



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 537 346**

⑮ Int. Cl.:

C07K 5/08 (2006.01)
C07K 5/10 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/395 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
C07K 5/093 (2006.01)
C07K 5/103 (2006.01)
C07K 5/113 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10718242 (0)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2421884**

④ Título: **Hidrolizados peptídicos activadores del proteasoma y composiciones que los contienen**

⑩ Prioridad:

23.04.2009 FR 0901978

⑬ Titular/es:

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

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2015

⑭ Inventor/es:

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

⑮ Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 537 346 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

Hidrolizados peptídicos activadores del proteasoma y composiciones que los contienen.

[0001] La presente invención se refiere al campo de los activos anti-envejecimiento y de sus usos en cosmética, en particular. Más particularmente, la presente invención se refiere a un hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos, dicho hidrolizado siendo activador del proteasoma, así como su uso en cosmética dijo y/o farmacéutica para prevenir y/o corregir los efectos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento de la piel, y de los tegumentos, y proteger la piel contra las agresiones debidas a los rayos UV.

[0002] El envejecimiento es el conjunto de los procesos fisiológicos y psicológicos que alteran la estructura y las funciones del organismo a partir de una cierta edad. Se distinguen dos tipos de envejecimiento, por una parte el envejecimiento intrínseco y, por otra parte, el envejecimiento extrínseco. El envejecimiento intrínseco se debe a factores genéticos, a modificaciones bioquímicas que ocurren durante los estados de fatiga, de estrés, de cambios hormonales como durante el embarazo. El envejecimiento extrínseco, por su parte, se debe a factores ambientales a los que está sometido el organismo a lo largo de su vida, como la contaminación, el sol, las enfermedades, etc. Se trata de un proceso lento y gradual que afecta a todas las células del organismo por diferentes medios y se manifiesta de diferentes maneras. Por ejemplo, en cuanto a la piel, su aspecto está modificado por los diversos tipos de agresiones internas o externas, y se ven aparecer entonces líneas y arrugas, manchas de hiper o de hipopigmentación, una sequedad o deshidratación de la piel, un adelgazamiento de la epidermis, una elastosis, imperfecciones, manchas de vejez. Todos estos cambios afectan no sólo la piel, sino igualmente los tegumentos tales como las uñas y los cabellos. Estas modificaciones se deben, entre otras, a la alteración de las funciones de renovación celular, de cohesión celular, de síntesis de colágeno, de elastina y otras proteínas, y en última instancia conducen a una disminución de las cualidades de la barrera protectora de la piel y a un aspecto poco estético de ésta. Pero uno de los procesos principales responsables del envejecimiento de las células es sin duda la acumulación de proteínas dañadas en ellas. De hecho, las proteínas son el objetivo de diversas modificaciones post-traduccionales anormales tales como la oxidación, la glicación, la conjugación con productos de la peroxidación de lípidos, fenómenos cuya incidencia aumenta fuertemente con la edad.

[0003] Se sabe que los radicales libres juegan un papel clave en el proceso de envejecimiento y en particular en la formación de proteínas oxidadas, dañadas (Harman et al "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry" J. Gerontol., 11, 298-300). La acumulación de proteínas dañadas, por tanto, plantea el problema de la eficacia de los sistemas proteolíticos responsables de la eliminación de estas proteínas, y en particular la del sistema proteasomal implicado no sólo en la eliminación de las proteínas alteradas, en particular por oxidación, sino también en la continua renovación de las proteínas intracelulares.

[0004] La vía de la ubiquitina-proteasoma juega un papel esencial en un gran número de procesos biológicos. De hecho, los mecanismos de degradación de las proteínas por el proteasoma están involucrados en mecanismos celulares importantes tales como la reparación del ADN, el control de la expresión de los genes, la regulación de la progresión del ciclo celular, el control de la calidad de las proteínas neo-sintetizadas, la apoptosis o la respuesta inmunitaria (Glickman y Ciechanover, 2002).

