

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 053**

51 Int. Cl.:

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2008 E 08805497 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2150267**

54 Título: **Composición cosmética y/o farmacéutica que comprende un principio activo capaz de activar el citocromo c**

30 Prioridad:

27.04.2007 FR 0703057

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**SOCIETE D'EXTRACTION DES PRINCIPES
ACTIFS S.A. (ISP VINCIENCE) (100.0%)
BP 212 655 ROUTE DU PIN MONTARD
06904 SOPHIA-ANTIPOLIS CEDEX, FR**

72 Inventor/es:

**DAL FARRA, CLAUDE;
DOMLOGE, NOUHA y
BOTTO, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 404 053 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

Composición cosmética y/o farmacéutica que comprende un principio activo capaz de activar el citocromo c.

5 La presente invención se sitúa en el ámbito cosmético y farmacéutico, y más particularmente en el ámbito de la dermatología. La presente invención se refiere a una composición cosmética o farmacéutica, y especialmente dermatológica, que comprende, en un medio fisiológicamente apto, un principio activo capaz de activar el citocromo c. Este principio activo está constituido por al menos un péptido, utilizado solo o en asociación con al menos otro principio activo. También se describe la utilización de una composición cosmética destinada a estimular las funciones de las mitocondrias y a aumentar el nivel energético celular. Asimismo, se describe un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a proteger la piel y los anexos cutáneos de las agresiones externas y a combatir el envejecimiento cutáneo.

15 El principio activo puede utilizarse igualmente para preparar composiciones farmacéuticas destinadas a prevenir o combatir las patologías relacionadas con disfuncionamientos mitocondriales; por ejemplo, determinadas degeneraciones neuromusculares o cardíacas, la diabetes de tipo II o incluso determinadas patologías del envejecimiento.

20 El término "anexos cutáneos" engloba al conjunto de los anexos queratínicos presentes en la superficie del cuerpo, en particular el vello, las pestañas, las cejas, las uñas y el cabello.

25 La piel es un órgano vital que recubre toda la superficie del cuerpo y asegura funciones protectoras, sensitivas, inmunitarias, metabólicas o incluso termorreguladoras. La piel, como los demás órganos, está sujeta al envejecimiento. Ahora bien, uno de los principales mecanismos implicados en los procesos del envejecimiento es la acumulación de daños oxidativos en moléculas esenciales como los lípidos membranales, las proteínas, el ADN y muy especialmente el ADN mitocondrial (ADNmt).

30 Los daños oxidativos son provocados por los radicales libres, especies químicamente inestables y muy reactivas generadas por el metabolismo intracelular o las agresiones externas. Entre esas agresiones externas pueden citarse: los rayos UV, las toxinas, los contaminantes atmosféricos y los oxidantes alimentarios. En la piel se observa un envejecimiento prematuro que sobreviene en las zonas expuestas a los rayos, que se caracteriza por fenómenos de alteraciones de las macromoléculas (peroxidación lipídica, carbonilación de las proteínas) que afectan en particular a la elastina, el colágeno o la fibronectina. Igualmente ha podido demostrarse un declive progresivo de las funciones mitocondriales con la edad, probablemente relacionado con la acumulación de mutaciones sobre el ADNmt (K. Singh, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1019, 2004).

35 Una de las consecuencias importantes de la acumulación de los daños oxidativos es una reducción de la capacidad de la célula para producir ATP (Porteous et al., Eur J Biochem 1998, 257(1):192-201). De este modo, el fenómeno del envejecimiento celular está en relación con los daños oxidativos que sufre la célula, pero también con el proceso de producción de energía que la célula necesita para sobrevivir.

40 El organismo posee mecanismos de defensa capaces de atrapar o de transformar a los radicales libres (enzimas, glutación, vitaminas A y E, coenzima Q10, etc.). Sin embargo, esos sistemas de defensa antioxidante suelen resultar insuficientes ante los numerosos tipos de estrés y agresiones externas a los que están sometidos los organismos y la piel en particular.

45 En ese contexto, las propiedades específicas del citocromo c resultan particularmente interesantes:

50 El citocromo c es una pequeña proteína soluble de 15 kDa que desempeña un papel fundamental en la función mitocondrial y en la supervivencia celular. El citocromo c es una molécula altamente conservada en la mayoría de las eucariotas; se la encuentra en las mitocondrias de las plantas, de los animales y de numerosos organismos unicelulares. El citocromo c presenta una estructura proteica organizada en torno a una porfirina, constituida por cuatro núcleos pirrol, unidos a su vez a un átomo de hierro.

55 El papel principal del citocromo c es asegurar la transferencia de electrones gracias al cambio de valencia del átomo de hierro. El citocromo c, que es soluble, transporta así los electrones desde el complejo III (coenzima QH₂-citocromo c reductasa) hasta el complejo IV (citocromo oxidasa). Los electrones, que son el sustrato del citocromo oxidasa, son transferidos entonces por la enzima hacia el oxígeno.

