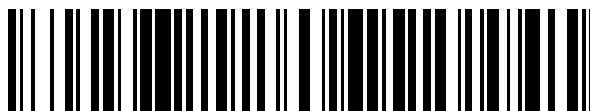


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 560**

51 Int. Cl.:

A61K 8/11 (2006.01)

A61K 8/26 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010 E 10785466 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2488149**

54 Título: **Composición dermatológica y/o cosmética utilizada para la regeneración de la piel**

30 Prioridad:

14.10.2009 FR 0957201

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

29.01.2014

73 Titular/es:

**LABORATOIRE COSMETIQUE DE LECOUSSE
(100.0%)
19 rue Péclet
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DELAUNAY, DOMINIQUE y
VOLLE, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 440 560 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 dermatológica y/o cosmética utilizada para la regeneración de la piel

5 La presente invención se refiere a una composición dermatológica y/o cosmética destinada a luchar eficazmente contra el envejecimiento de la piel, y más particularmente regenerar la dermis y la epidermis de la piel.

La piel constituye al mismo tiempo una barrera anatómica viva y una zona de intercambio entre el cuerpo y su entorno, y la eficacia de esta barrera condiciona el mantenimiento de un buen equilibrio homeoestático.

10 Comprende varias capas que van de la capa superficial, la epidermis, a las capas más profundas, la dermis y la hipodermis. Cada una de estas capas posee unas propiedades específicas que permiten al conjunto reaccionar y adaptarse a las condiciones de su entorno.

15 La epidermis, que está compuesta de tres tipos de células, a saber unos queratinocitos (el 90% de las células epidérmicas), unos melanocitos (del 2 al 3% de las células epidérmicas) y las células de Langerhans, constituye la capa externa y desempeña un papel fundamental para asegurar la protección y el mantenimiento de una buena treficidad. La dermis es 10 a 30 más gruesa que la epidermis, para la cual sirve de soporte, y está principalmente constituida de fibroblastos y de una matriz extracelular esencialmente a base de colágeno y de elastina. Las fibras de colágeno, que representan aproximadamente el 70% de las proteínas de la dermis, contribuyen a la textura y a la tonicidad de la piel, mientras que la elastina es responsable de su elasticidad. Otras células, como los macrófagos y los leucocitos, están también presentes en la capa de la dermis. La hipodermis, que es la capa más profunda de la piel, contiene los adipocitos que producen unos lípidos para que el tejido sub-cutáneo fabrique una capa grasa que protege los músculos, los huesos y los órganos internos contra los choques.

20 La unión dermo-epidérmica es la zona de conexión de la epidermis con la dermis, en particular por la red de fibras de colágeno, que controla los intercambios entre estas dos capas. Constituye el soporte de queratinocitos durante el proceso de cicatrización.

25 Los primeros signos del envejecimiento de la piel, tales como las arrugas y las arrugas pequeñas, son generalmente provocados por el estrés y los cambios biológicos y fisiológicos, acelerados por los modos de vida o por el medio ambiente, en particular la polución, la exposición al sol, a los rayos ultravioletas, las variaciones de temperaturas y los radicales libres, que pueden contribuir a acelerar la degradación de los constituyentes principales de la matriz extracelular de la dermis, tales como el colágeno o el ácido hialurónico. La aparición de marcas pigmentarias, la disminución del grosor de la piel, su pérdida de elasticidad y su flacidez son también unos cambios observados durante el envejecimiento.

30 Se sabe que la capacidad de la piel para sustituir el colágeno dañado disminuye con el tiempo, y en consecuencia aparecen unos espacios e irregularidades en la red del colágeno.

35 El ácido hialurónico desempeña, por sí mismo, un papel importante en el crecimiento celular, la función de los receptores membranarios y la adhesión de las células. A partir de una cierta edad, se nota una disminución fisiológica de la concentración de ácido hialurónico en la piel.

