó con el medio de prueba con tres concentraciones distintas de la sustancia de prueba. En cada placa, se ensayaron también los siguientes controles:

Controles negativos:

- A)
- con células
- sin AC nº 1, con AC nº 2
- B)
- sin células
- con AC nº 1 y AC nº 2

Controles positivos:

- A)
- con células
- con AC nº 1 y nº 2
- B)
- con células
- con AC nº 1 y nº 2
- con 10 ng/ml de TGF-β2

C) Para cada péptido, se ensayó un pozo sin células, para excluir una unión no específica de los dos AC.

Las placas se incubaron durante otras 72 horas. Tras finalizar este periodo de incubación, el colágeno XVII depositado se detectó y se cuantificó según el siguiente protocolo:

- 5
 - Descartar el medio y lavar con 200 µl/pozo de PBS
 - Fijar con 100 µl/pozo de metanol → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
 - Descartar metanol y bloquear con 200 µl/pozo de solución de leche → 30 min/TA/vibrador 600 rpm
- 10
 - Descartar solución de leche e incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 1 → 2 h/TA/vibrador 600 rpm
 - Descartar dil. de AC nº 1 y lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado
 - Incubar con 100 µl/pozo de la dil. de AC nº 2 → 3 h/TA/vibrador 600 rpm
 - Descartar dil. de AC nº 2, lavar 3 veces con 200 µl/pozo del tampón de lavado y una vez con 100 µl/pozo de PBS
- 15
 - Adicionar 100 µl/pozo de solución de sustrato → 15 min/TA/vibrador 600 rpm
 - Parar la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ (2 M) y medir a 492 nm.
 - Se descartó la solución de coloración, se lavó la placa con H₂O bidest. y la mezcla resultante se congeló a -80°C durante aprox. 16 horas.
- 20
 - La placa se descongeló, y el nº de células se midió por medio del ensayo CyQUANT siguiendo el procedimiento del fabricante.
 - La producción de colágeno XVII por célula se calculó según la siguiente fórmula:

$$(\text{Valor OD}_{\text{colágeno XVII}} / \text{Valor RFU}_{\text{no. de células}}) \times 100$$

Los valores calculados son unidades arbitrarias.

En este ensayo, los compuestos 1.1, 1.10, 1.11 y 2.5-2.7 de la Tabla 1 demostraban una acción estimulante buena hasta muy buena.

EJEMPLO 6: Formulación de un ungüento

Procedimiento: Los ingredientes 1-5 (A) se calentaron a 70°C. Los ingredientes 6-7 (B) se calentaron a 75°C. B se adicionó a A con agitación, la mezcla resultante se enfrió a 50°C, se homogenizó y se enfrió a 30°C. A continuación, los ingredientes 8 y 9 (C) y los ingredientes 10 y 11 (D) se adicionaron uno por uno, y la mezcla se agitó en frío.

Número	Ingrediente	% p/p
1	(A) Tego Care 450	3,00
2	Alcohol cetearílico	2,25
3	Estearato de glicerilo	2,25
4	Cetiol 868	10,00
5	Esqualano	5,00
6	(B) Agua desionizada	66,995
7	Hialuronato sódico	5,00
8	(C) Glicerol	5,00
9	Phenonip	0,5
10	(D) Palm-Lis-Val-Dab-OH (1.3)	0,0025
11	Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH (2.7)	0,0025

EJEMPLO 7: Formulación de un gel

Procedimiento: Los ingredientes 2-6 (A) se disolvieron uno por uno en agua desionizada. El ingrediente (7) (B) se utilizó para ajustar el valor pH en 6,0. A continuación, los ingredientes 8 y 9 (C) se adicionaron.

5

Número	Ingrediente	% p/p
1	(A) Agua desionizada	92,095
2	1,3-Butanodiol	5,0
3	Phenonip	0,50
4	Abil B 8843	1,50
5	Carboximetilcelulosa	0,15
6	Carbopol Ultrez 10	0,75
7	(B) NaOH	
8	(C) Palm-Lis-Val-Dab-OH (1.3)	0,0025
9	Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH (2.7)	0,0025

EJEMPLO 8: Preparación de compuestos según la invención de la fórmula (I) en la que X significa -NR²- y tanto R¹ como R² es distinto de H y de compuestos según la invención de la fórmula (I) en la que, sin embargo, XR¹, cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido y de sales de los compuestos de este tipo.

