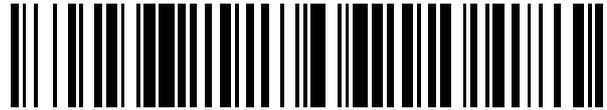


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 966**

51 Int. Cl.:

A61K 8/02 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009 E 09728453 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2257272**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento cosmético del fotoenvejecimiento de la piel**

30 Prioridad:

31.03.2008 US 40891 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2014

73 Titular/es:

**SCARCELL THERAPEUTICS (100.0%)
34 avenue des Champs Elysées
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GOGLY, BRUNO;
LAFONT, ANTOINE y
COULOMB, BERNARD**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 441 966 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

Procedimiento para el tratamiento cosmético del fotoenvejecimiento de la piel

5 **[0001]** En el envejecimiento de la piel se produce un desequilibrio entre la síntesis de la matriz extracelular (MEC) y su degradación por las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Este desequilibrio lleva a una degradación excesiva de la matriz extracelular, una característica del envejecimiento de la piel (Cauchard y Homebeck (2004) Vivant 5). El envejecimiento de la piel se asocia a un aumento en el número y en la profundidad de las arrugas, una consecuencia directa de la degradación de las macromoléculas de la dermis, como los colágenos y la elastina.

10 **[0002]** En la dermis, la sobreproducción de MMP que se produce en el envejecimiento cronológico y fotoinducido es estimulada por los radicales libres de oxígeno. Además, en las zonas de la piel expuestas al sol, como el cutis, se producen otros efectos perjudiciales de los rayos UV, en concreto, la síntesis incompleta de colágeno, la pigmentación de la piel y la elastosis solar (que se manifiesta como una degradación del entramado elástico cutáneo). Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que los fibroblastos de la piel sometidos a
15 tratamiento con rayos UV sobreproducen MMP (Brennan y col. (2003) Photochem. Photobiol. 78:43-48).

[0003] Las colagenasas 1 y 3 (MMP-1 y MMP-3) y MT1-MMP (MMP-14) degradan los colágenos, mientras que las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) degradan la elastina. Otras metaloproteinasas como la estromelisin 1
20 (MMP-3) están implicadas tanto en la degradación del colágeno como de la elastina.

[0004] Los fibroblastos dérmicos se han usado en el marco del tratamiento del envejecimiento de la piel (Weiss y col. (2007) Dermatol Surg. 33:263-8). Podría observarse un aumento de la retícula de colágeno en 215 sujetos a los que se inyectaron fibroblastos dérmicos autólogos (20 millones/ml) en las arrugas profundas. La mejora
25 de las arrugas seguía siendo claramente visible en el 80% de los sujetos un año después de la inyección.

[0005] Los fibroblastos gingivales son células mesenquimales capaces de migrar, adherirse y proliferan dentro de los tejidos conjuntivos blandos de las encías, manteniendo de este modo la integridad del tejido gingival que está expuesto a numerosas agresiones como estrés mecánico, infecciones bacterianas o variaciones de pH y
30 temperatura. Los fibroblastos gingivales se describen en particular en Gogly y col., (1997) Clin. Oral Invest. 1:147-152; Gogly y col. (1998) Biochem. Pharmacol. 56:1454 y Ejeil y col. (2003) J. Periodontol. 74:188-195.

[0006] Dependiendo de las condiciones ambientales, los fibroblastos gingivales son capaces de modular su fenotipo y responder mediante proliferación, migración, síntesis de los compuestos de la matriz o enzimas
35 relacionadas con la matriz.

[0007] Los fibroblastos gingivales sintetizan colágenos (p. ej. tipos I, III, V, VI, VII, XII), fibras elásticas (oxitalán, elaunina y elastina), proteoglicanos y glucosaminoglucanos (p. ej., decorina, biglucano) y glucoproteínas (p. ej., fibronectina, tenascina). Simultáneamente, los fibroblastos gingivales sintetizan enzimas que son capaces de
40 degradar los compuestos macromoleculares (metaloproteinasas de la matriz; MMP), aunque también enzimas que inhiben formas activas de MMP (inhibidores de metaloproteinasas; TIMP). Los fibroblastos gingivales son, por tanto, actores importantes de la remodelación de la matriz extracelular.