40 Se han dedicado numerosos estudios al tratamiento y a la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo, en particular para elaborar unas composiciones dermatológicas y/o cosméticas susceptibles de favorecer la reestructuración tisular, y en particular la neosíntesis de elementos constitutivos de la piel como el colágeno y el ácido hialurónico de la matriz extracelular. Por "neosíntesis" se entiende la síntesis del colágeno o del ácido hialurónico que se forma únicamente en caso de necesidad, por ejemplo para el relleno de arrugas.

45 Por otra parte, se sabe que, para ser aceptadas por los usuarios, las composiciones tópicas utilizables en dermatología y/o cosmética deben ser agradables de utilizar y deben presentar buenas propiedades físicas, en particular de consistencia y de untuosidad, garantizando al mismo tiempo una eficacia satisfactoria y evitando los inconvenientes tales como tirantes, irritaciones o picores, que pueden ocasionar ciertos principios activos.

50 En el estado de la técnica, la patente FR-A-2.783.169 describe la utilización de pentapéptidos de tipo Lys-Thr-Thr-Lys-Ser en unas composiciones tópicas para favorecer la síntesis del colágeno y de los glicosaminoglicanos, y por lo tanto la regeneración cutánea. Se conoce también, por la patente FR-A-2.848.116, una composición cosmética y/o dermatológica a base de inhibidores de metalo-proteinasas matriciales, y de lipopéptidos que permiten el tratamiento y la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo, tales como la aparición de arrugas y la pérdida de elasticidad de la piel.

Se pueden citar igualmente las patentes siguientes:

- la patente DE 10 2008 012457, que describe una formulación de tipo crema que asocia un tripéptido con una hectorita de diestearidimonio;

- la patente US 2006/104931, que describe una composición cosmética que comprende, entre otros, laponita, lipopéptido y té verde; y

- la patente US 2009/117061, que describe una composición para la piel a base de hectorita y de un tetrapéptido.

5 Sin embargo, a pesar de las diversas composiciones dermatológicas y/o cosméticas disponibles, existe hoy día todavía una necesidad de poder disponer de nuevas composiciones tópicas alternativas que permitan luchar eficazmente contra los efectos del envejecimiento cutáneo, y en particular unas composiciones a base de sustancias de origen natural adecuadas para el tratamiento y los cuidados de la piel.

10 La presente invención pretende proporcionar en particular una composición dermatológica y/o cosmética que permita luchar eficazmente contra el envejecimiento de la piel, y más particularmente que permita regenerar la piel tal como la dermis y la epidermis.

La presente invención tiene por objeto una nueva composición tópica utilizable en dermatología y/o en cosmética que comprende la asociación de al menos un lipopéptido y de al menos una arcilla funcionalizada.

La invención tiene asimismo por objeto la utilización cosmética de una composición que asocia al menos un lipopéptido y al menos una arcilla funcionalizada para regenerar la piel.

15 Otro objeto de la invención se refiere a la utilización de una composición que asocia al menos un lipopéptido y al menos una arcilla funcionalizada para la fabricación de un producto dermatológico, estando esta utilización preferiblemente destinada a la regeneración de la piel.

20 La asociación de la invención presenta la ventaja de vectorizar, o de intercalar, el o los lipopéptidos dentro de la arcilla funcionalizada. Se puede hablar así de una composición tópica utilizable en dermatología y/o en cosmética que comprende al menos un lipopéptido intercalado en una arcilla funcionalizada.

La arcilla funcionalizada utilizada en la invención se obtiene a partir de una arcilla y de un compuesto funcionalizante (dicha arcilla).

25 La arcilla tal como la utilizada para obtener la arcilla funcionalizada es preferentemente una arcilla que comprende una estructura estratificada o en láminas. Pero puede ser también otro tipo de arcilla como, por ejemplo, una arcilla que comprende una estructura fibrosa.

Más particularmente, el o los lipopéptidos pueden intercalarse entre las láminas de la arcilla, típicamente denominado "espacio inter-láminas". En otras palabras, el o los lipopéptido(s) intercalado(s) se encuentran en el interior de las láminas, lo que los protege de las agresiones del medio exterior.

30 A título de ejemplo, una arcilla que comprende una estructura en láminas puede pertenecer a la familia de los filosilicatos. Así, el o los lipopéptidos pueden intercalarse entre las láminas de filosilicato, y unirse a dichas láminas por uniones de Van der Waals por un lado y, por sustitución catiónica por otro lado.

