

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 513**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09804288 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2370453**

54 Título: **Péptidos derivados de HMG-CoA reductasa y composición cosmética y/o farmacéutica que los contienen**

30 Prioridad:

23.12.2008 FR 0807364

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

23.04.2015

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS INC. (100.0%)
1011 Centre Road, Suite 315
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 534 513 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).

PÉPTIDOS DERIVADOS DE HMG-COA REDUCTASA Y COMPOSICIÓN COSMÉTICA Y/O FARMACÉUTICA QUE LOS CONTIENEN

Descripción

5

[0001] La presente invención se sitúa dentro del campo cosmético y farmacéutico, y más particularmente en el campo de la dermatología. La presente invención se refiere a péptidos derivados de la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril Co-A reductasa humana (HMG-CoA reductasa humana) de fórmula general (I)

10



y de secuencia SEC ID n°1 a SEC ID n°10.

15

[0002] La presente invención también se refiere a una composición cosmética o farmacéutica que comprende un péptido de fórmula general (I), utilizado solo o en combinación con al menos otro principio activo. La invención también se refiere al uso de ese nuevo péptido, como principio activo activador de la HMG-CoA reductasa humana en una composición cosmética destinada a reforzar la función de barrera de la piel y estimular la diferenciación epidérmica. La invención también se refiere al uso de ese nuevo principio activo para producir una composición farmacéutica, y especialmente dermatológica, para prevenir o tratar las disfunciones patológicas relacionadas con una alteración de la función de barrera. La invención también se refiere a un método de tratamiento cosmético para prevenir y/o luchar contra las agresiones externas y las manifestaciones de envejecimiento cutáneo, según el cual se aplica una cantidad eficaz de ingrediente activo, o una composición que lo contiene, sobre las zonas a tratar.

25

[0003] La función principal de la epidermis es constituir una barrera entre el ambiente exterior y el medio interno. Es la capa más externa de la epidermis, el *stratum corneum*, el que proporciona esta función. Se compone de queratinocitos en la fase final de su diferenciación, los corneocitos, sellados entre sí por un espeso cemento intercelular, a la vez flexible e impermeable. Se distingue también en el *stratum corneum* un compartimento celular constituido por corneocitos y un compartimento extracelular constituido principalmente de lípidos, organizados en estructuras multilaminares.

30

35

[0004] El contenido de lípidos del *stratum corneum* humano se estima en 15% de ester de colesterol, 16% de ácidos grasos libres saturados de cadenas largas, 32% de colesterol, 37% de ceramidas, aunque las variaciones interindividuales son bastante importantes (Norlen L. et al J. Invest Dermatol 1999; ... 112 (1) 72-77 p.). Estos lípidos son sintetizados por los queratinocitos de las capas intermedias de la epidermis, y se secretan en orgánulos especializados llamados "cuerpos lamelares" o cuerpos de Odland. En particular, la epidermis es un sitio activo para la síntesis de colesterol. La etapa limitante de esta síntesis, y la más finamente regulada, es la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) en mevalonato. Esta etapa está catalizada por una enzima de membrana llamada HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.34). Los datos de secuenciación del genoma humano muestran que hay al menos dos isoformas de la HMGCoA reductasa, codificadas por un único gen, localizado en el cromosoma 5 (Luskey et al., J Biol Chem. 1985 260 (18), p. 10271-7).

45

[0005] En la piel, el colesterol juega un papel en la fluidez de las membranas y, en particular, parece asegurar la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas en las bicapas lipídicas (Martini MC, Pathol. Biol. 2003, (51), p. 267 -270). Así, en

condiciones fisiológicas, el colesterol se sintetiza a un nivel necesario para mantener la homeostasis. En contraste, después de una alteración brutal de la barrera de la piel, se observa un aumento rápido y significativo de la síntesis de colesterol, asociado con un aumento de la expresión y actividad de la HMG-CoA reductasa (Menon GK et al., J. Lipid Res., 1985, (26), P. 418-427).

[0006] El papel clave de la HMG-CoA reductasa se ha convertido en un objetivo para la modulación de la expresión del colesterol en el organismo. Se ha desarrollado así una clase de compuestos farmacológicos para inhibir la HMG-CoA reductasa con el fin de bajar el colesterol circulante, llamados estatinas. Este efecto inhibitorio de las estatinas también se manifiesta en la piel humana. De hecho, la administración experimental por vía tópica de las estatinas perturba la función barrera de la piel (Proksch E. et al., British J. Dermatol., 1993, (128), P. 473-482). Estos resultados confirman la importancia del colesterol en la función de barrera epidérmica y el papel central de la HMG-CoA reductasa en la modulación de su síntesis.

[0007] En el curso del envejecimiento cutáneo, la integridad de la barrera cutánea y sus capacidades de reparación se deterioran. Se observa una deficiencia global en lípidos, lo que resulta en una disminución de las multicapas lipídicas del compartimiento extracelular del *stratum corneum*. Estos cambios funcionales se correlacionan con una mayor susceptibilidad de pieles envejecidas a las agresiones externas (Ghadially R. et al., J Clin Invest. 1995 (95 (5)), pp. 2281-90).