60 La búsqueda de compuestos capaces de estimular a las mitocondrias y aumentar el nivel energético celular para prevenir o combatir los signos de envejecimiento cutáneo, o los daños causados por las agresiones externas, como los rayos UV, las radiaciones o las exposiciones a toxinas o contaminantes, es una preocupación importante de la investigación médica y de la cosmética. Para ello se han propuesto soluciones como el aporte de sustancias implicadas en el metabolismo energético, y más particularmente intermediarias o cofactoras del ciclo de Krebs, como el fumarato, el L-malato, el acetil CoA (WO 02064129) o incluso el tratamiento de la piel con sustancias capaces de disminuir los radicales libres, como la vitamina C (US 2004/0086526) o la L-ergotioneína (WO 9836748). Se conocen igualmente los documentos EP1864996, WO0246416) WO9963236 y WO2007058625 que describen composiciones

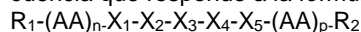
que comprenden péptidos que responden a la fórmula general (I), así como su utilización terapéutica. Pero según el conocimiento del solicitante, todavía no se ha descrito ninguna composición cosmética o farmacéutica que comprenda péptidos que respondan a la fórmula general (I) capaces de activar el citocromo c, ni la utilización de dichos péptidos en el ámbito cosmético o dermatológico.

En efecto, los investigadores han revelado una actividad cosmética y dermatológica de determinados péptidos que responden a la fórmula general (I) capaces de activar el citocromo c. En particular, se ha revelado que esos péptidos, cuando se aplican sobre la piel, estimulan de manera considerable las funciones mitocondriales. Ello fue demostrado, entre otras características, por un aumento de la expresión del citocromo c y un aumento de la síntesis de ATP. En términos más generales, este nuevo principio activo estimulador de las mitocondrias es capaz de proteger la piel de las agresiones externas, lo cual permite abrir nuevas perspectivas terapéuticas y cosméticas.

Se entiende por "principio activo capaz de proteger a la piel de las agresiones externas" toda sustancia capaz de presentar propiedades protectoras o de disminuir la apoptosis en células o tejidos sometidos a un estrés de origen físico-químico o medioambiental.

Se entiende por "principio activo capaz de activar el citocromo c" toda sustancia capaz de aumentar la expresión del citocromo c, mediante la activación de la síntesis proteica (por modulación directa o indirecta de la expresión génica del citocromo c), el aumento de la actividad biológica del citocromo c u otros procesos biológicos como la estabilización de la proteína citocromo c o incluso la estabilización de las transcripciones de ARN mensajero. Las sustancias capaces de activar el citocromo c según la invención son péptidos.

Así, el primer objetivo de la invención es una composición cosmética o dermatológica que comprende, en un medio fisiológicamente apto, péptidos capaces de activar el citocromo c, en tanto principio activo, solo o en asociación con al menos otro principio activo cuyo número de aminoácidos está comprendido entre 3 y 13, y que posee una secuencia que responde a la fórmula general (I)



En la cual

X₁ es la tirosina,

X₂ es la leucina,

X₃ es la lisina,

X₄ es la treonina, la serina, la lisina, la arginina o algún aminoácido,

X₅ es la valina, la alanina, la tirosina, la metionina o algún aminoácido,

AA representa un aminoácido cualquiera, o uno de sus derivados, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4.

R₁ representa la función amino primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que puede elegirse entre un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo.

R₂ representa la función hidroxilo del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que puede elegirse entre una cadena alquilo de C₁ a C₂₀, o un grupo NH₂, NHY o NYN con Y representando una cadena alquilo de C₁ a C₄ correspondiente a una de las secuencias siguientes:

(SEC. ID N° 1) Tir-Leu-Lis-Lis-Ala

(SEC. ID N° 2) Tir-Leu-Lis-Lis-Ala-NH₂

(SEC. ID N° 3) Tir-Leu-Lis-Lis-NH₂

(SEC. ID N° 4) Tir-Leu-Lis

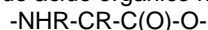
Según un modo de realización particularmente interesante, el péptido biológicamente activo corresponde a la secuencia SEC. ID N° 1.

Según otro modo de realización particularmente interesante, el péptido biológicamente activo corresponde a la secuencia SEC. ID N° 2.

También se describen formas homólogas de esas secuencias. El término "homóloga" designa toda secuencia peptídica idéntica en al menos el 50 %, o preferentemente en al menos el 80 %, e incluso más preferentemente en al menos el 90 % de dicha secuencia peptídica, elegida entre las secuencias SEC. ID N° 1 a SEC. ID N° 4. Por "secuencia peptídica idéntica en al menos el X %" se entiende designar un porcentaje de identidad entre los residuos de aminoácidos de las dos secuencias a comparar, obtenido después del alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo se obtiene con la ayuda de algoritmos de homologías locales como los utilizados por los programas informáticos BLAST P o T BLAST N disponibles en el sitio NCBI.

El término "homólogo" puede designar igualmente a un péptido que difiere de la secuencia de un péptido de secuencia SEC. ID N° 1 a SEC. ID N° 4 mediante la sustitución de aminoácidos químicamente equivalentes, es decir mediante la sustitución de un residuo por otro que posee las mismas características. Así, las sustituciones clásicas se realizan entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Tr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lis y Arg; o entre los residuos aromáticos Phe y Tir.