Los filosilicatos se pueden seleccionar entre las montmorillonitas, la beidellita, la saponita, las illitas, la glauconita, las cloritas, la vermiculita, y las arcillas fibrosas, o una de sus mezclas. Entre los filosilicatos citados, se preferirá utilizar las montmorillonitas.

35 El compuesto funcionalizante puede ser un compuesto glicoproteico como, por ejemplo, un extracto de alga, y preferentemente un extracto de alga verde *Ulva lactuca*. Así, el o los lipopéptidos pueden unirse en particular por uniones hidrógenas a dicho compuesto glicoproteico, y conferir una muy buena estabilidad a la estructura compuesta del o de los lipopéptido(s) intercalado(s) en la arcilla funcionalizada.

40 Una arcilla funcionalizada utilizada en la composición de la invención puede ser el producto referenciado Revertime[®], comercializado por la compañía Ephyra³. Este producto es un compuesto natural activo híbrido, en forma de polvo, procedente de una arcilla Montmorillonita y de una alga verde.

En el ámbito de la presente invención, se pueden utilizar diversos lipopéptidos pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención.

45 Según una forma de realización de la invención, el lipopéptido se puede seleccionar entre un lipotripéptido, un lipotetrapéptido, un lipopentapéptido, y un lipoheptapéptido.

A título de ejemplo, se puede citar:

- el N-palmitoil-Gly-His-Lys como tripéptido,

- el N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg como tetrapéptido,

50 - el N-palmitoil-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser como pentapéptido, que está comercializado por la compañía Sederma bajo la referencia Matrixyl[®], o

- el N-palmitoil-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly como lipohexapéptido, que está comercializado por la compañía Sederma bajo la referencia Dermaxyl®.

5 Estos péptidos pueden ser combinados entre sí, y por ejemplo en la composición según la invención, se puede utilizar la asociación de un lipotripéptido tal como N-palmitoil-Gly-His-Lys, y de un lipotetrapéptido tal como el N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg. Se preferirá una composición según la invención que comprenda al menos dos lipopéptidos.

La asociación del N-palmitoil-Gly-His-Lys y del N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg está comercializada por Sederma bajo la referencia Matrixyl® 3000.

10 Según un modo de realización particular de la invención, la composición puede comprender como máximo el 0,1% en peso de lipopéptido(s), y preferentemente como máximo el 0,08% en peso de lipopéptido(s), y aún más preferiblemente como máximo el 0,075% en peso de lipopéptido(s). La cantidad particularmente preferida en la composición de la invención es de 0,045% en peso de lipopéptido(s).

Además, es preferible que la composición comprenda al menos el 0,015% en peso de lipopéptido(s).

15 En otro modo de realización particular, la composición puede comprender como máximo el 1% en peso de arcilla(s) funcionalizada(s), preferentemente como máximo el 0,1% en peso de arcilla(s) funcionalizada(s). La cantidad particularmente preferida en la composición de la invención es del 0,01% en peso de arcilla(s) funcionalizada(s).

El límite superior del 1% en peso presenta la ventaja de permitir solubilizar fácilmente la arcilla funcionalizada en la composición conforme a la invención. Además, este límite permite obtener buenas propiedades organolépticas, en particular en términos de color y de olor.

20 Además, es preferible que la composición comprenda al menos el 0,001% en peso de arcilla(s) funcionalizada(s).

Los ensayos efectuados con la composición de la invención han mostrado que la combinación de al menos un lipopéptido y de al menos una arcilla funcionalizada proporcionaba interesantes propiedades, y en particular una acción significativa sobre la regeneración de la dermis y de la epidermis, como se indica más en detalle a continuación.

25 Las composiciones conformes a la presente invención pueden presentarse en las formas habitualmente utilizadas para una aplicación tópica, es decir en forma de gel, loción, emulsión (en particular crema o leche), suero (o esencia), mascarilla o pomada, que contiene unos excipientes y soportes habituales compatibles y farmacéuticamente aceptables. Pueden también presentarse en forma de toallita empapadas de una solución que contiene los extractos según la invención.