[0005] El proteasoma presente en las células humanas es un complejo multi-proteico de muy gran tamaño presente en el citoplasma y el núcleo. Las formas purificadas del proteasoma comprenden 2 grandes subunidades; por una parte, un corazón proteolítico llamado proteasoma 20S y, por otra, un complejo regulador 19S que se une a cada uno de los dos extremos del proteasoma 20S (Coux et al., 1996; Glickman y Coux, 2001). El proteasoma 20S es una partícula en forma de cilindro hueco, compuesto por 28 subunidades alfa y beta, distribuidas en 4 anillos heptaméricos. Las actividades de peptidasa están presentes en la superficie interna del cilindro y se influyen de manera alostérica. Tres actividades proteolíticas ("tripsina, quimotripsina y tipo caspasa") se han asociado al proteasoma 20S y concurren en la destrucción de las proteínas en péptidos inactivos de 3 a 20 aminoácidos. Además del proteasoma 20S, el proteasoma 26S comprende el complejo regulador 19S de 0,7 MDa que consta de aproximadamente 20 subunidades. Estudios recientes de inmunopurificación han demostrado que otras proteínas podrían estar asociadas al proteasoma 20S y 19S (por ejemplo el complejo regulador 11S).

[0006] Trabajos llevados a cabo en estos últimos años han permitido correlacionar el envejecimiento con la actividad del proteasoma. En efecto, mientras que con la edad hay un aumento de la acumulación de las proteínas oxidadas, se ha constatado una disminución en la eficacia del sistema proteasomal (Petropoulos et al., J. Gerontol. A. Biol. Sci., 2000, 55A: B220-7). Esta disminución de la eficacia del sistema proteasomal era, de hecho, debida a una disminución en la cantidad de proteasoma. Estos resultados han sido confirmados por los de un estudio sobre la cantidad y la actividad del proteasoma en células de individuos centenarios frente individuos jóvenes (Chondrogianni y otros, Exp Gerontol 2000; 35: 721-8.). Estos estudios, así como muchos otros, demuestran claramente la relación entre envejecimiento y actividad del proteasoma y se puede pensar que la inducción de la expresión del proteasoma en las células de la piel o de los tegumentos podría tener una influencia positiva sobre el envejecimiento, o retrasarlo.