El término "aminoácido" se refiere aquí a todo ácido orgánico natural o no natural que tenga la fórmula:



donde cada -R se selecciona independientemente entre un hidrógeno y un grupo alquilo que tenga entre 1 y 12 átomos de carbono. Preferentemente, al menos un grupo de -R de cada aminoácido es un hidrógeno. Mediante el término "alquilo" se entiende aquí una cadena carbonada que puede ser lineal o ramificada (un enlace doble o triple en la cadena) o poliinsaturada (dos o varios enlaces dobles, dos o varios enlaces triples, uno o varios enlaces dobles y uno o varios enlaces triples en la cadena).

El término "péptido" designa a un encadenamiento de dos o varios aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o mediante enlaces peptídicos modificados, designando el término "polipéptido" a un péptido de tamaño más importante.

Por "péptido" debe entenderse el péptido natural o sintético de la invención tal como se describe anteriormente o al menos uno de sus fragmentos, ya sea obtenido mediante proteólisis o de manera sintética, o incluso todo péptido natural o sintético cuya secuencia está constituida total o parcialmente por la secuencia del péptido descrito anteriormente. A fin de mejorar la resistencia a la corrosión, puede resultar necesario utilizar una forma protegida del péptido. Evidentemente, la forma de protección debe ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con una utilización en el ámbito cosmetológico o farmacéutico.

Pueden considerarse numerosas formas de protección biológicamente compatibles. De este modo, la invención se refiere a una composición como la definida anteriormente, caracterizada por el hecho de que el péptido de fórmula general (I) posee al menos un grupo funcional protegido por un grupo protector, siendo este grupo protector una acilación o una acetilación del extremo amino terminal, una amidación o una esterificación del extremo carboxilo terminal, o ambas. El extremo amino terminal puede estar protegido por un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo. Preferentemente, se utiliza una protección basada en la amidación de la función hidroxilo del extremo carboxilo terminal mediante un grupo NYY donde Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄, o la esterificación mediante un grupo alquilo. También es posible proteger ambos extremos del péptido.

Los derivados de péptidos se refieren también a los aminoácidos y a los péptidos unidos entre sí mediante un enlace seudopeptídico. Se entiende por "enlace seudopeptídico" todos los tipos de enlaces susceptibles de sustituir a los enlaces peptídicos "clásicos". En el ámbito de los aminoácidos, la geometría de las moléculas es tal que teóricamente pueden presentarse bajo la forma de isómeros ópticos diferentes. En efecto, existe una conformación molecular del aminoácido (AA) que desvía hacia la derecha el plano de polarización de la luz (conformación dextrógira o D-aa) y una conformación molecular del aminoácido (aa) que desvía hacia la izquierda el plano de polarización de la luz (conformación levógira o L-aa). Los aminoácidos naturales son siempre de conformación levógira; en consecuencia, un péptido de origen natural sólo estará constituido por aminoácidos de tipo L-aa. No obstante, la síntesis química en laboratorio permite preparar aminoácidos que tienen las dos conformaciones posibles. A partir de este material de base es posible incorporar durante la síntesis de péptido aminoácidos en forma de isómeros ópticos tanto de conformación dextrógira como levógira. De este modo, los aminoácidos que constituyen el péptido según la invención pueden estar bajo la configuración L- y D-; de manera preferente, los aminoácidos están bajo la forma L. Por lo tanto, el péptido puede estar bajo la forma L-, D- o DL-.

El péptido de fórmula general (I) puede obtenerse mediante síntesis química clásica (en fase sólida o en fase homogénea líquida), o mediante síntesis enzimática (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 225, 8234), a partir de aminoácidos constitutivos o de sus derivados.

El péptido puede obtenerse también por fermentación de una cepa de bacterias modificadas o no, mediante ingeniería genética, o incluso por extracción de proteínas de origen animal o vegetal, preferentemente de origen vegetal, seguida de una hidrólisis controlada que libera fragmentos peptídicos que corresponden total o parcialmente a los péptidos de fórmula general (I).

Numerosas proteínas encontradas en las plantas son susceptibles de contener esas secuencias en el seno de su estructura. La hidrólisis controlada permite liberar esos fragmentos peptídicos. Es posible, pero no necesario para realizar la invención, extraer las proteínas en cuestión primero e hidrolizarlas a continuación, o efectuar la hidrólisis primero sobre un extracto bruto y purificar los fragmentos peptídicos a continuación. También es posible utilizar determinados extractos hidrolizados sin purificar los fragmentos peptídicos que corresponden a los péptidos de fórmula general I según la invención, pero asegurándose no obstante de la presencia de dichos fragmentos a través de medios analíticos apropiados.

El especialista conocedor del método de síntesis, de extracción y de purificación de las proteínas y de los péptidos puede considerar otros procedimientos más simples o más complejos. De este modo, el péptido según la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferentemente según la invención, el péptido se obtiene mediante síntesis química.

El principio activo puede ser una mezcla de derivados peptídicos y/o constituidos por derivados de aminoácidos.