30 Estas formas de administración por vía tópica son preparadas mediante las técnicas conocidas, y por ejemplo, en el caso de una crema, por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa para obtener una emulsión aceite en agua, o, a la inversa, para preparar una emulsión agua en aceite.

35 Las composiciones tópicas según la invención pueden comprender diversos excipientes habituales adaptados a una administración tópica externa, en particular unos excipientes aceptables en el plano dermatológico y cosmetológico. Estos excipientes apropiados para la formulación son bien conocidos por el experto en la materia y se pueden seleccionar por ejemplo entre uno o varios de los compuestos siguientes:

- unos emulsionantes y coemulsionantes, tales como araquidil-glucósido, cetearil-glucósido, alcohol behenílico, alcohol cetearílico, alcohol cetosteárico, alcohol cetearílico, estearat-2, estearat-21, isoestearato de isoestearilo o miristato de isopropilo;

40 - unos emolientes tales como octil-dodecanol, isononil isononanoato, triglicéridos cáprico/caprílico;

- unas siliconas tales como la dimeticona;

- unos humectantes tales como la glicerina, el butilenglicol;

- unos antioxidantes tales como el acetato de tocoferol;

45 - unos conservantes tales como el fenoxietanol, el ácido deshidroacético, el ácido para-hidroxibenzoico y sus sales, el ácido benzoico, el sorbato de potasio, el benzoato de sodio;

- unos polvos exfoliantes, unos polvos de frutas o unos polvos matificantes, tales como el copolímero de metacrilato de metilo;

- unos agentes gelificantes;

- unos agentes neutralizantes;

- unos solubilizantes; y/o

- unos colorantes.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una asociación tal como se define en la composición de la invención, caracterizado por que comprende las etapas que consisten en:

5 i. hidratar la arcilla funcionalizada en un medio acuoso o alcohólico, para obtener una arcilla funcionalizada hidratada, y

ii. mezclar el o los lipopéptido(s) y la arcilla funcionalizada hidratada, para obtener uno o varios lipopéptido(s) intercalado(s) en la arcilla funcionalizada.

10 La etapa i y la etapa ii se pueden realizar de manera concomitante cuando dicho medio comprende el o los lipopéptido(s).

Gracias a la etapa i de hidratación que permite hacer crecer el espacio inter-láminas (es decir hinchamiento de las láminas) en la arcilla funcionalizada, la intercalación del o de los lipopéptido(s) dentro de dicha arcilla funcionalizada puede ser mejorada.

Dicho procedimiento puede comprender además la etapa que consiste en:

15 iii. secar el o los lipopéptido(s) intercalado(s) en la arcilla funcionalizada obtenidos en la etapa ii.

La etapa iii permite fijar el o los lipopéptido(s) a dicha arcilla funcionalizada.

La asociación obtenida a partir de dicho procedimiento de preparación permite así obtener de manera óptima unos lipopéptidos intercalados en la arcilla funcionalizada.

20 La composición de la invención puede comprender, por supuesto, dicha asociación obtenida a partir de dicho procedimiento de preparación, y más generalmente comprender al menos un lipopéptido y al menos una arcilla funcionalizada hidratada.

Otras características y ventajas de la presente invención aparecerán a la luz de los ejemplos siguientes, siendo dichos ejemplos dados a título ilustrativo y de ninguna manera limitativo.

25 Unos ejemplos de formulaciones son detallados en los ejemplos 1 y 2. Estas formulaciones son a base del producto "Revertime" y del producto "Matrixyl[®] 3000". Las cantidades de los diferentes constituyentes de las formulaciones de estos dos ejemplos son expresadas en % en peso. El agua desmineralizada está presente en la formulación final en cantidad suficiente para (abreviado por la sigla "c.s.p.") que el peso final de dicha formulación sea alcanzado, sin superarlo (es decir el 100% en peso).

30 El producto Revertime[®] está únicamente constituido de dicha arcilla funcionalizada, y comprende aproximadamente el 20% de materia orgánica (es decir, alga verde) para el 80% de materia inorgánica (es decir, arcilla Montmorillonita).