- 5 [0007] Con el fin de prevenir o retrasar el envejecimiento, se han propuesto composiciones cosméticas a base de extractos naturales, por ejemplo, la patente FR 2822701 divulga una composición basada en un extracto de alga *Phaeodactylum* para favorecer la actividad del proteasoma. También, la solicitud de patente FR 2898808 describe el uso de una composición que comprende un extracto de microalga y ferrulato de arginina, siempre para activar el proteasoma. Otras composiciones para ello comprenden compuestos químicos capaces de modular la actividad del proteasoma para tener un efecto anti-envejecimiento. Estas composiciones se describen en las solicitudes de patente WO 2006/105811 o WO 2005/061530. Sin embargo, los compuestos de tipo peptídico propuestos presentan un tamaño importante y es difícil en el campo de la cosmética utilizarlos como tales. Existe entonces una necesidad, especialmente en la industria cosmética, de nuevas composiciones de extractos naturales con principios activos de tamaño reducido, y eficaces para su uso como un activador del proteasoma con un efecto anti-envejecimiento.
- 10 [0008] Es así que la Solicitante ha descubierto que un hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos fue capaz de activar el proteasoma y por lo tanto podría ser útil en la prevención y/o tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento y fotoenvejecimiento, así como las agresiones debidas a los rayos UV.
- 15 [0009] Por consiguiente, la presente invención tiene por primer objeto un hidrolizado peptídico activador del proteasoma, resultante de la hidrólisis de levaduras del género *Saccharomyces*, y más especialmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, o de guisantes (*Pisum sativum*) y se enriquece en péptidos bioactivos de peso molecular inferior a 6 kDa, teniendo de 3 a 5 aminoácidos, cada péptido bioactivo comprendiendo al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.
- 20 [0010] La presente invención tiene por segundo objeto una composición cosmética que comprende como principio activo dicho hidrolizado peptídico enriquecido.
- 25 [0011] Además, la presente invención tiene por tercer objeto la utilización de una composición cosmética que comprende dicho hidrolizado peptídico enriquecido para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y del foto-envejecimiento y mejorar la degradación por el proteasoma de las proteínas dañadas.
- 30 [0012] Finalmente, la presente invención tiene por cuarto objeto un método de tratamiento cosmético de la piel o de los tegumentos a tratar con ayuda de la composición que comprende dicho hidrolizado peptídico enriquecido.
- 35 La figura 1 muestra un ejemplo de cromatograma obtenido por CLHP, con evidencia del pico correspondiente al péptido bioactivo en un hidrolizado de maíz.
- 40 La figura 2 muestra un ejemplo de cromatograma obtenido por CLHP, con evidencia del pico correspondiente al péptido bioactivo en un hidrolizado de guisante.
- 45 La figura 3 muestra un ejemplo de cromatograma obtenido por CLHP, con evidencia del pico correspondiente al péptido bioactivo en un hidrolizado de arroz.
- 50 La figura 4 representa un ejemplo de cromatograma obtenido por CLHP, con evidencia del pico correspondiente al péptido bioactivo en un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae*.
- [0013] La solicitud de patente WO 2008/015343 describe hidrolizados de levaduras para aumentar la síntesis de melanina en los melanocitos.
- [0014] La presente invención tiene por primer objeto un hidrolizado peptídico activador del proteasoma, resultante de la hidrólisis de levaduras del género *Saccharomyces*, y más particularmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, o guisantes (*Pisum sativum*) y está enriquecido en péptidos bioactivos de peso molecular inferior a 6 kDa, teniendo de 3 a 5 aminoácidos, cada péptido bioactivo comprendiendo al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.
- [0015] El término "hidrolizado peptídico", una mezcla de compuestos representados mayoritariamente por péptidos u oligopeptídos.
- [0016] Por "péptidos bioactivos" se entiende un fragmento de proteína compuesto por el encadenamiento de al menos tres aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos modificados o no y que presentan una actividad como activador del proteasoma. Presentes en una forma inactiva en las proteínas, se hacen activos después de la hidrólisis de estas últimas.
- [0017] Dicho hidrolizado peptídico enriquecido según la invención se caracteriza porque es activador del proteasoma.
- [0018] Se entiende por hidrolizado peptídico (y/o péptidos bioactivos) "activador del proteasoma", todo hidrolizado peptídico, o péptido o derivado biológicamente activo capaz de aumentar la actividad del proteasoma, ya sea mediante el aumento de la síntesis proteica de las subunidades del proteasoma (por modulación directa o indirecta

de la expresión génica), o por otros procesos biológicos tales como la estabilización de las subunidades que constituyen el proteasoma o la estabilización de los transcritos de ARN mensajero.

5 [0019] El hidrolizado peptídico enriquecido de la invención se caracteriza porque permite activar la degradación por el proteasoma de las proteínas dañadas. Por "proteínas dañadas" se entiende proteínas que han sufrido reacciones de oxidación debidas a las especies reactivas del oxígeno (radicales libres), proteínas glicosiladas o conjugadas con productos de la peroxidación de lípidos etc.

[0020] Preferiblemente, el hidrolizado peptídico está enriquecido en péptidos bioactivos de fórmula general (I):



En la que,

10 X_1 es una asparagina, una lisina, un aspartato, una valina, una arginina, o está ausente

X_2 es una histidina, una lisina, una arginina, o está ausente

[0021] Preferiblemente, el hidrolizado peptídico es rico en péptidos bioactivos de la siguiente fórmula:

(SEC ID n°1) Arg - Asp -Cys -Arg - Arg

(SEC ID n°2) Asn - Asp -Cys -Arg - Lys

15 (SEC ID n°3) Asp -Cys -Arg - His

(SEC ID n°4) Val - Asp -Cys -Arg

(SEC ID n°5) Asp -Cys -Arg

[0022] De hecho, estos péptidos han sido identificados como particularmente activos como activadores del proteasoma y por lo tanto presentan particular interés como agente anti-envejecimiento.