[0008] Independientemente del envejecimiento intrínseco o fotoinducido, alteraciones de la barrera cutánea pueden ocurrir cuando hay agresiones externas.

[0009] Se entiende por la expresión "agresión externa", las agresiones que puede producir el ambiente. A título de ejemplo, se puede citar agresiones tales como la polución, los rayos UV, o incluso los productos irritantes tales como los tensioactivos, los conservantes o los perfumes, las agresiones mecánicas, tales como las abrasiones, el afeitado o la depilación. Por polución, se entiende tanto la polución "externa", debida por ejemplo a las partículas diesel, al ozono o a los metales pesados, como la polución "interna" que puede ser debido, en particular, a las emisiones de disolventes de pinturas, de colas o pinturas de papel (como tolueno, estireno, xileno o benzaldehído), o incluso el humo del cigarrillo. La sequedad de la atmósfera es también una causa importante de agresión cutánea. Estas agresiones externas resultan en una alteración de la función barrera que se traduce en un malestar cutáneo, fenómenos sensoriales desagradables, tales como tirantezas o picazones o excesivas fragilidades y enrojecimientos.

[0010] En este contexto, es deseable intentar evitar que se altere o restablecer la función barrera de la epidermis. En este campo particular, la aportación directa de sustitutos lipídicos, como las ceramidas (EP 1272148) o ciertos derivados del colesterol (FR 2 789 312) se ha descrito ampliamente. Por otra parte, se ha descrito igualmente el uso de aceites vegetales para activar la síntesis de los lípidos cutáneos (EP 1707189).

[0011] Se conoce el uso de los péptidos en composiciones farmacéuticas (WO2005/060683). También es conocido para su uso en composiciones para tratar el envejecimiento de la piel o para tratar las irritaciones o inflamaciones de la piel (WO2007/068998). El documento "Gruszecka, M et al. ; *Synthesis of peptides as potential antiviral agents against human rhinovirus 14, 19* " describe péptidos antivirales probados en cuanto a su capacidad para proteger las células contra el rinovirus humano 14.

5 [0012] En el campo de la cosmética, la orientación molecular de la HMG-CoA reductasa se ha explotado ya, pero con el fin de inhibir esta enzima clave, por ejemplo usando estatinas, ya conocidas por sus propiedades inhibitoras de HMGCoA, con el fin de obtener un efecto anti-envejecimiento, (EP 0738510; FR2868309). Sin embargo, hasta la fecha, ningún documento describe o sugiere que un péptido derivado de de la HMG-CoA reductasa humano puede tener propiedades interesantes para mejorar la función de barrera cutánea y para estimular la diferenciación epidérmica. Ahora se ha contemplado activar la HMG-CoA reductasa con el fin de reforzar la función de barrera y la diferenciación de la epidermis. También es posible mejorar por esta acción de algunas disfunciones patológicas ligadas a la función de barrera (pieles hipersensibles, irritadas, o reactivas, eczema atópico).

10 [0013] La presente invención tiene como principal objetivo proporcionar un nuevo principio activo, capaz de reforzar la función de barrera cutánea, estimular la diferenciación epidérmica y de ese modo evitar las manifestaciones del envejecimiento cutáneo o proteger la piel de las agresiones externas. Los inventores han demostrado de hecho una actividad cosmética y terapéutica, especialmente dermatológica, de péptidos derivados de la HMG-CoA reductasa humana.

15 [0014] En particular, se ha demostrado que esos péptidos, cuando se aplican a la piel, fortalecen la función barrera de la epidermis y estimulan la diferenciación epidérmica. Estas propiedades se han demostrado por una mejor protección de tejido de la piel frente a agresiones externas y un aumento de la producción de lípidos constituyentes de la capa córnea.

20 [0015] SE entiende por " principio activo activador de la HMG-CoA reductasa o capaz de activar la HMG-CoA reductasa humana", cualquier péptido o derivado biológicamente activo capaz de aumentar la actividad de la HMG-CoA reductasa, bien por el aumento de la síntesis de proteínas de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por modulación directa o indirecta de la expresión génica de la HMG-CoA reductasa), o bien por el aumento de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa, o bien por otros procesos biológicos tales como la estabilización de la proteína HMG-CoA reductasa o incluso la estabilización de los transcritos de ARN mensajero.

25 [0016] Se entiende por piel, el conjunto de tejidos de recubrimiento que constituyen la piel y las mucosas.

30 [0017] Se entiende por "aplicación tópica" el hecho de aplicar o extender el principio activo según la invención, o una composición que lo contiene, en la superficie de la piel.

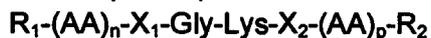
35 [0018] Se entiende por « fisiológicamente aceptable » que el principio activo según la invención, o una composición que lo contiene, es apropiada para entrar en contacto con la piel sin provocar reacciones de toxicidad o intolerancia.

40 [0019] Así, la invención tiene por primer objeto un péptido derivado de la HMG-CoA reductasa humana.

45 [0020] La expresión "péptido derivado de la HMG-CoA reductasa humana" significa cualquier fragmento peptídico biológicamente activo cuya secuencia de aminoácidos es completamente o parcialmente homóloga o análoga a la secuencia peptídica de la HMG-CoA reductasa humana.