El producto Matrixyl[®] 3000 comprende 50 ppm de lipotetrapéptido (es decir, N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg) y 100 ppm de lipotripéptido (es decir, N-palmitoil-Gly-His-Lys).

35 En la presente descripción, la abreviatura "ppm" significa "partes por millón másicas". En otras palabras, la cantidad (o el contenido) x en ppm de un compuesto z está expresada con respecto al peso total de la formulación o del producto considerado.

Los ejemplos 3 y 4 son relativos a unas formulaciones alternativas aplicadas en base de las formulaciones de los ejemplos 1 y 2.

40 El ejemplo 5 es relativo a la evaluación de la citotoxicidad del producto Revertime[®] frente a fibroblastos dérmicos humanos normales cultivados en monocapas.

El ejemplo 6 es relativo a la evaluación de la citotoxicidad de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl[®] 3000 frente a fibroblastos dérmicos humanos normales cultivados en monocapas.

45 El ejemplo 7 es relativo al estudio del efecto de la asociación entre el producto Revertime[®] y los dos lipopéptidos del producto Matrixyl[®] 3000, sobre la neosíntesis de procolágeno de tipo I y de ácido hialurónico en un modelo de fibroblastos dérmicos humanos normales adultos cultivados en monocapas.

Ejemplo 1

Según las técnicas clásicas, se prepara un gel a base de una composición según la invención para regenerar la piel que tiene la composición ponderal siguiente:

ES 2 440 560 T3

Agua desmineralizada, c.s.p.	100
Agente gelificante	3
Agente neutralizante	3
Glicoles	5
Glicerina	5
Conservantes	3
Colorantes	0,1
Solubilizantes	3
Perfume	0,5
Principios activos diversos (hidrantantes y/o alisante)	20
Revertime®	0,1
Matrixyl® 3000	3

Ejemplo 2

Según las técnicas clásicas, se prepara una emulsión a base de una composición según la invención para regenerar la piel que tiene la composición ponderal siguiente:

Agua desmineralizada, q.s.p.	100
Agente gelificante	1
Glicerina	5
Conservantes	3
Emulsionante	5
Co-emulsionante	5
Ésteres, aceites	20
Silicona	3
Principios activos diversos (hidratante y/o alisante)	20
Colorantes	0,1
Perfume	0,5
Revertime®	0,1
Matrixyl® 3000	3

- 5 Estas formulaciones (gel del ejemplo 1 y emulsión del ejemplo 2) permiten luchar eficazmente contra el envejecimiento de la piel.

Ejemplo 3:

La eficacia de las formulaciones de los ejemplos 1 y 2 puede ser optimizada purificando el producto Matrixyl® 3000, a fin de extraer los dos lipopéptidos que lo componen.

- 10 En efecto, el producto Matrixyl® 3000 está constituido de dos lipopéptidos mezclados en un medio glicerinado gelificado con un carbómero.

Para ello, se puede proceder a la extracción de los dos lipopéptidos que comprenden el producto Matrixyl® 3000 según las etapas siguientes:

- precipitar el carbómero, por ejemplo mezclando bajo agitación el Matrixyl® 3000 con una solución etanólica, y
- separar el carbómero precipitado en la etapa anterior para obtener los dos lipopéptidos en forma de filtrado (Filtrado A).

El filtrado A puede entonces ser directamente utilizado en las formulaciones de los ejemplos 1 y 2 en lugar del producto Matrixyl® 3000, en concentraciones de lipopéptidos tales como las mencionadas en la presente descripción.

Ejemplo 4

Antes de la incorporación del filtrado A en las formulaciones de los ejemplos 1 y 2, se puede mejorar también la intercalación de los dos lipopéptidos dentro de la arcilla funcionalizada (es decir, Revertime®) mezclando, por ejemplo durante 2 horas, preferentemente en la oscuridad, el Filtrado A y la arcilla funcionalizada, permitiendo así hidratar bien la arcilla funcionalizada.

Después de la filtración de la mezcla constituida por el Filtrado A y por la arcilla funcionalizada, se procede al secado del residuo sólido.