Según un modo de realización ventajoso de la invención, el principio activo se solubiliza previamente en uno o varios disolventes utilizados clásicamente por el especialista, como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de esos disolventes.

5 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, el principio activo se solubiliza previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o se adsorbe sobre polímeros orgánicos pulverulentos, soportes minerales como talcos y bentonitas, y más generalmente se solubiliza en, o se fija sobre, cualquier vector cosmético o farmacéuticamente aceptable.

10 La composición utilizable según la invención puede consistir, en particular, en una composición para cuidados capilares, y especialmente un champú de lavado, un acondicionador, una loción fijadora, una loción de tratamiento, una crema o un gel para el peinado, una loción reestructurante para el cabello, una mascarilla, etc. La composición cosmética según la invención puede utilizarse especialmente en los tratamientos que incluyen una aplicación seguida o no de enjuague, o incluso bajo la forma de champú de lavado.

15 También puede presentarse en forma de tintura o de mascarilla de aplicación con pincel o peine, en particular en las pestañas, las cejas y el cabello.

20 Se entiende que el principio activo puede utilizarse solo o en asociación con al menos otro principio activo, en una composición cosmética o para la preparación de una composición farmacéutica y/o dermatológica.

25 Las composiciones según la invención podrán aplicarse a través de cualquier vía apropiada, especialmente oral, parenteral o tópica externa, y su formulación será adaptada por el especialista, en particular para composiciones cosméticas o dermatológicas. Ventajosamente, las composiciones según la invención se presentan en una forma apta para la aplicación por vía tópica. Por lo tanto, estas composiciones deben contener un medio cosmética y/o dermatológicamente aceptable, es decir compatible con la piel y los anexos cutáneos, y comprendiendo todas las formas cosméticas o dermatológicas. Estas composiciones podrán ser especialmente en forma de cremas, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, o emulsiones múltiples, soluciones, suspensiones, geles, leches, lociones, barritas o incluso polvos, aptos para una aplicación sobre la piel, los labios y/o los anexos cutáneos.

30 Estas composiciones comprenden los excipientes necesarios para su formulación, como disolventes, espesantes, diluyentes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes, conservantes y perfumes.

35 Ventajosamente, las composiciones utilizables contienen al menos otro agente activo que favorece la acción de los péptidos según la invención. De este modo, la composición según la invención puede asociar al principio activo según la invención agentes activos que tienen una acción antioxidante, o incluso estimulante de la síntesis de las macromoléculas dérmicas, o incluso estimulante del metabolismo energético. Por ejemplo, como agentes activos que tienen una acción antirradical o antioxidante, pueden citarse la vitamina C, la vitamina E, la coenzima Q10 y los extractos polifenólicos de plantas.

40 También pueden citarse como agentes que estimulan las síntesis de las macromoléculas dérmicas (laminina, fibronectina, colágeno), por ejemplo el péptido de colágeno comercializado bajo el nombre de "Collaxyl®" por la empresa Vincience.

45 Por último, como agente activo que estimula el metabolismo energético puede citarse el principio activo comercializado bajo la denominación "GP4G®" por la empresa Vincience.

50 Según otro aspecto, la composición de acuerdo con la invención puede ser una composición solar, es decir una composición que contribuye a la protección contra los rayos solares. De este modo, pueden añadirse ventajosamente a la composición según la invención principios activos que contribuyen a la protección solar como, por ejemplo, filtros solares.

55 Es evidente que la invención se dirige a los mamíferos en general, y más específicamente a los seres humanos.

La cantidad eficaz de principio activo corresponde a la cantidad necesaria para obtener el resultado buscado, a saber, activar el citocromo c y aumentar el nivel energético celular, y más generalmente proteger la piel y los anexos cutáneos de las agresiones externas y combatir el envejecimiento cutáneo.

60 Según un modo de realización ventajoso de la invención, el principio activo está presente en las composiciones de la invención a una concentración comprendida entre 0,0005 y 500 ppm (partes por millón) aproximadamente, y preferentemente a una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm aproximadamente en relación con el peso total de la composición final.

65 Estas composiciones podrían presentarse especialmente en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa; de una emulsión de aceite en agua, de agua en aceite o de emulsiones múltiples; también pueden presentarse en

5 forma de cremas, suspensiones o incluso polvos, aptos para aplicación sobre la piel, las mucosas, los labios y/o los anexos cutáneos. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, una loción, una leche, un suero, una pomada, un gel, una pasta o una espuma. También pueden presentarse en forma sólida, como una barrita, o aplicarse sobre la piel en forma de aerosol. Pueden utilizarse como producto de cuidado y/o como producto de maquillaje de la piel.

10 Además, estas composiciones comprenden todo aditivo comúnmente utilizado en el ámbito de aplicación considerado, así como los adyuvantes necesarios para su formulación, como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, principios activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc.

15 En todos los casos, el especialista cuidará que esos adyuvantes, así como sus proporciones, se elijan de manera que no perjudiquen a las propiedades ventajosas buscadas según la invención. Estos adyuvantes pueden, por ejemplo, representar del 0,01 al 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar del 5 al 80 % en peso y preferentemente del 5 al 50 % en peso en relación con el peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición se elegirán entre los usados clásicamente en el ámbito considerado. Por ejemplo, pueden utilizarse en una proporción comprendida entre el 0,3 y el 30 % en peso en relación con el peso total de la composición.