Resumen de la invención

45 **[0008]** La presente invención surge del hallazgo inesperado de los inventores de que los fibroblastos gingivales son más adecuados que los fibroblastos dérmicos para inhibir la actividad de las MMP que se originan a partir de los fibroblastos dérmicos tratados con rayos UV.

50 **[0009]** Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para la prevención o tratamiento del fotoenvejecimiento de la piel en un individuo, que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad cosméticamente activa de un producto derivado de fibroblastos gingivales.

Descripción de las figuras

55 **[0010]** La figura 1 representa la cantidad de MMP-9 (eje vertical, pg/100.000 células) en el medio de cultivo de: fibroblastos dérmicos humanos (hDF) no tratados; fibroblastos dérmicos humanos (hDFi1) tratados con UV-A a una dosis de 7,5 julios/cm²; hDFi1 en presencia de medio condicionado de fibroblastos gingivales humanos (cmhGF); hDFi1 en presencia de medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos (cmhDF); fibroblastos
60 dérmicos humanos (hDFi2) tratados con rayos UV-A a una dosis de 15 julios/cm²; hDFi2 en presencia de medio condicionado de fibroblastos gingivales humanos (cmhGF) y hDFi2 en presencia de medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos (cmhDF).

[0011] La figura 2 representa la concentración de TIMP-1 (eje vertical, pg/ml/100.000 células) en medio
65 condicionado de fibroblastos dérmicos humanos (cmhDF), en el medio de cultivo de fibroblastos dérmicos humanos tratados con luz UV-A a una dosis de 7,5 julios/cm² (hDFi1) o 15 julios/cm² (hDFi2) o en medio condicionado de

fibroblastos gingivales humanos (cmhGF).

5 **[0012]** La figura 3 representa la concentración de complejos MMP-9/TIMP-1 (eje vertical, pg/ml/100.000 células) en el medio de cultivo de: fibroblastos dérmicos humanos (hDF) no tratados; fibroblastos dérmicos humanos (hDFi1) tratados con UV-A a una dosis de 7,5 julios/cm²; hDFi1 en presencia de medio condicionado de fibroblastos gingivales humanos (cmhGF); hDFi1 en presencia de medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos (cmhDF); fibroblastos dérmicos humanos (hDFi2) tratados con UV-A a una dosis de 15 julios/cm²; hDFi2 en presencia de medio condicionado de fibroblastos gingivales humanos (cmhGF) y hDFi2 en presencia de medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos (cmhDF).

10

Descripción detallada de la invención

15 **[0013]** Como se pretende en este documento, «envejecimiento de la piel» se refiere a defectos de la piel que se producen como consecuencia de una degradación de los componentes de la piel debido a factores crónicos, como estrés mecánico, oxidativo y/o lumínico.

20 **[0014]** En particular, el envejecimiento de la piel puede ser consecuencia del envejecimiento cronológico y/o del fotoenvejecimiento. El «envejecimiento cronológico» se refiere a defectos de la piel que se producen como consecuencia del envejecimiento. El «fotoenvejecimiento» se refiere a defectos de la piel que se producen como consecuencia de la exposición de la piel a la luz y, en particular, a los rayos UV; más en particular, a los rayos UV-A.

25 **[0015]** Los defectos de la piel pueden ser principalmente arrugas o pérdida de elasticidad de la piel. Los constituyentes degradados de la piel pueden ser elastina y/o colágenos, por lo que el procedimiento según la invención es útil para aumentar la síntesis de los mismos dentro de la dermis.

25

[0016] El procedimiento de la invención es para la prevención o tratamiento del fotoenvejecimiento de la piel.

[0017] Preferiblemente, el individuo es un mamífero y, más preferiblemente, un ser humano.

30 **[0018]** Los procedimientos para obtener, cultivar y conservar fibroblastos gingivales son bien conocidos por el experto en la materia y se describen especialmente en Naveau y col. (2006) J. Periodontol. 77:238-47 y en Gogly y col. (2007) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:1984-90.