El residuo sólido seco puede entonces ser directamente utilizado en las formulaciones de los ejemplos 1 y 2 en lugar del producto Matrixyl® 3000 y del producto Revertime®, en unas concentraciones de lipopéptidos tales como las mencionadas en la presente descripción.

Ejemplo 5

Estudio de la citotoxicidad del producto Revertime® frente a fibroblastos dérmicos humanos normales cultivados en monocapas

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Sistema de ensayo

Unos fibroblastos dérmicos humanos normales se obtuvieron a partir de una plastia abdominal realizada en una mujer de 35 años. Para la realización de los ensayos, se han cultivado estas células hasta la obtención de monocapas confluentes.

5.1.2. Incubación de las células con los productos del ensayo

Las células se han incubado en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones crecientes del producto Revertime®.

El producto Revertime® se ha preparado según el protocolo siguiente.

El producto Revertime® se ha solubilizado en DMSO 100% a una concentración del 1% en peso (concentración final después de la solubilización en el DMSO), el sobrenadante obtenido después de una hora a baño-maría a 37°C y después de ultrasonidos, se ha diluido en el medio de incubación (concentración final máxima en DMSO en el medio de incubación = 1% en volumen).

Las concentraciones finales en peso de Revertime® en el medio de incubación, utilizadas para la incubación de las células, son las siguientes: 0,000001; 0,00001; 0,00005; 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005 y 0,01%.

Las células se incubaron después durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones crecientes, tales como se han mencionado antes, del producto Revertime® "diluido" en el medio de incubación.

5.1.3. Evaluación de los efectos

Al final del periodo de incubación, la viabilidad de las células se evaluó mediante un método espectrofotométrico de dosificación de la actividad de las fosfatasa intracelulares (transformación del p-nitrofenil-fosfato en p-nitrofenol por las fosfatasa intracelulares de las células viables; absorbancia del p-nitrofenol a 405 nm directamente proporcional al número de células viables presentes en los pocillos de cultivo).

5.2. Resultados

Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones experimentales elegidas, después de 48 horas de incubación, el producto Revertime® no disminuye significativamente (> 20%) el número de fibroblastos dérmicos viables presentes en los pocillos de cultivo.

Por consiguiente, el producto Revertime® no presenta un efecto citotóxico frente a fibroblastos dérmicos normales cultivados en monocapas.

Ejemplo 6

5 Estudio de la citotoxicidad de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 frente a fibroblastos dérmicos humanos normales cultivados en monocapas

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Sistema de ensayo

10 Se han obtenido unos fibroblastos dérmicos humanos normales a partir de una plastia abdominal realizada en una mujer de 35 años. Para la realización de los ensayos, se han cultivado estas células hasta la obtención de monocapas confluentes.

6.1.2. Incubación de las células con los productos del ensayo

Las células se han incubado en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones crecientes de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000.

15 Los dos lipopéptidos (es decir, N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg y el N-palmitoil-Gly-His-Lys), o principios activos, se prepararon según el protocolo siguiente.

El principio activo "N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg" se solubilizó a 3,22 mg/ml en una solución de DMSO/HCl al 37% (98, 5: 1,5), y el principio activo "N-palmitoil-Gly-His-Lys" se solubilizó a 6,90 mg/ml en DMSO/HCl al 37% (98, 5: 1,5) para formar respectivamente dos soluciones madres.

20 Estas dos soluciones madres se sometieron a vórtice, se solubilizaron con la ayuda de ultrasonidos y se incubaron durante una hora a baño-maría a 50°C. Después se mezclaron entre sí, a volúmenes equivalentes, para obtener un "MIX".

Las soluciones de ensayo se han diluido después en el medio de incubación (concentración final mínima de DMSO en el medio de incubación = 0,1% en volumen).

25 Las concentraciones finales en peso de MIX en el medio de incubación, utilizadas para la incubación de las células, son las siguientes: 0,00045; 0,00075; 0,001125; 0,0015; 0,0045; 0,0075; 0,01125; 0,015; 0,0225; 0,045; 0,075; 0,1125 y 0,15%.