20 [0023] El hidrolizado peptídico enriquecido de la invención se deriva de la hidrólisis de las levaduras del género *Saccharomyces*, y preferentemente de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, o guisantes (*Pisum sativum*).

25 [0024] La invención puede también llevarse a cabo utilizando una de las numerosas plantas de la familia de los guisantes (Fabáceas). Se utilizará, por ejemplo, las plantas de la especie de los guisantes *Pisum sativum L.* El término guisante también se refiere a la semilla, por sí misma rica en proteínas (25%).

[0025] El hidrolizado peptídico enriquecido se puede obtener de diversas fuentes de proteínas, ya sean de origen animal o vegetal. Según otra forma de realización, el hidrolizado peptídico enriquecido se deriva de hidrólisis de plantas seleccionadas entre el maíz (*Zea Mayz L.*) o el arroz (*Oryza sativa L.*). Preferiblemente, las plantas utilizadas no se someten a una fermentación previa.

30 [0026] Por lo tanto, se puede utilizar las semillas de muchas plantas del género *Zea* y preferiblemente la especie *Zea mays L.* El material vegetal usado será el grano y preferentemente el grano despojado de su envoltura por una etapa de descascarado.

35 [0027] Las plantas de la familia del arroz (Poáceas), especialmente los del género *Oryza* y más preferiblemente la especie *Oryza sativa L.* se pueden utilizar para realizar el hidrolizado. - El material vegetal usado será el grano preferentemente despojado de su envoltura por una etapa de descascarado.

[0028] Cualquier método de extracción o purificación conocido en la técnica se puede utilizar para preparar el hidrolizado de la invención.

40 [0029] En una primera etapa, las semillas, o una parte específica de la planta (hojas, tubérculos, raíces, etc.) se trituran utilizando un triturador de plantas. El polvo así obtenido puede ser posteriormente "desgrasado" utilizando un disolvente orgánico convencional (tal como un alcohol, hexano o acetona).

[0030] En el caso de levaduras, en una primera etapa, se cultivan de manera clásica en un medio adecuado para su desarrollo, preferiblemente en presencia de lactosa. Se recogen por centrifugación y luego se ponen en suspensión en una solución tampón, preferentemente un tampón fosfato. En una segunda etapa, estas células se rompen usando una prensa de French o por medio de un molino de bolas, descartándose la mayoría de los componentes membranarios insolubles por centrifugación o filtración.