20 Por sus actividades específicas, el principio activo según la invención podrá utilizarse ventajosamente en una composición cosmética o para la preparación de una composición farmacéutica. Especialmente, la invención se refiere a una composición que comprende el principio activo para su utilización en un tratamiento dermatológico o para prevenir o tratar los daños causados en la piel y en los anexos cutáneos por los rayos UV.

25 En particular, el principio activo podrá utilizarse ventajosamente en una composición cosmética destinada a combatir de manera preventiva y/o curativa las manifestaciones del envejecimiento cutáneo y, más específicamente, para combatir y/o prevenir el envejecimiento fotoinducido (fotoenvejecimiento). Por manifestaciones cutáneas del envejecimiento se entienden todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel y de los anexos cutáneos debidas al envejecimiento como, por ejemplo, las arrugas y pequeñas arrugas, la piel marchita, la piel flácida, la pérdida de volumen de la piel, la falta de elasticidad y/o de tonicidad de la piel, la piel apagada y sin luminosidad o las manchas de pigmentación de la piel, la decoloración del cabello o las manchas en las uñas, pero también toda modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente por un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, toda degradación interna de la piel luego de una exposición a los rayos ultravioleta (UV). El principio activo, o la composición que lo contiene, permitirá combatir, en particular, la pérdida de elasticidad y de firmeza de la piel.

35 El principio activo puede utilizarse ventajosamente en una composición cosmética para proteger a la piel y los anexos cutáneos contra todo tipo de agresiones externas. La utilización del principio activo, o de una composición que lo contiene, permitirá que la piel y los anexos cutáneos estén protegidos y resistan mejor al estrés medioambiental.

40 Mediante la expresión "agresiones externas" se entienden las agresiones que puede producir el medio ambiente. A título de ejemplo, pueden citarse agresiones como la contaminación, los rayos UV o incluso los productos de carácter irritante, como los tensioactivos, los conservantes o los perfumes. Por contaminación se entiende tanto la contaminación "externa" debida, por ejemplo, a las partículas de diesel, al ozono o a los metales pesados, como la contaminación "interna" que puede deberse especialmente a las emisiones de disolventes de pinturas, pegamentos o papeles pintados (como tolueno, estireno, xileno o benzaldehído), o incluso el humo de cigarrillos.

45 El principio activo puede utilizarse ventajosamente en una composición cosmética o para la preparación de una composición farmacéutica como agente fotoprotector y, más particularmente, como agente fotoprotector llamado "secundario". En efecto, se distinguen los agentes fotoprotectores primarios de los agentes fotoprotectores secundarios. Los agentes fotoprotectores primarios son sustancias que ejercen un poder físico: son capaces de absorber los rayos UV y restituirlos en forma de calor para proteger la piel. Los agentes fotoprotectores secundarios son sustancias que generalmente tienen un efecto biológico; son, por ejemplo, los agentes capaces de limitar los daños causados al ADN y a las membranas por la penetración de los rayos UV en la piel.

50 Se describe la utilización de una composición cosmética de una cantidad eficaz de principio activo para aumentar la síntesis de ATP intracelular de las células de la piel.

55 Se describe la utilización en una composición cosmética de una cantidad eficaz de principio activo según la invención para prevenir los daños causados a la piel por exposición al sol o exposición a rayos ionizantes durante radioterapias.

60 También se describe la utilización en una composición cosmética de una cantidad eficaz de principio activo según la invención para estimular las mitocondrias, en particular en las zonas del cuerpo expuestas a rayos UV.

Además, también se describe la utilización en una composición cosmética de una cantidad eficaz de principio activo, tal como se definió anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a prevenir o combatir las patologías relacionadas con disfuncionamientos mitocondriales, como ciertas degeneraciones neuromusculares o cardíacas, la diabetes de tipo II o determinadas patologías del envejecimiento.

Por último, también se describe un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a estimular las defensas y a proteger a la piel y los anexos cutáneos de las agresiones externas y a combatir el envejecimiento cutáneo, que se caracteriza por la aplicación sobre la piel o los anexos cutáneos a tratar de una composición que contiene una cantidad eficaz de principio activo.

De la descripción anterior también resultan modos de realización específicos de este procedimiento cosmético. La lectura de los ejemplos que se incluyen a continuación, a título ilustrativo y no limitativo, permitirá una mejor apreciación de otras ventajas y características de la invención.

Ejemplo 1: Prueba del efecto estimulante del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la síntesis de ATP intracelular

El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la síntesis de ATP producido por las mitocondrias.