Las células se han incubado después durante 24 horas en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes, tales como las mencionadas antes, del MIX "diluido" en el medio de incubación.

6.1.3 Evaluación de los efectos

30 El método utilizado es idéntico al descrito en el ejemplo 5 en el párrafo 5.1.3.

6.2. Resultados

Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones experimentales elegidas, después de 24 horas de incubación, la asociación de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 no disminuye significativamente (> 20%) el número de fibroblastos dérmicos viables presentes en los pocillos de cultivo.

35 Por lo tanto, la asociación de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 no presentaba un efecto citotóxico frente a fibroblastos dérmicos normales cultivados en monocapas a las concentraciones ensayadas (del 0,00045 a 0,15%).

Ejemplo 7

40 Estudio del efecto del producto Revertime® y de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 sobre la neosíntesis del procolágeno de tipo I y de ácido hialurónico en un modelo de fibroblastos dérmicos humanos normales adultos cultivados en monocapas

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Sistema de ensayo

45 Se han obtenido unas monocapas confluentes de fibroblastos dérmicos humanos normales cultivando unas células procedentes de una plastia abdominal realizada en una mujer de 33 años.

El activador de referencia utilizado es el "Transforming Growth Factor β " (TGF- β) con 10 ng/ml.

7.1.2. Incubación de los productos

Los fibroblastos se han incubado 24 horas (para el estudio del efecto de los productos del ensayo sobre la producción de ácido hialurónico) y 48 horas (para el estudio del efecto de los productos del ensayo sobre la producción de procolágeno de tipo I), a 37°C, bajo atmósfera húmeda y el 5% de CO₂, en ausencia (medio de cultivo solo) o en presencia del producto de referencia, o de concentraciones crecientes de los productos del ensayo.

La incubación se ha realizado sobre los productos siguientes:

- el producto Revertime® al 0,001; 0,003 y 0,01% (p/v);
- los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 ("MIX") al 0,015; 0,045 y 0,075 %;
- Asociación 1: Revertime® al 0,003% + MIX al 0,015%;
- Asociación 2: Revertime® al 0,01% + MIX al 0,045%; y
- Asociación 3: Revertime® al 0,01% + MIX al 0,075%.

El producto Revertime® se ha preparado según un protocolo idéntico al descrito en el ejemplo 5 en el párrafo 5.1.2.

Los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 para formar el "MIX" se han preparado según un protocolo idéntico al descrito en el ejemplo 6 en el párrafo 6.1.2.

7.1.3. Evaluación de los efectos

- Dosificación del procolágeno de tipo I y del ácido hialurónico

Al final del periodo de incubación, el procolágeno de tipo I y el ácido hialurónico contenidos en los medios de cultivo se cuantificaron con la ayuda de kits ELISA sensibles y específicos.

- Dosificación de las proteínas

Al final del periodo de incubación, las proteínas contenidas en los lisados celulares se cuantificaron mediante un método espectrofotométrico (método de Bradford).

7.2. Resultados

7.2.1. Producto Revertime®

Los resultados se reúnen en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

		Neosíntesis de procolágeno de tipo I	Neosíntesis de ácido hialurónico
Revertime®	0,001%	+ 21,8%	- 14,4%
	0,003%	+ 40,9%	- 24,9%
	0,01%	- 2,2%	- 8,6%

En las condiciones experimentales elegidas, el producto Revertime® induce a un aumento significativo de la neosíntesis de procolágeno de tipo I, en particular para el producto Revertime® al 0,001% y al 0,003%. Sin embargo, no induce a ningún aumento significativo de la neosíntesis de ácido hialurónico.

7.2.2. Los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000

Los resultados se reúnen en la tabla 2 siguiente

Tabla 2

		Neosíntesis de procolágeno de tipo I	Neosíntesis de ácido hialurónico
MIX	0,015%	- 15,1%	+ 16,0%
	0,045%	- 15,9%	+ 43,8%

	0,075%	+ 17,0%	+ 33,8%
--	--------	---------	---------

En las condiciones experimentales elegidas, la asociación de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 no induce a un aumento significativo de la neosíntesis de procolágeno de tipo I con una producción de +17,0% para dicha asociación al 0,075%. Sin embargo, induce a un aumento significativo de la neosíntesis de ácido hialurónico.