10

El análisis de los eluados y productos obtenidos según este ejemplo se realizó por RMN de protones, HPLC-EM en electrospray o análisis elemental. Los compuestos pueden prepararse según los métodos conocidos de por sí descritos a continuación (procedimientos generales de M. Bodanszky "The Practice of Peptide Synthesis" Springer Verlag 2ª Edición 1994). De acuerdo con esto, el aminoácido, por ejemplo lisina, se unió en una síntesis en fase sólida al término carboxi de una resina, cuyo grupo amino se había protegido por un grupo protector, por ejemplo el grupo protector Fmoc. La cadena lateral se protegió, por ejemplo, con Boc o t-butilo. Según se requiera, los grupos protectores se eliminaron de forma selectiva, con el fin de ligar los demás derivados de aminoácidos utilizando los reactivos convencionales en la síntesis de péptidos hasta que se haya sintetizado completamente la secuencia deseada. A continuación, el péptido se disoció del término carboxi de la resina, y el péptido crudo se precipitó adicionándolo por goteo a una mezcla de disolventes adecuada. La mezcla se purificó por HPLC, se intercambiaron los contraiones en caso necesario y la sustancia se liofilizó.

15

20

EJEMPLO 8.1: Preparación de Palm-Lis(Boc)-Val-Dab(Boc)-Tre(tBu)-CTR en fase sólida

En 1,75 g (carga: 0,8 mmol/g) de resina de cloruro de 2-clorotritilo se sintetizaron por medio de uniones consecutivas peptídicas los aminoácidos protegidos Fmoc-Tre(tBu)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lis(Boc)-OH y ácido palmítico y por tanto el péptido protegido.

25

EJEMPLO 8.2: Preparación de Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH • 2TFA en fase sólida

El péptido se disoció de la resina por medio de un tratamiento de 30 minutos con 10 ml de TFA al 95%. La resina se separó por filtración, y la solución se adicionó por goteo a 100 ml de Et₂O. El precipitado formado se filtró por succión, se lavó y, después de secarlo, se purificó por medio de HPLC preparativo y después se liofilizó. Se obtuvieron 391 mg (34%) de un polvo incoloro. La masa teórica de 686 se confirmó encontrando 687.

30

EJEMPLO 8.3: Preparación de compuestos según la invención de la fórmula (I) en la que X significa -NR²- y tanto R¹ como R² es distinto de H

Los compuestos de este tipo pueden prepararse utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7 del documento WO 2004/099237 A1.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> DSM IP Assets B.V.
	<120> Composición cosmética para estimular la síntesis de las proteínas de la membrana basal
	<130> P15369EP00
5	<140> EP 06 742 745.0 - 1521
	<141> 2008-09-24
	<150> PCT/EP2006/003998
	<151> 2006-04-28
	<160> 13
10	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> Derivado tetrapéptido sintético
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Palm-Lis
	<400> 1
20	Lis Val Lis Ala
	1
	<210> 2
	<211> 4
	<212> PRT
25	<213> Derivado tetrapéptido sintético
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Palm-Lis
30	<400> 2
	Lis Val Lis Arg
	1
	<210> 3
	<211> 4
35	<212> PRT
	<213> Derivado tetrapéptido sintético
	<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Palm-Lis
 <400> 3
 5 **Lis Val Lis Gln**
 1
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Derivado tetrapéptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Palm-Lis
 15 <400> 4
 Lis Val Lis Ser
 1
 <210> 5
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> Derivado tetrapéptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 25 <223> Palm-Lis
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Dab
 30 <400> 5
 Lis Val Xaa Glu
 1
 <210> 6
 <211> 4
 35 <212> PRT
 <213> Derivado tetrapéptido sintético
 <220>

	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Palm-Lis
	<220>
5	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> Xaa es Dab
	<400> 6
	Lis Val Xaa Asp
10	1
	<210> 7
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> Derivado tetrapéptido sintético
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Palm-Lis
	<220>
20	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> Xaa es Dab
	<400> 7
	Lis Val Xaa Tre
25	1
	<210> 8
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> Derivado tetrapéptido sintético
30	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Palm-Lis
	<220>
35	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> Xaa es Dab

<400> 8

Lis Val Xaa Lis

1

<210> 9

5 <211> 4

<212> PRT

<213> derivado tetrapéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (1)..(1)

<223> Palm-Lis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa es Dab

<400> 9

Lis Val Xaa Met

1

<210> 10

20 <211> 4

<212> PRT

<213> derivado tetrapéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (1)..(1)

<223> Palm-Lis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

30 <223> Xaa es Dab

<400> 10

Lis Val Xaa Asn

1

<210> 11

35 <211> 4

<212> PRT

<213> derivado tetrapéptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Palm-Lis
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Dab
 <400> 11
 10 **Lis Val Xaa His**
 1
 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> derivado tetrapéptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Palm-Lis
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa en pos.3 es Dab y en pos. 4 es Nle
 <400> 12
 25 **Lis Val Xaa Xaa**
 1
 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> derivado tetrapéptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Palm-Lis
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dab