Protocolo: Este estudio se efectúa con la ayuda de un "Kit de ensayo de bioluminiscencia ATP HS II" (Roche Applied Science). Se tratan fibroblastos dérmicos con una solución al 1 % de una solución a 50 ppm que contiene el péptido SEC. ID Nº 2, representativo de la familia de péptido según la invención, durante un período de 1 a 3 horas. Al final de la incubación, se enjuagan los pocillos con 2 ml de PBS (tampón fosfato en sus siglas en inglés) frío antes de añadir 250 µl de un tampón de lisis incluido en el kit. A continuación se procede a raspar las células de cada pocillo y después se recogen en tubos de 14 ml. Cada pocillo se enjuaga con 2 x 500 µl de PBS frío y se vuelve a recoger todo en los tubos respectivos. A partir de esas muestras se realiza una dilución 1/12.000 en PBS frío antes de cada lectura. La dosificación de ATP se realiza en esas muestras: 50 µl de esta dilución se depositan en una cubeta Lumac y se añaden 50 µl de luminol. Al cabo de 10 segundos, se inicia la lectura de la luminiscencia. Los valores se estandarizan en relación con la cantidad de proteínas para cada muestra. Las mediciones se efectúan con la ayuda de un aparato: el Biocounter M2010A LUMAC®/3 M.

Resultados: Las dosificaciones de ATP muestran que existe un aumento de la cantidad de ATP intracelular del 41 % al cabo de 1 hora y del 27 % al cabo de 3 horas en células tratadas con el péptido SEC. ID Nº 5 en comparación con células no tratadas.

Conclusión: El péptido SEC. ID Nº 2 aumenta significativamente el nivel energético de células cutáneas como los fibroblastos, y más generalmente estimula las funciones mitocondriales.

Ejemplo 2: Prueba del efecto activador del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la expresión de citocromo c

El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la expresión del citocromo c. Para ello, la cantidad de citocromo c se ha evaluado mediante la técnica de inmunotransferencia (o "western blot").

Protocolo: Se procede a tratar fibroblastos dérmicos humanos con una solución al 1 % de una solución madre a 50 ppm de péptido SEC. ID Nº 2 durante 72 horas. A continuación se procede a lisar y homogeneizar las células mediante sonicación; seguidamente se centrifugan las células 10 minutos a 1.000 g. Las muestras, estandarizadas para su concentración en proteína (dosificación kit BCA, Pierce), se someten a una electroforesis sobre gel Bis-TRIS 4-12 % (InvitroGen). Después de la electrotransferencia, se incuban las membranas durante una noche con un anticuerpo anticitocromo c diluido a 1/500 (anticitocromo c monoclonal de ratón, TEBU). A continuación se utiliza un anticuerpo secundario, unido a la peroxidasa y diluido a 1/5000 (peroxidasa conjugada F(ab')₂, cabra anti-ratón, Immunotech). Seguidamente se cuantifica la señal quimioluminiscente con la ayuda del kit Supersignal West Femto Trial y se lee en una cámara de lectura (Multimage light Cabinet, Alpha Immunotech Corporation).

Resultados: Se observa un claro aumento de la expresión del citocromo c en los fibroblastos tratados con el péptido SEC. ID Nº 2.

Conclusiones: El péptido SEC. ID Nº 2, a la concentración de 0,05 ppm, estimula en gran medida la expresión del citocromo c en las células cutáneas, y más generalmente las funciones mitocondriales.

Ejemplo 3: Prueba del efecto activador del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la actividad enzimática de la citocromo oxidasa

El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC. ID Nº 2 sobre la actividad mitocondrial. Para ello, se ha medido la actividad enzimática total (mitocondrial) de la citocromo oxidasa.

Protocolo: Se procede a tratar fibroblastos humanos normales con una solución al 1 % de una solución a 50 ppm que contiene el péptido SEC. ID N° 2, representativo de la familia de péptido según la invención, durante 3 horas y 24 horas. Se procede a recoger y enjuagar las células y después a lisarlas mediante sonicación. Se realiza una primera centrifugación para eliminar los principales residuos celulares y seguidamente se vuelve a centrifugar el sobrenadante a 10.000 g durante 10 min. La actividad enzimática se dosifica en el sobrenadante y/o en el 2º residuo de transferencia, mediante un método bioquímico, con la ayuda del kit Cytocox I (Sigma), y a continuación se estandariza para el contenido en proteínas (dosificada mediante el kit BCA, Pierce).

Resultados: Las dosificaciones muestran que hay un aumento de la actividad enzimática de la citocromo oxidasa del 150 % al cabo de 3 horas y del 750 % al cabo de 24 horas de aplicación del péptido SEC. ID N° 2, en comparación con las células no tratadas.

Conclusión: El péptido SEC. ID N° 2, a la concentración de 0,05 ppm, estimula en gran medida la actividad enzimática de la citocromo oxidasa, y más generalmente la actividad mitocondrial, en las células cutáneas.

Ejemplo 4: Prueba del efecto protector del péptido SEC. ID N° 2 sobre el potencial de membrana mitocondrial

El objetivo de este estudio es determinar el efecto protector del péptido SEC. ID N° 2 frente a las mitocondrias de fibroblastos dérmicos sometidos a un estrés oxidativo, provocado mediante agua oxigenada (H₂O₂), o a una irradiación UVB. Para ello se utiliza un marcador del potencial de membrana de las mitocondrias (JC-I). El JC-I es un marcador que emite una fluorescencia diferente según el nivel de polarización de la membrana mitocondrial.