[0021] El término "biológicamente activo" significa "que tiene una actividad *in vivo* o *in vitro* característica de la actividad del ingrediente activo de la invención".

[0022] Según una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, el péptido tiene una secuencia que responde en todo o en parte a la fórmula general (I)



[0023] En la que,

- 5 X_1 es la lisina o la arginina o cualquier aminoácido,
 X_2 es la serina o la treonina,
 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 amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituido
 10 por un grupo protector que se puede seleccionar de 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 de una cadena alquilo de C_1 a C_{20} , o un grupo NH_2 , NH_Y o NYY con
 15 Y representando una cadena alquilo de C_1 a C_4 .

El péptido se caracteriza porque se selecciona entre las secuencias siguientes:

- (SEC ID n°1) Glu-Gly-Lys-Gly-Lys-Ser-Val-Val-Cys-Glu
 (SEC ID n°2) Glu-Gly-Lys-Gly-Lys-Ser-Val-Val
 (SEC ID n°3) Asp-Gly-Lys-Gly-Lys-Thr
 20 (SEC ID n°4) Arg-Gly-Lys-Ser
 (SEC ID n°5) Arg-Gly-Lys-Ser- NH_2
 (SEC ID n°6) Arg-Gly-Lys-Thr
 (SEC ID n°7) Arg-Gly-Lys-Thr- NH_2
 (SEC ID n°8) Lys-Gly-Lys-Ser
 25 (SEC ID n°9) Lys-Gly-Lys-Ser- NH_2
 (SEC ID n°10) Gly-Lys-Ser- NH_2

[0024] En una realización de particular interés, el péptido biológicamente activo corresponde a la secuencia SEC ID No. 4.

- [0025]** En otra forma de realización de particular interés, el péptido biológicamente
 30 activo corresponde a la secuencia SEC ID N° 5. La invención también se refiere a formas homólogas de estas secuencias. El término "homólogo" designa, de acuerdo con la invención, cualquier secuencia peptídica idéntica a al menos 50%, o preferiblemente al menos 80%, e incluso más preferiblemente a al menos 90% de dicha secuencia peptídica, seleccionada entre las secuencias SEC ID n° 1 a SEC ID n°
 35 10. Por "secuencia peptídica idéntica a al menos X%" se pretende denotar un porcentaje de identidad entre los residuos de aminoácidos de las dos secuencias a comparar, obtenido después de la alineación óptima de las dos secuencias. Se obtiene la alineación óptima usando algoritmos de homologías locales tales como los utilizados por el software informático BLAST P o T BLAST N disponibles en el sitio NCBI.

- [0026]** El término "homólogo" también puede referirse a un péptido que difiere de la
 40 secuencia de un péptido de secuencia SEC ID n°1 a SEC ID n° 10 por la sustitución de aminoácidos químicamente equivalentes, es decir por la sustitución de un residuo por otro que posee las mismas características. Por lo tanto, las sustituciones clásicas tienen lugar entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y
 45 Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

[0027] En la invención, el término "aminoácido" se refiere aquí a todo ácido orgánico natural o no natural que tenga la fórmula:

NHR-CR-C(O)-O

o cada R se selecciona independientemente entre un hidrógeno y un grupo alquilo que tiene entre 1 y 12 átomos de carbono. Preferiblemente, al menos un grupo -R de cada aminoácido es un hidrógeno. Por el término "alquilo" se entiende aquí una cadena carbonada que puede ser lineal o ramificada, sustituida (mono- o poli-) o no sustituida;

5

saturada, mono-saturada (un enlace doble o triple en la cadena) o poli-insaturada (dos o varios enlaces dobles, dos o varios enlaces triples, uno o varios enlaces dobles y uno o varios triples enlaces en la cadena).

[0028] El término "péptido" significa una cadena de dos o varios aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por enlaces peptídicos modificados.

10

[0029] Por "péptido" debe entenderse el péptido natural o sintético de la invención como se describe anteriormente, o al menos uno de sus fragmentos, ya sea obtenido por proteolisis o de forma sintética o incluso cualquier péptido natural o sintético cuya secuencia esté constituida total o parcialmente por la secuencia del péptido descrito anteriormente.

15

[0030] Con el fin de mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido de la invención. La forma de protección debe obviamente ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con un uso en el campo de la cosmética o de la farmacia.

20

[0031] Pueden considerarse muchas formas biológicamente compatibles de protección. Son bien conocidas por los expertos en la técnica como, por ejemplo, la acilación o la acetilación del extremo amino terminal, o la amidación o la esterificación del extremo carboxi terminal. Por lo tanto, la invención se refiere a una composición como se define anteriormente, caracterizada por el hecho de que el péptido de secuencia de SEC ID nº 1 a SEC ID nº 10 está bajo una forma protegida o no. Se puede utilizar una protección basada en una sustitución en el extremo amino-terminal por un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo. Preferiblemente, se utiliza una protección basada en la amidación de la función hidroxilo del extremo carboxi-terminal por un grupo NYY con Y representando una cadena de alquilo de C₁ a C₄, o la esterificación por un grupo alquilo. También es posible proteger ambos extremos del péptido. Los derivados de péptidos también se refieren a los aminoácidos y los péptidos unidos por un enlace pseudopeptídico. Se entiende por "enlace pseudo-peptídico", todos los tipos de enlaces que puedan sustituir a los enlaces peptídicos "clásicos".