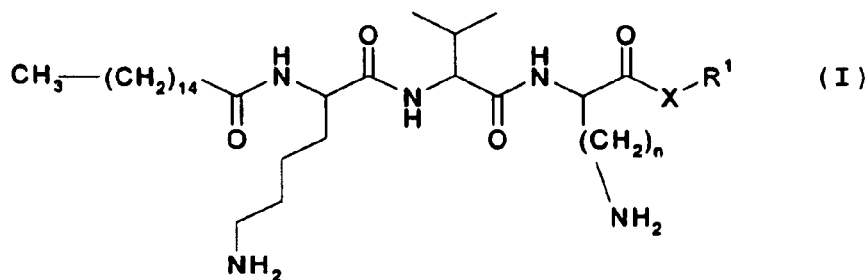
<400> 13

Lis Val Xaa Fen

1

REIVINDICACIONES

1. Composición, en particular una composición aplicable por vía tópica, que contiene por lo menos un compuesto de la fórmula general (I),



5 en la que
 R^1 es H, C_1 - C_{20} -alquilo, cicloalquilo con 8 C, como máximo, o arilo- C_1 - C_4 -alquilo con 10 C, como máximo, en la parte de alquilo,

n es 1-4,

X es -O-, -NH- o -NR²- y

10 R^2 es H o C_1 - C_{20} -alquilo,

así como por lo menos un compuesto según la fórmula (I) citada anteriormente, en la que, sin embargo, XR¹, cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque los compuestos definidos en la reivindicación 1 están presentes en forma de sales dermatológicamente aceptables.

15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque en los compuestos definidos en la reivindicación 1 los radicales de aminoácido están presentes como racematos o en sus enantiómeros puros de las formas L y D.

20 4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque un compuesto de la fórmula (I) definida en la reivindicación 1, en la que R^1 es H o C_1 - C_{20} -alquilo, n es 2 ó 4 y X es -O-, se combina con un compuesto según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1 en la que, sin embargo, XR¹, cuando X significa -NH-, es el radical de un alfa-aminoácido natural y n es 2.

5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada porque los componentes de la combinación son Palm-Lis-Val-Dab-OH y Palm-Lis-Val-Dab-Tre-OH.

25 6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la misma contiene los compuestos citados en dichas reivindicaciones en una concentración comprendida entre 0,5 y 5.000 ppm (p/p), preferentemente entre 1 y 1000 ppm (p/p).

30 7. Composición, en particular una composición aplicable por vía tópica, según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque contiene asimismo una cantidad segura y eficaz de por lo menos un principio activo adicional para el cuidado de la piel, seleccionado de entre el grupo constituido por los principios activos para la descamación, principios activos antiacné, compuestos de vitamina B₃, retinoides, di-, tri-, tetra-, penta- y hexapéptidos y derivados de los mismos, hidroxiácidos, captadores de radicales libres, inhibidores de infecciones, principios activos para el bronceado de la piel, blanqueadores para la piel, agentes contra la celulitis, flavonoides, principios activos antimicrobianos, agentes para la curación de la piel, principios activos antimicóticos, protectores contra el sol, farnesol, fitantriol, alantoína, glucosamina y mezclas de los mismos.

8. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque contiene asimismo un vehículo dermatológico.

40 9. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la misma contiene los compuestos eficaces en solución, como dispersión, como emulsión o encapsulados en vehículos, preferentemente como macro-, micro- o nanocápsulas, en liposomas o quilomicrones, o encerrados en macro-, micro- o nanopartículas o en microesponjas o absorbidos sobre polímeros orgánicos pulverulentos, talco, bentonita y vehículos minerales relacionados.

10. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque la misma está presente en forma de una emulsión (aceite/agua y agua/aceite), como leche, como loción, como ungüento,

en polímeros gelificantes y viscosos, tensoactivos y emulsificantes, como pomada, como champú, como jabón, como gel, como polvo, como stick o lápiz, como spray, como aceite corporal, como máscara de la cara o como parche.

- 5 11. Utilización no terapéutica de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10 como principio activo cosmético para la estimulación de la síntesis de laminina V, de la síntesis de colágeno IV, de la síntesis de colágeno VII, de la síntesis de colágeno XVII y/o de la síntesis de integrina $\beta 4$.
- 10 12. Utilización según la reivindicación 11 para la mejora de la piel flácida, rugosa, arrugada, causada por la degeneración endógena o exógena de la membrana basal.
- 10 13. Utilización según la reivindicación 11 y 12 para impedir la formación de piel flácida, rugosa, arrugada.
- 10 14. Utilización según una de las reivindicaciones 11 a 13 en combinación con por lo menos un principio activo adicional para el cuidado de la piel.
- 15 15. Compuestos según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1, en la que X significa $-NR^2-$ y tanto R^1 como R^2 es distinto de H.
- 15 16. Compuestos según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1, en la que, sin embargo, XR^1 , cuando X tiene el posible significado de $-NH-$, es el radical de un alfa-aminoácido.