Protocolo: Se procede a tratar fibroblastos dérmicos humanos con una solución al 1 % de una solución madre a 50 ppm de péptido SEC. ID N° 2, durante 96 horas, y después se los somete a un estrés oxidativo, provocado mediante H₂O₂ 2 mM durante 30 minutos, o a una irradiación mediante UVB a 50 mJ/cm². En las mismas condiciones se realizan controles no tratados con el péptido o con el H₂O₂ o no irradiados. Al final del experimento, se procede a lavar y fijar las células y a someterlas a un marcado mediante una solución de JC-I (Molecular Probes) a 0,2 µg/ml para revelar el potencial de membrana de las mitocondrias.

Resultados: En los fibroblastos tratados con el péptido SEC. ID N° 2 las mitocondrias presentan una fluorescencia roja (JC-I agregado), lo cual indica un potencial de membrana elevado, más importante que en las células control. Los fibroblastos irradiados o sometidos a un estrés oxidativo tienen mitocondrias con escasa fluorescencia en rojo, y principalmente en verde (JC-I monomérico), lo cual indica una alteración del potencial de membrana mitocondrial. En estas últimas condiciones, la aplicación del péptido SEC. ID N° 2 permite observar una fluorescencia roja más marcada.

Conclusiones: La aplicación del péptido SEC. ID N° 2 provoca un aumento del potencial de membrana de las mitocondrias. Por otra parte, el péptido SEC. ID N° 2 protege eficazmente las mitocondrias de las células cutáneas sometidas a un estrés oxidativo o a una irradiación con UVB.

Ejemplo 5: Preparación de composiciones

Crema de protección solar:

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Agua desmineralizada	Aqua (water)	csp
Pemulen TR1	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,40
Glicerina	Glycerin	3,00
Nipastat Sodio	Sodium Methylparaben (and) Sodium Ethylparaben (and) Sodium Butyl paraben (and) Sodium Propylparaben (and) Sodium Isobutylparaben	0,15
FASE B		
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnamate	7,50
Eusolex 4360	Benzophenone-3	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	2,00
Myritol 318	Caprylic/Capric Triglyceride	4,00
Emulgade SEV	Hydrogenated Palm Glycerides (and) Cetareth-20 (and) Cetareth-12 (and) Cetearyl Alcohol	5,00
Propilparabeno	Propylparaben	0,15
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
FASE C		
TEA	Triethanolamine	0,20

ES 2 404 053 T3

FASE D		
Péptido SEC. ID N° 2		3 ppm
Perfume	Parfum (Fragrance)	csp
Colorante		csp

- 5 Se procede a calentar separadamente los componentes de la fase A y de la fase B entre 70°C y 75°C. La fase B se emulsiona en la fase A bajo agitación. Se añade la fase C, a 45°C, aumentando la agitación. A continuación, se añade la fase D cuando la temperatura se sitúa por debajo de 40°C. Se prosigue el enfriamiento hasta 25°C bajo agitación enérgica.

Leche "after sun":

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Montanov L	C14-22 Alcohols (and) C12-20 Alkyl Glucoside	3,00
Waglinol 2559	Cetearyl Isononanoate	4,00
Tegosoft TN	C12-15 Alkyl Benzoate	3,00
Aceite de nuez de albaricocque	Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil	2,00
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,00
Abil 350	Dimenthicone	1,00
FASE B		
Aqua desmineralizada	Aqua (water)	csp
FASE C		
Simulgel EG	Sodium Acrylate/Acryloyldimethyl Taurate Copolymer (and) Isohexadecane (and) Polysorbate 80 Copolymer (and) Polysorbate 80	0,4
FASE D		
Fenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben Ethylparaben and Propylparaben and Buthylparaben	0,30
Germall 115	Imidazolidinyl Urea	0,20
Péptido SEC. ID N° 2		0,1 ppm

- 10 Preparar la fase A bajo agitación. Incorporar la goma xantano progresivamente, bajo agitación defloculante. Las fases C y D se incorporarán una vez terminado el gel. La fase E, preparada previamente hasta la perfecta disolución de la DHA, se añadirá a continuación. Ajustar el pH si es necesario a 4 - 4,5. Colorear y perfumar.

Crema antienvjecimiento:

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Escualano	Squalane	3,00
Cetiol SB 45	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amercho I L-101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00

ES 2 404 053 T3

Abil 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzima Q10	Ubiquinone	0,10
FASE B		
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Fenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,75
FASE C		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	Csp
Butileno glicol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Alantoína	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
FASE D		
TEA	Triethanolamine	0,18
FASE E		
Péptido SEC. ID N° 2		0,5 ppm
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,50
Collaxyl	Water (and) Butylene Glycol (and) Hexapeptide-9	3,00
FASE F		
Perfume	Parfum (Fragrance)	Csp
Colorante		Csp

Preparar y fundir la fase A a 65-70°C. Calentar la fase C a 65-70°C. La fase B se añade a la fase A justo antes de emulsionar A en B. A aproximadamente 45°C se neutraliza el carbómero añadiendo la fase D. A continuación se añade la fase E bajo ligera agitación y se prosigue el enfriamiento hasta 25°C. Entonces, si se desea, se añade la fase F.