25

30

35

[0032] En el campo de los aminoácidos, las moléculas tienen una geometría tal, que pueden teóricamente presentarse bajo la forma de isómeros ópticos diferentes. Existe así una conformación molecular del aminoácido (AA) que desvía a la derecha el plano de polarización de la luz (conformación dextrógira o D-aa), y una conformación molecular del aminoácido (aa) que desvía a la izquierda el plano de polarización de la luz (conformación levógira o L-aa). Los aminoácidos naturales son siempre de conformación levógira, por lo tanto, un péptido de origen natural consistirá sólo de aminoácidos de tipo L-aa. Sin embargo, la síntesis química en laboratorio permite preparar aminoácidos que tienen las dos posibles conformaciones. A partir de este material de base, es posible incorporar en la síntesis de péptido tanto aminoácidos bajo forma de isómeros ópticos levógiros o dextrógiros. Por lo tanto, los aminoácidos que constituyen el péptido según la invención pueden estar bajo configuración L- y D-; preferiblemente, los aminoácidos están en forma L. El péptido de la invención puede estar bajo forma L-, D- o DL-. El péptido de fórmula general (I) según la invención se

40

45

puede obtener por síntesis química clásica (en fase sólida o en fase homogénea líquida), o por síntesis enzimática (Kullmann et al., J. Biol. Chem., 1980, 225, 8234), a partir de aminoácidos constituyentes o de sus derivados.

- 5 **[0033]** El péptido de la invención pueden ser de origen natural o sintético. Preferentemente según la invención, el péptido se obtiene por síntesis química.
- [0034]** Según la invención, el principio activo puede ser un péptido único, una mezcla de péptidos o de derivados de péptidos y/o consistir en derivados de aminoácidos.
- [0035]** Según la invención, dicho péptido o mezcla de péptidos se puede usar como un medicamento.
- 10 **[0036]** Según una forma de realización ventajosa de la invención, el principio activo de la invención se solubiliza previamente en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, convencionalmente utilizados por el experto en la materia, tales como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 15 **[0037]** Según una forma de realización ventajosa adicional de la invención, el principio activo de la invención se solubiliza previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas, o se adsorbe sobre polímeros orgánicos pulverulentos, soportes inorgánicos como los talcos y bentonitas, y más en general en solubilizan en o fijan sobre cualquier vector fisiológicamente aceptable.
- 20 **[0038]** La invención tiene por segundo objeto una composición cosmética, farmacéutica, y especialmente dermatológica, que comprende, en un medio fisiológicamente adaptado, un péptido de fórmula general (I) como principio activo, solo o en asociación con al menos otro principio activo.
- 25 **[0039]** Es evidente que la invención se refiere a mamíferos en general, y más en particular a los seres humanos.
- [0040]** Según una forma de realización ventajosa de la invención, el principio activo según la invención está presente en las composiciones de la invención en una concentración comprendida entre unas 0,0005 y 500 ppm (partes por millón), y preferentemente en una concentración entre unas 0,01 y 5 ppm basada en el peso total de la composición final.
- 30 **[0041]** La composición utilizable según la invención puede consistir, en particular, en una composición para cuidados del cabello, y especialmente un champú, un acondicionador, una loción de tratamiento, una crema o gel de peinado, una loción reestructurante para los cabellos, una máscara, etc. La composición cosmética según la invención se puede utilizar especialmente en tratamientos utilizando una aplicación que es seguida o no de un aclarado, o incluso como un champú. Por lo tanto, el ingrediente activo de la invención puede utilizarse ventajosamente en cuidados antipeliculares del cuero cabelludo.
- 35 **[0042]** También puede presentarse en forma de colorante o máscara para aplicar con un pincel o un peine, especialmente en las pestañas, las cejas o los cabellos.
- [0043]** Se entiende que el principio activo según la invención puede ser utilizado 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. Ventajosamente, las composiciones utilizables de acuerdo con la invención contienen además varios principios activos de protección o anti-envejecimiento, destinados particularmente para
- 45 la prevención /o tratamiento de trastornos relacionados con el envejecimiento.

[0044] Las composiciones de la invención pueden aplicarse por cualquier vía adecuada, incluyendo oral, parenteral o tópica externa, y su formulación será adaptada por el experto en la materia, especialmente para composiciones cosméticas o dermatológicas. Ventajosamente, las composiciones según la invención están destinadas a la administración por vía tópica cutánea. Estas composiciones deben 5 pues contener un medio fisiológicamente aceptable, es decir compatible con la piel y tegumentos, y cubren todas las formas cosméticas y dermatológicas. Estas composiciones pueden estar en forma de cremas, emulsiones aceite-en-agua o de agua-en-aceite o emulsiones múltiples, soluciones, suspensiones, geles, leches, 10 lociones, barras o incluso polvos, y adaptadas para aplicación a la piel, los labios y/o los tegumentos. Estas composiciones comprenden los excipientes necesarios para su formulación, tales como disolventes, espesantes, diluyentes, agentes tensioactivos, antioxidantes, colorantes, conservantes, fragancias.