35 **[0019]** De forma ventajosa, los fibroblastos gingivales se obtienen y cultivan fácilmente. Por otra parte, los fibroblastos gingivales poseen una alta velocidad de expansión.

40 **[0020]** Preferiblemente, los fibroblastos gingivales utilizados en el procedimiento según la invención son autólogos, ya que se obtienen del individuo al cual se pretende administrar el producto derivado de fibroblastos gingivales.

40

[0021] De forma ventajosa, los fibroblastos gingivales proporcionan una fuente prácticamente ilimitada de fibroblastos autólogos. Además, en caso de envejecimiento de la piel, los fibroblastos gingivales autólogos competentes para el cultivo normalmente siguen disponibles, mientras que por el contrario, la fuente de fibroblastos dérmicos autólogos competentes para el cultivo es escasa.

45

[0022] Sin embargo, los fibroblastos gingivales también pueden ser alogénicos, es decir, que se obtienen de otro individuo de la misma especie, o heterólogos, que se obtienen de otro individuo de otra especie.

50 **[0023]** Como se pretende en este documento, «producto derivado de fibroblastos gingivales» se refiere a cualquier producto que puede obtenerse de fibroblastos gingivales en sí mismos o que contienen secreciones de fibroblastos gingivales. Por ejemplo, se prefiere que el producto derivado de fibroblastos gingivales se seleccione entre el grupo compuesto por células completas de fibroblastos gingivales, un cultivo de fibroblastos gingivales, un extracto de fibroblastos gingivales y un medio condicionado de fibroblastos gingivales.

55 **[0024]** Los extractos de fibroblastos gingivales pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento de fragmentación celular conocido en la técnica.

60 **[0025]** El medio condicionado de fibroblastos gingivales se refiere a cualquier medio, como un medio de cultivo celular líquido, que ha estado en contacto con fibroblastos gingivales, en particular durante un tiempo suficiente para que los fibroblastos gingivales hayan secretado sus productos al medio.

[0026] La administración del producto derivado de fibroblastos gingivales, preferiblemente en un lugar próximo a la zona de la piel que se quiere tratar, puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Sin embargo, se prefiere que el producto derivado de fibroblastos gingivales se administre por vía tópica o mediante inyección intradérmica. Estas vías de administración son bien conocidos por cualquier experto en la materia y se describen principalmente en Weiss y col. (2007) Dermatol Surg. 33:263-8.

65

[0027] Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende las siguientes etapas:

- 5 - obtener los fibroblastos gingivales del individuo;
- cultivar los fibroblastos gingivales;
- obtener un producto derivado de fibroblastos gingivales a partir de los fibroblastos gingivales cultivados;
- 10 - administrar el producto derivados de fibroblastos gingivales al individuo.

EJEMPLO

Procedimientos

15

1. Cultivo celular

[0028] Se obtuvieron cinco cultivos de fibroblastos gingivales (hGF) y tres de fibroblastos dérmicos (hDF) humanos de explantes gingivales y dérmicos de pacientes sanos (20-30 años de edad). Se establecieron los cultivos de explantes primarios que se usaron desde el pase 3 al 5.

Preparación de medio condicionado de hGF o hDF

[0029] Se retiró el medio de cultivo (DMEM/FCS) de frascas de 75 cm² con cultivos de hGF y hDF en confluencia. A continuación se añadieron 24 ml de DMEM que se recuperaron 24 horas más tarde. Después el medio condicionado se congeló hasta su uso.

Preparación de las células

30 **[0030]** Se sembraron tres placas de 12 pocillos con hDF procedentes de frascas de cultivo de 25 cm² crecidas hasta la confluencia. Cuando se alcanzó la confluencia (150.000 células por pocillo), se irradiaron dos placas con UV-A a dosis de 7,5 y 15 julios/cm², respectivamente; la tercera placa se utilizó como control para comprobar la ausencia de MMP-9 en ausencia de irradiación.