5

Crema protectora de día:

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Emulium Delta	Cetyl alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-75 Stearate (and) Ceteth-20 (and) Steareth-20	4,00
Lanette O	Cetearyl Alcohol	1,50
D C 200 líquido/100 cs	Dimethicone	1,00
DUB 810C	Coco Caprylate/Caprato	1,00
DPPG	Propylene Glycol Dipelargonate	3,00
DUB DPHCC	Dipentaerythryl Hexacaprylate/Hexacaprate	1,50
Cegesoft PS6	Vegetable Oil	1,00
Vitamina E	Tocopherol	0,30
Fenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,70
FASE B		
Agua desmineralizada	Aqua	csp 100
Glicerina	Glycerin	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30Alkyl Acrylate Crosspoly-	0,15

ES 2 404 053 T3

	mer	
Keltrol BT	Xanthan Gum	0,30
FASE C		
Hidróxido de sodio (sol. al 10%)	Sodium Hydroxide	0,30
FASE D		
Agua desmineralizada	Aqua	5,00
Estay-C 50	Sodium Ascorbyl Phosphate	0,50
FASE E		
Butilenglicol	Butylene Glycol	2,00
Dekaben CP	Chlorphenesin	0,20
FASE F		
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,00
Péptido SEC. ID N° 2		5 ppm

Preparar la fase A y calentar a 75°C bajo agitación. Preparar la fase B dispersando el carbopol y después la goma de xantano bajo agitación. Dejar reposar. Calentar a 75°C.

- 5 Una vez alcanzada la temperatura, emulsionar A en B bajo agitación rotor-estator. Neutralizar con la fase C bajo agitación rápida. Después de enfriar a 40°C, añadir la fase D y a continuación la fase E. Proseguir el enfriamiento bajo agitación ligera y añadir la fase F.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene como principio activo, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un péptido capaz de activar el citocromo c que comprende de 3 a 13 residuos de aminoácidos y cuya secuencia responde a la fórmula general (I):
- $$R_1-(AA)_n-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-(AA)_p-R_2$$
- 5 en la cual
 X_1 es la tirosina,
 X_2 es la leucina,
 X_3 es la lisina,
 X_4 es la treonina, la serina, la lisina, la arginina o algún aminoácido,
 X_5 es la valina, la alanina, la tirosina, la metionina o algún aminoácido,
 10 AA representa un aminoácido cualquiera, o uno de sus derivados, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,
 R_1 representa la función amino primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que puede seleccionarse entre un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo,
 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que puede seleccionarse entre una cadena alquilo de C1 a C20, o un grupo NH_2 , NHY o $NY Y$ donde Y representa a una cadena alquilo de C1 a C4,
 15 que se caracteriza porque dicho péptido de fórmula general (I) corresponde a una de las secuencias siguiente:
 (SEC. ID N°1) Tir-Leu-Lis-Lis-Ala
 (SEC. ID N°2) Tir-Leu-Lis-Lis-Ala- NH_2
 (SEC. ID N°3) Tir-Leu-Lis-Lis- NH_2
 (SEC. ID N°4) Tir-Leu-Lis.
2. Composición según la reivindicación 1 que se caracteriza porque el péptido de fórmula general (I) corresponde a la secuencia SEC. ID N° 1.
- 25 3. Composición según la reivindicación 1 que se caracteriza porque el péptido de fórmula general (I) corresponde a la secuencia SEC. ID N° 2.
- 30 4. Composición según alguna de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque el péptido de fórmula general (I) posee al menos un grupo funcional protegido por un grupo protector, siendo este grupo protector una acilación o una acetilación del extremo amino terminal, o una amidación o una esterificación del extremo carboxilo terminal, o ambos.
- 35 5. Composición según alguna de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque el principio activo está presente en la composición a una concentración comprendida entre 0,0005 y 500 ppm aproximadamente en relación con el peso total de la composición.
- 40 6. Composición según la reivindicación 5, que se caracteriza porque el principio activo está presente en la composición a una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm en relación con el peso total de la composición.
- 45 7. Composición según alguna de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque el principio activo se solubiliza previamente en uno o varios disolventes seleccionados entre agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de esos disolventes.
8. Composición según alguna de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque se presenta en una forma apta para la aplicación por vía tópica.
- 50 9. Composición según alguna de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque contiene, además, al menos otro agente activo seleccionado entre la vitamina C, la vitamina E, la coenzima Q10, los extractos polifenólicos de plantas, el péptido de colágeno comercializado bajo el nombre de "Collaxyl®" o el principio activo comercializado bajo la denominación "GP4G®".
- 55 10. Composición que comprende un principio activo como se define en alguna de las reivindicaciones 1 a 4 para su utilización en un tratamiento dermatológico.
- 60 11. Composición que comprende un principio activo como se define en alguna de las reivindicaciones 1 a 4 para prevenir o tratar los daños causados a la piel y a los anexos cutáneos por los rayos UV.
12. Utilización cosmética, no terapéutica, de la composición que comprende un principio activo como se define en alguna de las reivindicaciones 1 a 4 para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y/o del fotoenvejecimiento.