[0045] De acuerdo con otra realización de la invención, las composiciones serán adecuadas para una administración oral para un uso farmacéutico. Por lo tanto, las composiciones podrán notablemente presentarse en forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas duras, masticables, polvos para ser consumidos como tales o a mezclar extemporáneamente con un líquido, jarabes, geles, y cualquier otra forma conocida por el experto en la materia. Contendrán excipientes de formulación adecuados, tales 20 como colorantes, edulcorantes, aromatizantes, cargas, aglutinantes, conservantes.

[0046] Estas composiciones pueden presentarse especialmente en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa; de una emulsión aceite-en-agua, agua-en-aceite o emulsiones múltiples; también pueden presentarse en forma de cremas, suspensiones o incluso polvos, adecuados para una aplicación a la piel, mucosas, 25 labios y/o tegumentos. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, loción, leche, suero, pomada, gel, pasta o una espuma. También pueden presentarse en forma sólida, tal como un palillo, o aplicarse a la piel en forma de aerosol. Pueden utilizarse como producto de cuidado y/o como producto de maquillaje de la piel.

[0047] Estas composiciones incluyen, además, cualquier aditivo utilizado habitualmente en el campo de la aplicación prevista así como los aditivos necesarios para su formulación como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olores, activos cosméticos o farmacéuticos, 30 aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc.

[0048] En todos los casos, el experto en la materia se asegurará de que estos aditivos así como sus proporciones se elijan de modo que no afecten las propiedades ventajosas de la composición según la invención. Estos adyuvantes pueden, por 40 ejemplo, corresponder a 0,01 a 20% del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de 5 a 80% en peso y preferiblemente de 5 a 50% en peso respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición serán seleccionados entre los utilizados clásicamente en el campo. Por ejemplo, se pueden 45 utilizar en una cantidad que va de 0,3 a 30% en peso, respecto al peso total de la composición.

[0049] La invención tiene por tercer objeto el uso en una composición cosmética de una cantidad eficaz del péptido de fórmula general (I) como principio activo activador de la HMG-CoA reductasa humana.

5 **[0050]** La cantidad eficaz de principio activo corresponde a la cantidad necesaria para lograr el resultado deseado, es decir, activar la HMG-CoA reductasa, a fin de mejorar la función de barrera de la epidermis y estimular la diferenciación epidérmica.

[0051] Se entiende por "reforzar la función de barrera cutánea y estimular la diferenciación epidérmica" la mejora de la capacidad de protección de la capa córnea y el aumento de la expresión de marcadores biológicos de diferenciaciones, tales
10 como las queratinas

[0052] Por lo tanto, dicho principio activo, gracias a sus propiedades especiales, se podrá utilizar en una composición cosmética destinada a reforzar la función barrera de la piel y a estimular la diferenciación epidérmica.

15 **[0053]** Por otra parte, el péptido de fórmula general (I) podrá usarse ventajosamente como principio activo en una composición cosmética destinada a luchar de forma preventiva y/o curativa contra los signos del envejecimiento cutáneo, y en particular el envejecimiento foto-inducido (foto-envejecimiento). Por manifestaciones cutáneas del envejecimiento se entienden todos los cambios en la apariencia externa de la piel y de los tegumentos debido al envejecimiento, por ejemplo, las rugosidades superficiales de
20 la capa córnea, las arrugas y las arrugas finas, pero también cualquier modificación interna de la piel que no siempre se refleja en un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis o cualquier otra degradación interna de la piel consecutiva a una exposición a la radiación ultravioleta (UV).

25 **[0054]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, el péptido de fórmula general (I) podrá usarse ventajosamente como principio activo en una composición cosmética para proteger la piel contra todo tipo de agresiones externas.

[0055] En particular, la invención tiene por objeto la utilización de una composición cosmética que comprende una cantidad eficaz de péptido de la invención para evitar o
30 tratar los daños causados a la piel por tratamientos mecánicos como el afeitado o la depilación.

[0056] En particular, la invención tiene por objeto el uso de una composición cosmética que comprende una cantidad eficaz de péptido de la invención para evitar o
35 tratar los daños causados a la piel por condiciones climáticas extremas o cambios grandes de temperatura y humedad.

[0057] La invención también consiste en el uso de péptido de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica destinada a evitar o tratar patologías caracterizadas por una alteración de la función barrera, como la piel
40 hipersensible, irritada, o reactiva y el eczema atópico. La invención también consiste en un método de tratamiento cosmético para evitar y/o luchar contra las agresiones externas, según el cual se aplica una composición que comprende una cantidad eficaz del péptido de la invención sobre las zonas a tratar. La invención también consiste en un método de tratamiento cosmético para evitar y/o luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y/o del foto-envejecimiento, según el cual se aplica una composición que comprende una cantidad eficaz del péptido de la invención en las
45 zonas a tratar.

[0058] Realizaciones particulares de este procedimiento de tratamiento cosmético también resultan de la descripción anterior. Otras características y ventajas de la

invención se harán más evidentes tras la lectura de los ejemplos dados a título ilustrativo y no restrictivo.