5 7.2.3 Asociación del producto Revertime® y de dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000

Los resultados se reúnen en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

		Neosíntesis de procolágeno de tipo I	Neosíntesis de ácido hialurónico
Asociación	1	+ 75,2%	- 10,0%
	2	+ 49,6%	+ 78,7%
	3	+ 48,9%	+ 32,3%

10 En las condiciones experimentales elegidas, la asociación del producto Revertime® y de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 induce, por un lado, a un aumento significativo de la neosíntesis de procolágeno de tipo I (asociaciones 1, 2 y 3) y, por otro lado, a un aumento significativo de la neosíntesis de ácido hialurónico (asociaciones 2 y 3).

7.3. Conclusión

15 Los efectos de la asociación del producto Revertime® (arcilla funcionalizada) y de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 son así significativamente superiores a los obtenidos en presencia de la utilización sólo del producto Revertime® o de la asociación de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000, ya sea sobre la neosíntesis de procolágeno de tipo I o sobre la neosíntesis de ácido hialurónico. Estos efectos son también superiores a la suma de los efectos obtenidos en presencia de cada uno de los productos del ensayo (producto Revertime® por un lado, y asociación de los dos lipopéptidos del producto Matrixyl® 3000 por otro lado) utilizados separadamente.

20 Estos resultados permiten ventajosamente mostrar la existencia de una sinergia real de acción de la asociación de al menos una arcilla funcionalizada y de al menos un lipopéptido sobre los parámetros medidos (producción de procolágeno de tipo I y producción de ácido hialurónico).

REIVINDICACIONES

1. Composición tópica utilizable en dermatología y/o en cosmética, caracterizada por que comprende la asociación de al menos un lipopéptido y de al menos una arcilla funcionalizada, siendo la arcilla funcionalizada obtenida a partir de una arcilla y de un compuesto funcionalizante del tipo compuesto glicoproteico.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que la arcilla comprende una estructura en láminas.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada por que la arcilla pertenece a la familia de los filosilicatos.
- 10 4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada por que los filosilicatos se seleccionan entre las montmorillonitas, la beidellita, la saponita, las illitas, la glauconita, las cloritas, la vermiculita, y las arcillas fibrosas, o una de sus mezclas.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el compuesto glicoproteico es un extracto de alga.
6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada por que el extracto de alga es un extracto de alga verde *Ulva lactusa*.
- 15 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el lipopéptido se selecciona entre un lipotripéptido, un lipotetrapéptido, un lipopentapéptido, y un lipohexapéptido.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el lipopéptido se selecciona entre el N-palmitoil-Gly-His-Lys, el N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg, el N-palmitoil-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser y el N-palmitoil-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly.
- 20 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende dos lipopéptidos
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende un lipotripéptido y un lipotetrapéptido.
- 25 11. Composición según la reivindicación 10, caracterizada por que la composición comprende el N-palmitoil-Gly-His-Lys y el N-palmitoil-Gly-Glu-Pro-Arg.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende como máximo el 0,1% en peso de lipopéptido(s).
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende como máximo el 1% en peso de arcilla(s) funcionalizada(s).
- 30 14. Procedimiento de preparación de una asociación tal como se define en la composición según las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que comprende las etapas que consisten en:
 - i. hidratar la arcilla funcionalizada en un medio acuoso o alcohólico, para obtener una arcilla funcionalizada hidratada, y
 - 35 ii. mezclar el o los lipopéptido(s) y la arcilla funcionalizada hidratada, para obtener uno o varios lipopéptido(s) intercalado(s) en la arcilla funcionalizada.
 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que comprende además la etapa que consiste en:
 - iii. secar el o los lipopéptido(s) intercalado(s) en la arcilla funcionalizada obtenidos en la etapa ii.
 16. Utilización cosmética de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para regenerar la piel.
 - 40 17. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la fabricación de un producto dermatológico.