- 5 [0031] Esto es seguido por la extracción de las proteínas de acuerdo con el método convencional (Osborne, 1924) modificado; el triturado de la planta o el lisado de las levaduras se pone en suspensión en una solución alcalina que contiene un producto adsorbente del tipo polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble (0,01 -20%); de hecho, se ha observado que las operaciones de hidrólisis y de purificaciones posteriores fueron facilitadas por este medio. En particular, la concentración en sustancias tipo fenólico que interactúan con las proteínas, se reduce significativamente.
- 10 [0032] La fracción soluble, que contiene las proteínas, los carbohidratos y eventualmente lípidos, se recoge después de las etapas de centrifugación y filtración. Esta solución en bruto se hidroliza a continuación en condiciones moderadas para generar péptidos solubles. La hidrólisis se define como una reacción química que implica la escisión de una molécula por agua, esta reacción pudiendo hacerse en medio neutro, ácido o básico. Según la invención, la hidrólisis se lleva a cabo químicamente y/o de forma ventajosa por enzimas proteolíticas. Se puede entonces citar la utilización de endoproteasas de origen vegetal (papaína, bromelina, ficina) y microorganismos (Aspergillus, Rhizopus, Bacillus, etc.). Las condiciones de hidrólisis se eligen para favorecer el enriquecimiento en péptidos bioactivos.
- 15 [0033] Por las mismas razones que antes, es decir, la eliminación de las sustancias polifenólicas, se añade una cantidad de polivinilpolipirrolidona al medio de reacción durante esta etapa de hidrólisis controlada. Después de la filtración para eliminar las enzimas y los polímeros, se obtiene un primer filtrado.
- 20 [0034] El hidrolizado obtenido en esta etapa puede purificarse adicionalmente con el fin de seleccionar las fracciones de bajos pesos moleculares, preferiblemente inferiores a 6 kDa, así como los péptidos generados según su naturaleza. La purificación se lleva a cabo ventajosamente en etapas de ultrafiltraciones sucesivas a través de filtros de porosidad decreciente, conservando los filtrados en cada etapa y/o por un método de tipo cromatográfico, con el fin de enriquecer específicamente el hidrolizado en péptidos bioactivos.
- 25 [0035] Se procede a una fase de dilución en agua o en cualquier mezcla que contenga agua, a continuación, esterilización por ultrafiltración para obtener un hidrolizado peptídico enriquecido caracterizado por un contenido en proteínas de 0,5 a 5,5 g/l. Este hidrolizado peptídico enriquecido corresponde a la forma más purificada del principio activo de la invención.
- 30 [0036] El hidrolizado peptídico obtenido de acuerdo con la invención se analiza cualitativamente y cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alta presión (CLHP), que permite analizar las proteínas con pesos moleculares de 0,2 a 25 kDa (según un gradiente de disolventes apropiado). Las diferentes fracciones peptídicas que han podido ser aisladas se analizan entonces en cuanto a su eficacia biológica. Estas diversas fracciones se analizan entonces por espectrometría de masas para identificar específicamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. También se ha llevado a cabo un análisis por secuenciación, para determinar la secuencia peptídica de los péptidos bioactivos.
- 35 [0037] Finalmente, el hidrolizado peptídico enriquecido obtenido está compuesto de péptidos de peso molecular inferior a 6 kDa, y está enriquecido en péptidos bioactivos de 3 a 5 aminoácidos que comprenden al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.
- 40 [0038] Este hidrolizado peptídico de acuerdo con la invención, enriquecido en péptidos bioactivos puede además usarse como medicamento.
- 45 [0039] El segundo objeto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende como principio activo el hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos tales como los descritos anteriormente.
- [0040] Preferiblemente, las composiciones según la invención se presentan en una forma adecuada para aplicación tópica comprendiendo un medio cosméticamente aceptable. Por "cosméticamente aceptable" se entiende medios que convienen a un uso en contacto con la piel o los tegumentos humanos, sin riesgo de toxicidad, de incompatibilidad, de inestabilidad, de respuesta alérgica, y otros. Preferiblemente, dicho hidrolizado peptídico está presente en la composición en una cantidad que representa de 0,0001% a 20% del peso total de la composición, y preferentemente en una cantidad que representa de 0,05% a 5% del peso total de la composición.
- 50 [0041] En las composiciones según la invención, el hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos está solubilizado en uno o varios disolventes como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de estos disolventes.
- [0042] Según otra forma de realización ventajosa, el hidrolizado peptídico según la invención está solubilizado en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o adsorbido sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como talcos y bentonitas, y más generalmente solubilizado en, o fijado sobre, cualquier vehículo fisiológicamente aceptable.

5 [0043] Las composiciones para aplicación a la piel pueden presentarse en forma de solución acuosa o hidroalcohólica, emulsión de agua en aceite o de aceite en agua, microemulsión, gel acuoso o anhídrico, suero, o dispersión de vesículas, parche, crema, aerosol, pomada, ungüento, loción, coloide, solución, suspensión u otras. Las composiciones también se pueden aplicar sobre los tegumentos en forma de champú, tinte o máscara para aplicar con cepillo o peine, especialmente en las pestañas, las cejas o los cabellos, o cuidado de las uñas, tales como barnices .