5 **Exemple 1: Estudio ultraestructural de cuerpos laminares en queratinocitos humanos tratados por el péptido SEC ID N° 5**

[0059] El propósito de este estudio es estudiar de manera ultraestructural, en microscopía electrónica de transmisión, queratinocitos tratados por el péptido SEC ID N° 5 a 0,05 ppm.

10

Protocolo :

[0060] Queratinocitos humanos normales en cultivo son tratados con una solución al 1% de una solución madre de 50 ppm del péptido SEC ID N° 5 durante 48 horas (el medio en presencia del activo se cambia cada 24 horas). Las células se lavan con PBS, y luego se fijan por la fijación hipertónica de Karnosky (4% paraformaldehído, 5% glutaraldehído en tampón 0,08 M fosfato) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego 24 horas a 4°C. Las células se separan del soporte mediante raspado, se centrifugan durante 5 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se elimina y un tampón de cacodilato de sodio 1 M se deposita en la base. Las células se mezclan con 2% de agar y después se fijan posteriormente con tetróxido de osmio 1 hora. Los especímenes son entonces deshidratados por pasos sucesivos en una serie de alcohol (50 a 100%). Las células se recubren después en una resina. La polimerización se lleva a cabo durante unas 12 horas a 60°C. Secciones semidelgadas de 0,5 mm se forman en el ultra-micrótopo. Las secciones se colocan en una lámina unida con calor y se tiñen con azul de toluidina. Las láminas se deshidratan a continuación de nuevo y se montan en un medio adecuado. Después de elegir el área óptima de estudio, el bloque se redimensiona al tamaño deseado y se realizan entonces capas ultrafinas, sólo las capas que tienen un color "gris plateado" y un tamaño adecuado se montan en la parrilla de microscopía electrónica doblemente marcada por el acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinan microscópicamente con transmisión a 60 o 80 KV.

[0061] Resultados: El estudio ultraestructural muestra que el aparato de Golgi está significativamente más desarrollado que en las células testigos. Este aumento está ligado a una sobreproducción de cuerpos laminares (o cuerpos de Odland), que es el signo de un aumento de la síntesis lipídica.

[0062] Conclusiones: El péptido SEC ID n° 5 a 0,5 ppm es capaz de inducir un aumento de la síntesis lipídica en los queratinocitos humanos normales.

40 **Exemple 2 : Estudio ultraestructural de las « caveolae » en fibroblastos humanos tratados por el péptido SEC ID n°4**

[0063] El propósito de este estudio es estudiar a nivel ultraestructural las caveolas en fibroblastos dérmicos humanos.

45 [0064] Protocolo: Fibroblastos dérmicos humanos normales en cultivo son tratados con una solución al 1% de una solución madre de 50 ppm del péptido SEC ID n° 4 durante 48 horas (el medio conteniendo el activo se cambia cada 24 hora).

[0065] Resultados: El estudio ultraestructural muestra un aumento significativo de las caveolas en las células tratadas por el péptido ID SEC nº 4, en comparación con las células testigos no tratadas. Estos resultados son indicativos de un efecto positivo del principio activo, ya que las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que permiten la externalización de moléculas tales como colesterol.

[0066] Conclusiones: El péptido SEC ID nº 4 a 0,5 ppm provoca el aumento de las estructuras de membrana de la externalización del colesterol.

Ejemplo 3 : Estudio de la diferenciación de los queratinocitos humanos tratados por el péptido SEC ID nº5

[0067] El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID nº5 sobre la diferenciación epidérmica.

[0068] Protocolo: Queratinocitos humanos normales en cultivo son tratados con una solución al 1% de una solución madre de 50 ppm del péptido SEC ID nº 4 durante 48 horas (el medio en presencia del activo se cambia cada 24 horas). Las células a continuación se lavan, se fijan con metanol frío durante 4 minutos a 4°C. Las células se incuban en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-cito panqueratinas a 1/200 durante 1 hora a temperatura ambiente y después se revelan por un segundo anticuerpo a 1/50 durante 1 hora a temperatura ambiente, acoplados a una etiqueta de fluorocromo "alexa 488". Después de montar en un medio *ad hoc*, las láminas se examinan al microscopio de epifluorescencia.

[0069] Resultados: El activo aumenta la expresión de panqueratinas en las células tratadas.

[0070] Conclusiones: El péptido SEC ID nº5, a 0,5 ppm aumenta la expresión de panqueratinas en los queratinocitos humanos normales. En la presencia del péptido SEC ID nº5, las células son estimuladas y en vía de diferenciación.

Ejemplo 4 : Estudio del efecto protector del péptido SEC ID nº5 sobre las células cutáneas sometidas a rayos ultravioletas (UVB)

[0071] El propósito de este estudio es determinar el efecto protector del péptido SEC ID Nº 5 frente a queratinocitos humanos normales sometidos a un estrés por radiación UVB. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular por la técnica de MTT.