35 **[0031]** Los medios de cultivo se cambiaron tras la irradiación. A cada frasca se le añadieron los siguientes medios:

- Solo DMEM en 4 pocillos (1 ml por pocillo)

40 - Medio condicionado de hGF en 4 pocillos (1 ml por pocillo)

- Medio condicionado de hDF en 4 pocillos (1 ml por pocillo)

[0032] A continuación, los medios de cultivo se recogieron 24 horas después, se alicuotaron y se conservaron a -80°C para el análisis posterior de la secreción de proteínas. Las células se fijaron en los pocillos y se tiñeron con GEMSA.

2. Análisis de la secreción de MMP-9 y TIMP-1

50 *Zimograma de gelatina (MMP-9)*

[0033] Los zimogramas de gelatina se realizaron sobre 20 µl de medio de cultivo. Se corrieron 10 µl de pro-MMP-9 (92 kDa) y 10 µl de pro-MMP2 (72 kDa) (10 ng) (BC058 y BC057; ABCys) en el mismo gel para facilitar la identificación de los tipos de MMP. Adicionalmente, se corrieron en paralelo 10 µl de pro-MMP-9 incubados con APMA (2 mM) a 37°C durante 1 hora para visualizar la posición de MMP-9.

Transferencia en puntos (MMP-9 y TIMP-1)

[0034] Se aplicaron 10 µl de medio de cultivo en una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se trataron a continuación con anticuerpos monoclonales primarios de ratón anti-MMP-9 (forma libre) y anti-TIMP-1 (IM37 e IM32, respectivamente; Calbiochem) a una dilución 1/500. Tras el lavado en TBS/Tween (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5), las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa (1/1.000; DC08L; Calbiochem) durante 1 hora. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron en placas Kodak Biomax MR. El tamaño de los puntos (área superficial) y las intensidades de grises se analizaron usando el software Image J (Image J; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). La concentración se determinó mediante comparación con 10 pg de patrones de MMP-9 o TIMP-1 (PF140 y PF019, respectivamente; Calbiochem).

[0035] El análisis cuantitativo complementario de MMP-9 libre y TIMP-1 se realizó mediante ELISA (DMP900 y DTM100; R&D Systems).

5 **[0036]** El análisis estadístico entre los diferentes experimentos se realizó usando la prueba de la *t* de Student pareada.

3. Determinación de complejos MMP-9/TIMP-1

10 **[0037]** Los complejos MMP-9/TIMP-1 humanos totales se cuantificaron usando un kit de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) (DY1449; R&D Systems).

Resultados

15 1. El medio condicionado de fibroblastos gingivales humanos inhibe la expresión de MMP-9 por fibroblastos dérmicos humanos irradiados con UV

[0038] La **figura 1** muestra que los fibroblastos dérmicos humanos (hDF) no producen MMP-9, excepto después de la irradiación con UV-A a una dosis de 7,5 julios/cm² (hDFi1) o 15 julios/cm² (hDFi2). Un medio
20 condicionado de fibroblastos gingivales humanos (cmhGF) reduce la producción de MMP-9 a partir de fibroblastos dérmicos tratados con UV en un 50%, mientras que el medio condicionado de fibroblastos dérmicos (cmhDF) reduce la producción de MMP-9 solo en un 15%.

25 2. Los fibroblastos gingivales humanos producen más TIMP-1 (inhibidor tisular de MMP-9) que los fibroblastos dérmicos humanos

[0039] La **figura 2** muestra que el medio condicionado de hGF contiene al menos 3 veces más TIMP-1 que el de hDF, irradiado o no.

30 3. Aumento de la cantidad de complejos MMP-9/TIMP-1 en presencia de fibroblastos gingivales humanos