10 [0044] En una realización particular, la composición según la invención contiene además al menos otro principio activo que favorece la acción de dicho hidrolizado peptídico enriquecido. Se puede citar, sin limitación, las clases de ingredientes siguientes: agentes activos peptídicos, otros extractos de vegetales, agentes cicatrizantes, anti-envejecimiento, anti-arrugas, calmantes, anti-radicales, anti-UV, agentes estimuladores de la síntesis de macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético, agentes hidratantes, anti-bacterianos, anti-fúngicos, anti-inflamatorios, anestésicos, agentes que modulan la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, agentes que estimulan el crecimiento de las uñas o el pelo. Preferiblemente, se utilizará un agente con actividad en el campo de las anti-arrugas, como un agente anti-radicales o antioxidante, o un agente estimulante de la síntesis de macromoléculas dérmicas, o un agente estimulante del metabolismo energético. Más en particular, el principio activo se elige entre las vitaminas, los fitosteroles, los flavonoides, la DHEA y/o uno de sus precursores o uno de sus derivados químicos o biológicos, un inhibidor de metaloproteinasa, o un retinóide. Además, aditivos tales como agentes espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, antioxidantes, agentes formadores de película, quelantes, secuestrantes, acondicionadores . se pueden añadir a la composición.

15 [0045] En todos los casos, el experto en la materia se asegurará de que estos adyuvantes y sus proporciones se elijan de manera que no perjudiquen las propiedades ventajosas investigadas de la composición según la invención. Estos adyuvantes pueden, por ejemplo, estar comprendidos entre 0,01 y 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 clásicamente utilizados en el campo considerado. Por ejemplo, se pueden utilizar en una proporción que va de 0,3 a 30% en peso, con respecto al peso total de la composición.

20 [0046] Finalmente, la invención se refiere a una composición que comprende dicho hidrolizado peptídico para aumentar la actividad del proteasoma y mejorar la degradación por el proteasoma de las proteínas dañadas.

25 [0047] Un tercer objeto de la invención se refiere al uso de una composición cosmética que comprende dicho hidrolizado peptídico enriquecido y un medio cosméticamente aceptable, para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento.

30 [0048] Los "signos cutáneos del envejecimiento " incluyen, pero no se limitan a, todas las manifestaciones visibles en la piel causadas por el envejecimiento. Se entiende en particular las arrugas, arrugas profundas y gruesas, las líneas finas, las grietas, la flacidez de los tejidos cutáneos y subcutáneos, la pérdida de elasticidad cutánea y la atonía, la pérdida de firmeza y tonicidad, y la atrofia dérmica. Además, se entiende también por "signos cutáneos del envejecimiento", los poros ampliados, las imperfecciones, la decoloración, las manchas de la edad, las queratosis, la pérdida de colágeno y otros cambios de la dermis y la epidermis, pero también cualquier cambio en la apariencia externa de la piel y los tegumentos debido al envejecimiento como, por ejemplo, las rugosidades superficiales de la capa córnea, pero igualmente cualquier modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente en un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis. El término "fotoenvejecimiento" significa el envejecimiento prematuro de la piel causado por la exposición prolongada y acumulativa al sol.

35 [0049] La presente invención se refiere pues al uso de una composición para tratar o prevenir las arrugas, las arrugas profundas y gruesas, las líneas finas, las grietas, la flacidez de los tejidos cutáneos y subcutáneos, la pérdida de elasticidad cutánea y la atonía, la pérdida de firmeza y de tonicidad, y la atrofia dérmica.

40 [0050] Otro objeto de la invención se refiere al uso de una composición según la invención para proteger la piel contra las agresiones debidas a la radiación UV.

45 [0051] Finalmente, la invención se refiere al uso de una composición que comprende el hidrolizado peptídico para aumentar la actividad del proteasoma y mejorar la degradación por el proteasoma de las proteínas dañadas.

50 [0052] Un último objeto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento cosmético que consiste en aplicar tópicamente sobre la piel o los tegumentos a tratar, una composición que comprende una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico enriquecido de la invención para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento. Además, este método de tratamiento cosmético puede ser aplicado antes de acostarse con el fin de limpiar las células y la piel durante el ciclo de renovación celular. En efecto, durante la noche, la piel privilegia las funciones de renovación así como los procesos metabólicos de síntesis. Por lo tanto, la aplicación de la composición tal como se reivindica, respetando el ritmo biológico de la piel permite obtener un efecto rejuvenecedor, estimulante de la renovación celular y regenerante.