[0072] Protocolo: Los queratinocitos humanos normales son tratados con una solución al 1% de una solución de 50 ppm de SEC ID nº 5 péptido, durante 24 horas, irradiados con UVB (50 mJ/cm²) y después se cultivan de nuevo 24 horas en presencia de la misma concentración de péptido SEC ID nº 5. Controles no tratados e irradiados se llevan a cabo en las mismas condiciones. Al final del experimento, las células se incuban en una solución que contiene 0,1 mg/ml de MTT (3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, bromuro de 5-difeniltetrazolio). Este compuesto es absorbido por las células vivas y se metaboliza después por las enzimas mitocondriales en un compuesto azul-violeta, formazán, que será dosificado por espectrofotometría a 540 nm. La densidad óptica (D.O.) es entonces directamente proporcional a la actividad enzimática mitocondrial así como al número de células vivas.

[0073] Resultados: La evaluación de la viabilidad celular mediante la técnica de MTT muestra que el péptido SEC ID nº 5, aumenta la viabilidad celular después de la irradiación UVB en 16%.

[0074] Conclusiones: El péptido de SEC ID nº5, en la concentración de 0,5 ppm, aumenta la viabilidad celular y protege eficazmente las células de la piel contra los efectos citotóxicos de la radiación UVB.

5 Ejemplo 5 : Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa en biopsias de piel, en presencia del péptido SEC ID nº5

[0075] El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID nº 5 sobre la expresión de la HMG-CoA reductasa.

10 **[0076] Protocolo:** Muestras de piel humana se cultivan en la interfase aire/líquido. Una solución al 1%, de una solución madre de 50 ppm de péptido SEC ID nº 5 se aplica tópicamente, después las muestras se incuban durante 24 horas o 48 horas.

15 **[0077]** Estas muestras de piel se fijan a continuación con formaldehído y luego se incluyen en parafina. A continuación, se realizan secciones de 2 a 3 mm. El inmunoetiquetado se lleva a cabo después de desenmascarar sitios específicos por tratamiento con microondas seguido de incubación en tripsina. El inmunomarcaje se realiza usando un anticuerpo policlonal de conejo específico de la HMG-CoA reductasa (Millipore, Upstate), seguido por un anticuerpo secundario acoplado a un marcador fluorescente. Las secciones de piel se examinan luego al microscopio con epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

20 **[0078] Resultados:** Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia más fuerte en las pieles tratadas por el péptido SEC ID nº 5, en las capas superiores de la epidermis, en comparación con el control sin tratar.

25 **[0079] Conclusiones:** El péptido SEC ID nº 5, a la concentración de 0,5 ppm, estimula la expresión de HMG-CoA reductasa en las capas superiores de la epidermis.

Ejemplo 6 : Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa en queratinocitos humanos normales, en presencia del péptido SEC ID nº4

30 **[0080]** El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID nº 4 sobre la expresión de HMG-CoA reductasa en los queratinocitos humanos normales.

35 **[0081] Protocolo:** Queratinocitos humanos normales en cultivo son tratados con una solución al 1% de una solución madre de 50 ppm del péptido SEC ID nº 4 durante 24 o 48 horas (se cambia el medio que contiene el activo cada 24 horas). Las células se lavan a continuación, se fijan con metanol frío durante 4 minutos a 4°C. Las células se incuban en presencia de un anticuerpo policlonal de conejo específico de la HMG-CoA reductasa (Millipore, Upstate), seguido de un anticuerpo secundario acoplado a un marcador fluorescente. Las células se examinan luego al microscopio con epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

40 **[0082] Resultados:** Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia citoplásmica más intensa en las células tratadas por el péptido SEC ID nº 4.

45 **[0083] Conclusiones:** El péptido SEC ID nº 4, en una concentración de 0,5 ppm, estimula la expresión de la HMG CoA reductasa en los queratinocitos humanos normales.

Ejemplo 7 : Preparación de composiciones

1 – Crema de protección solar:

[0084]

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Agua desmineralizada	Aqua (agua)	qsp
Pemulen TR1	Acrilatos/C10-30 Cropolímero alquilacrilato	0,40
Glicerina	Glycerin	3,00
Nipastat Sodio	Sodium Methylparaben (and) Sodium Ethylparaben (and) Sodium Butylparaben (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) Ceteareth-20 (and) Ceteareth-12 (and)Cetearyl Alcohol	5,00
Propilparabeno	Propylparaben	0,15
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
FASE C		
TEA	Triethanolamine	0,20
FASE D		
Péptido SEC ID n° 4		3 ppm
Perfume	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorante		qsp

5 **[0085]** Los constituyentes de la fase A y de la fase B se calientan por separado entre 70°C y 75°C. La fase B se emulsiona en la fase A con agitación. La fase C se añade, a 45°C, aumentando la agitación. La fase D se añade luego cuando la temperatura está por debajo de 40°C. El enfriamiento se prosigue hasta 25°C con agitación vigorosa.

10 2-Crema anti-edad:

[0086]

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
Cetiol SB 45	Butyrospernum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
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
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben	0,75

	(and) Isobutylparaben	
	FASE C	
Agua desmineralizada	Aqua (agua)	qsp
Butilenglicol	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°4		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)	qsp
Colorante		qsp

- 5 **[0087]** 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 unos 45°C, el carbómero se neutraliza por adición de la fase D. La fase E se añade a continuación con agitación suave y se realiza el enfriamiento hasta 25°C. La fase F se añade entonces si se desea.