[0040] La **figura 3** muestra que la cantidad de complejos TIMP-1/MMP-9 es el doble en presencia de cmhGF que en presencia de cmhDF.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento no terapéutico para la prevención o el tratamiento del fotoenvejecimiento de la piel en un individuo, que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad cosméticamente activa de un
5 producto derivado de fibroblastos gingivales seleccionado entre el grupo compuesto por células completas de fibroblastos gingivales, un cultivo de fibroblastos gingivales y un medio condicionado de fibroblastos gingivales.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para la prevención o el tratamiento cosmético de arrugas o pérdida de elasticidad de la piel.
10
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para la prevención o el tratamiento del fotoenvejecimiento del cutis.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para aumentar la síntesis de
15 elastina y/o colágeno en la dermis.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el producto derivado de fibroblastos gingivales se administra por vía tópica o mediante inyección intradérmica.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el producto derivado de fibroblastos gingivales es un medio condicionado de fibroblastos gingivales.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el producto derivado de fibroblastos gingivales se obtiene a partir de fibroblastos gingivales tomados del individuo.
25
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:
- tomar fibroblastos gingivales del individuo;
30 - cultivar los fibroblastos gingivales;
- obtener un producto derivado de fibroblastos gingivales a partir de fibroblastos gingivales en cultivo, estando dicho producto derivado de fibroblastos gingivales seleccionado entre el grupo compuesto por células completas de fibroblastos gingivales, un cultivo de fibroblastos gingivales y un medio condicionado de fibroblastos gingivales; y
35 - administrar el producto derivado de fibroblastos gingivales al individuo.