[0053] Los siguientes ejemplos describen y demuestran la eficacia de los compuestos peptídicos tales como los descritos según la invención, pero no deben interpretarse como una limitación de la presente invención.

Ejemplo 1 Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de harinas de maíz (*Zea mays L.*)

[0054] La harina de maíz (*Zea mays L.*) se disuelve en 10 volúmenes de agua en presencia de 2% de POLYCLAR ® 10 (polivinilpolipirrolidona - PVPP - insoluble). La mezcla se ajusta a un pH entre 6 y 8 con una solución acuosa de sodio 1 M. Despues del ajuste del pH, se añade papaína al 2% en el medio de reacción. La hidrólisis se obtiene despues de agitar durante 2 horas a 55°C. Se procede despues a la inactivación de la enzima por calentamiento de la solución a 80°C durante 2 horas. Despues de centrifugar, se recupera la solución acuosa sobrenadante correspondiente a un hidrolizado bruto de maíz. Se seleccionan condiciones específicas de hidrólisis de manera que permitan un enriquecimiento en péptidos bioactivos de 3 a 5 aminoácidos que comprende al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.

[0055] El procedimiento de purificación del hidrolizado bruto comienza por filtraciones sucesivas utilizando filtros de placas Seitz Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 mm) para obtener una solución amarilla, brillante y clara, que se califica como hidrolizado 1.

[0056] En esta etapa, el hidrolizado 1 de maíz 1 se caracteriza por un extracto seco titrante de 20 a 30 g/kg, un contenido de proteínas de 20 a 25 g/l y una tasa de azúcares de 2 a 5 g/l.

[0057] La naturaleza proteica del hidrolizado 1 se evidencia despues de análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico de maíz se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes en un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS.

[0058] La migración de las proteínas se lleva a cabo en tampón de migración NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador de peso molecular. La coloración de las proteínas se realiza utilizando Azul de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observa proteínas de peso molecular inferior a 6 kDa.

[0059] El hidrolizado 1 se purifica a continuación eliminando las proteínas de alto peso molecular por ultrafiltración utilizando la cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa con el fin de conservar sólo los compuestos de naturaleza peptídica inferiores a 5 kDa.

[0060] Despues de esta purificación final, se procede a una fase de dilución para obtener un hidrolizado peptídico caracterizado por un contenido de proteína comprendido entre 3,5 y 5,5 g/l. Este hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos corresponde al principio activo de la invención.

[0061] Este hidrolizado peptídico se analiza luego por cromatografía líquida de alta presión (CLHP) usando un aparato HP1100 controlado por el software ChemStation. La columna utilizada durante la elución del hidrolizado es una Nucleosil®300-5 C4 MPN (125 x 4 min), que permite cromatografiar proteínas con pesos moleculares de 0,2 a 25 kDa en las siguientes condiciones:

- Gradiente Metanol
- Columna Uptisphere OPB 125 x 3 mm
- Disolvente A: agua de calidad HPLC que contiene 0,1% de ácido heptafluorobutírico (HFBA)
- Disolvente B: grado metanol HPLC que contiene 0,1% de ácido heptafluorobutírico (HFBA)
- Gradiente: 100% a 15% de disolvente A en 35 min

[0062] Un ejemplo de cromatograma obtenido por CLHP (cromatografía en fase líquida a alta presión), evidenciando el pico correspondiente a los péptidos bioactivos se da en la Figura 1.

[0063] Estas diversas fracciones se analizan entonces por espectrometría de masas para identificar específicamente el contenido en aminoácidos de los péptidos de cada pico. También se llevó a cabo un análisis por secuenciación, para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.