3 –Crema protectora de día:

- 10 **[0088]**

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 Fluid/100cs	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
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,70
	FASE B	
Agua desmineralizada	Aqua (agua)	qsp 100
Glicerina	Glycerin	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,15
Keltrol BT	Xanthan Gum	0,30
	FASE C	
Hidróxido Sódico	Sodium Hydroxide	0,30

Glu Gly Lys Gly Lys Ser Val Val
 1 5

- <210> 3
- <211> 6
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- <400> 3

Asp Gly Lys Gly Lys Thr
 1 5

- 10 <210> 4
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 15 <220>
- <223> Péptido sintético
- <400> 4

Arg Gly Lys Ser
 1

- 20 <210> 5
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> AMIDACIÓN
- 30 <400> 5

Arg Gly Lys Ser
 1

- <210> 6
- <211> 4
- 35 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- <400> 6

Arg Gly Lys Thr
 1

- 40 <210> 7
- <211> 4
- <212> PRT
- 45 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (4)..(4)

<223> AMIDACIÓN

<400> 7

Arg G̃ly Lys Thr
1

10 <210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 8

Lys G̃ly Lys Ser
1

20 <210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> AMIDACIÓN

<400> 9

30

Lys G̃ly Lys Ser
1

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

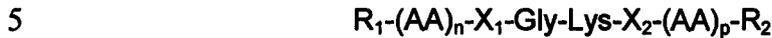
40 <222> (3)..(3)

<223> AMIDACIÓN

<400> 10

G̃ly Lys Ser
1

45

Reivindicaciones**1. Péptido derivado de la HMG-CoA reductasa humana, de fórmula general (I)**

En la que

X_1 es la lisina o la arginina o cualquier aminoácido,

X_2 es la serina o la treonina,

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 amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que se puede seleccionar de un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo,

15 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo protector que puede seleccionarse de una cadena alquilo de C_1 a C_{20} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY con Y representando una cadena alquilo de C_1 a C_4 .

caracterizado porque el péptido se selecciona entre las secuencias siguientes :

(SEC ID n°1) Glu-Gly-Lys-Gly-Lys-Ser-Val-Val-Cys-Glu

20 (SEC ID n°2) Glu-Gly-Lys-Gly-Lys-Ser-Val-Val

(SEC ID n°3) Asp-Gly-Lys-Gly-Lys-Thr

(SEC ID n°4) Arg-Gly-Lys-Ser

(SEC ID n°5) Arg-Gly-Lys-Ser-NH₂

(SEC ID n°6) Arg-Gly-Lys-Thr

25 (SEC ID n°7) Arg-Gly-Lys-Thr-NH₂

(SEC ID n°8) Lys-Gly-Lys-Ser

(SEC ID n°9) Lys-Gly-Lys-Ser-NH₂

(SEC ID n°10) Gly-Lys-Ser-NH₂

30 **2. Péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque** corresponde a una de las secuencias SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID n°6 o SEC ID n°7.

3. Péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque corresponde a la secuencia SEC ID n°4 o a la secuencia SEC ID n°5.

35 **4. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque** está solubilizado en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de esos disolventes.

40

5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza como un medicamento.

45 **6. Composición cosmética o farmacéutica caracterizada porque** comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como principio activo, utilizado solo o en asociación con al menos otro principio activo.

- 5
7. Composición cosmética o farmacéutica según la reivindicación 6, **caracterizada porque** dicho péptido está presente en una concentración comprendida entre 0,0005 y 500 ppm.
8. Composición cosmética o farmacéutica según la reivindicación 7, **caracterizada porque** dicho péptido está presente en una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm.
- 10
9. Composición cosmética o farmacéutica según una de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizada porque** está destinado a una administración por vía tópica.
10. Uso, en una composición cosmética según una de las reivindicaciones 6 a 9, de una cantidad eficaz del péptido, como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4,
- 15
10. Uso según la reivindicación 10 para obtener una composición cosmética destinada a reforzar la función barrera de la epidermis y a estimular la diferenciación epidérmica.
- 20
12. Uso según la reivindicación 10 para obtener una composición cosmética destinada a prevenir y a luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento.
- 25
13. Uso según la reivindicación 10 para obtener una composición cosmética destinada a proteger la piel de las agresiones externas.
- 30
14. Uso de una cantidad eficaz del péptido, tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 5, como principio activo, solo o en asociación con al menos otro ingrediente activo, para preparar una composición farmacéutica para prevenir o para tratar las patologías **caracterizadas por** una alteración de la función de barrera, tales como las pieles hipersensibles, irritadas o reactivas y el eczema atópico.
- 35
15. Procedimiento de tratamiento cosmético destinado a prevenir y/o a luchar contra las agresiones externas, **caracterizado porque** se aplica tópicamente sobre la piel a tratar una composición que comprende una cantidad eficaz del péptido, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40
16. Procedimiento de tratamiento cosmético destinado a prevenir y/o a luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento, **caracterizado porque** se aplica por vía tópica sobre la piel a tratar una composición que comprende una cantidad eficaz de péptido, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.