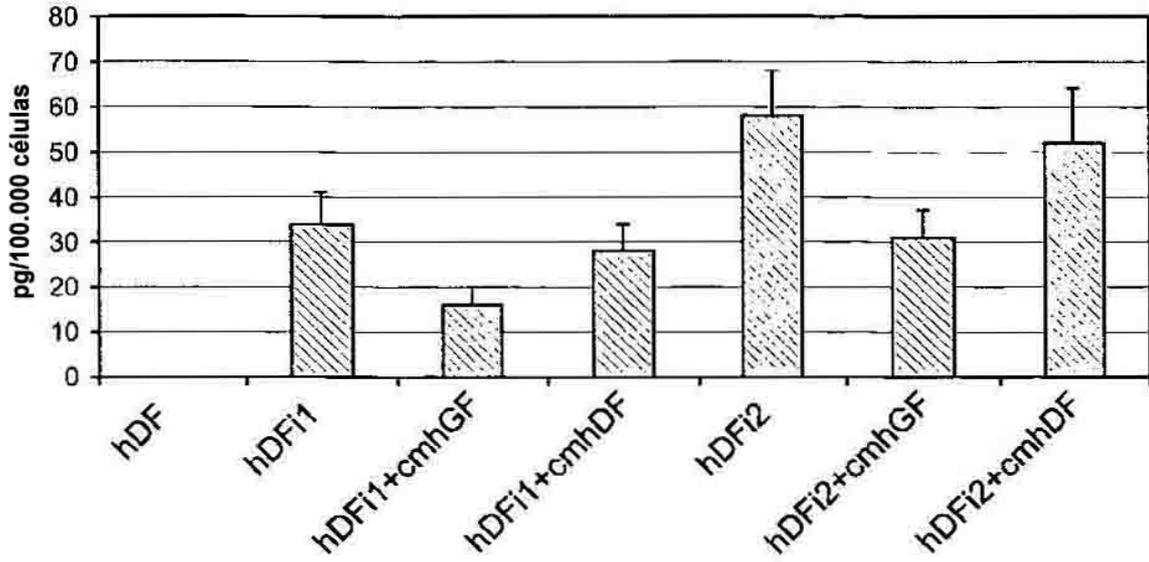


FIG.1

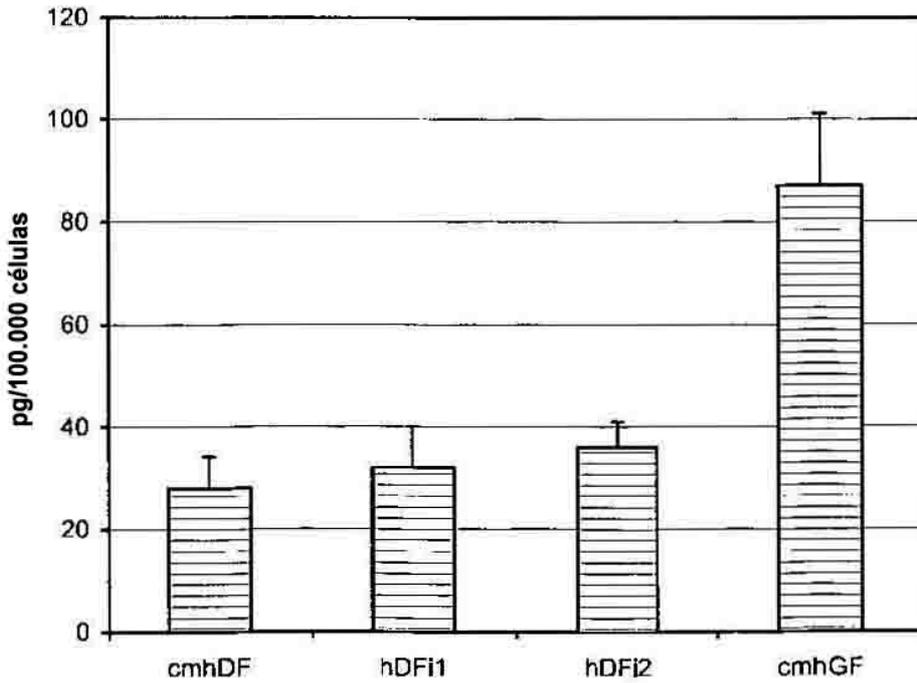


FIG.2

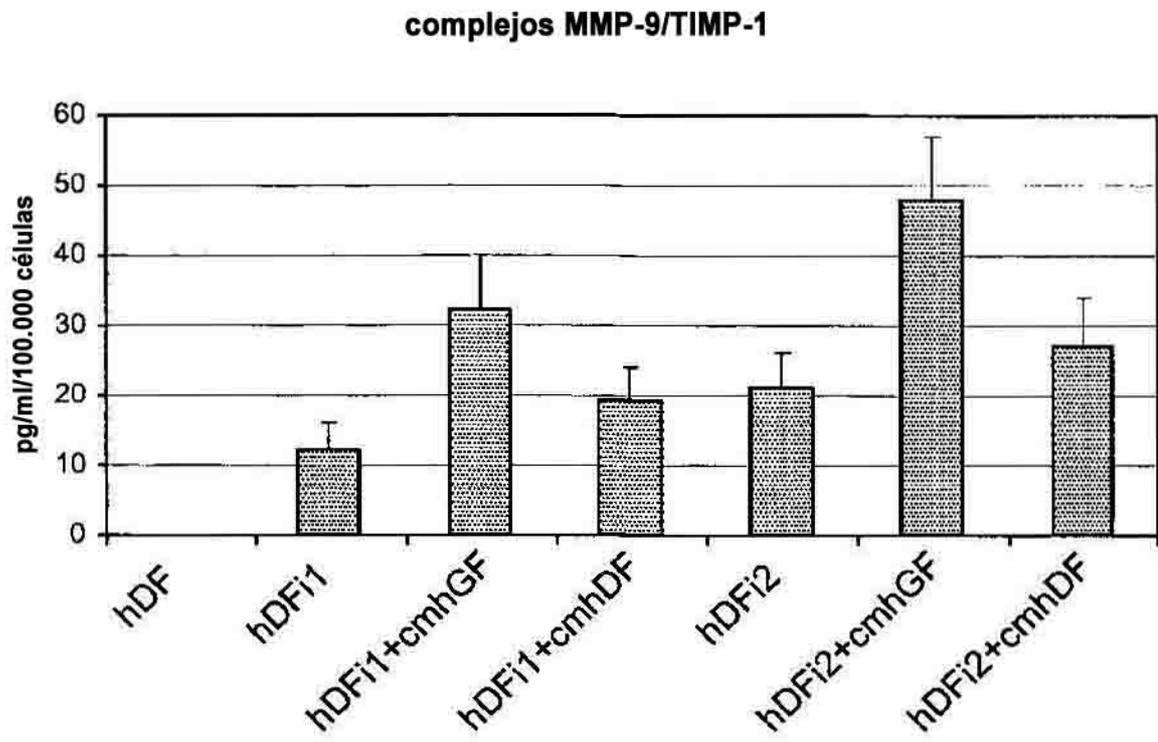


FIG.3