Ejemplo 2 : Preparación de un hidrolizado de péptidos enriquecidos en péptidos bioactivos a partir de guisante (*Pisum sativum L.*)

[0064] El hidrolizado peptídico se obtiene a partir de un extracto de plantas de la especie *Pisum sativum L.*. Por supuesto, el extracto se puede preparar a partir de plantas de al menos una cualquiera de las muchas variedades y especies del género *Pisum*.

[0065] En una primera etapa, 1 kg de guisantes sin cáscara se deslipidan por la acción de un disolvente orgánico: el hexano.

[0065] La harina de guisante así obtenida se disuelve en 10 volúmenes de agua en presencia de 2% de POLYCLAR® 10 (polivinilpolipirrolidona - PVPP - insoluble). La mezcla se ajusta a un pH entre 6 y 7 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1M

5 [0066] Despues de ajustar el pH, se añadió 2% flavourzym® en el medio de reacción. La hidrólisis se obtiene despues de agitar durante 2 horas a 50°C. Se procede a la inactivación de la enzima por calentamiento de la solución a 80°C durante 2 horas. La mezcla de reacción obtenida de este modo es el extracto de guisante. Se seleccionan condiciones específicas de hidrólisis para permitir un enriquecimiento en péptidos bioactivos a partir de 3 a 5 aminoácidos que comprende al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.

10 [0067] El proceso de purificación se inicia con filtraciones sucesivas utilizando placas de filtro Seitz Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 mm) para obtener una solución brillante y limpida. En esta etapa, el hidrolizado de guisante se caracteriza por una clasificación en seco de 70-80 g/kg, un contenido de proteína de 55-65 g/l, un contenido de azúcares de 2-5 g/l y una tasa de polifenol de 1-3 g/l.

15 [0068] La naturaleza proteica de este hidrolizado se evidencia por electroforesis en gel de poliacrilamida. Para este análisis, se utilizan los geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado peptídico de guisante se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes en un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. La migración de las proteínas se lleva a cabo utilizando el tampón NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador de peso molecular. La coloración de las proteínas se realizó utilizando Azul de Coomassie R-250. En estas condiciones, se observa 2 grandes familias de proteínas: la primera familia corresponde a proteínas de peso molecular de 20 a 25 kDa y la última familia a proteínas de pesos moleculares inferiores a 5 kDa.

20 [0069] Esta solución se purifica luego eliminando las proteínas de pesos moleculares superiores a 5 kDa utilizando una filtración de flujo tangencial. Para ello, el hidrolizado de guisante se bombea bajo presión a través de un soporte Pellicon® equipado con casete Pellicon® 2 Biomax 30 kDa. Este primer filtrado se recupera para ser posteriormente filtrado a través de otro casete Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Al final de la purificación, se obtiene un hidrolizado peptídico de guisante amarillo-beige, brillante y limpido. Se caracteriza por un secade 50 a 55 g/kg, un contenido de proteínas de 50 a 52 g/l.

25 [0070] Esta solución se analiza luego en cromatografía líquida a alta presión usando un aparato HP1100 controlado por el software ChemStation. La columna utilizada durante la elución del extracto de guisante es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 min). Esta columna permite cromatografiar proteínas que tienen pesos moleculares de 0,2 a 25 kDa (de acuerdo con un gradiente de disolventes apropiado, idéntico al Ejemplo 1). Bajo estas condiciones cromatográficas, varias fracciones de péptidos han podido ser aislados.

30 [0071] Estas diversas fracciones se analizan entonces por espectrometría de masas para identificar el contenido en aminoácidos de los péptidos de cada pico. También se llevó a cabo un análisis por secuenciación, para determinar la secuencia peptídica de los péptidos bioactivos. Un ejemplo de chromatograma obtenido por CLHP (cromatografía en fase líquida a alta presión), con evidencia del pico correspondiente a los péptidos bioactivos se da en la Figura 2.

35 [0072] También se realiza la determinación de la composición en aminoácidos del principio activo de la invención. Esta se realiza después de la hidrólisis ácida y la identificación por cromatografía líquida a alta presión usando una pre-derivación al PICT (fenilisotiocianato).

40 **Ejemplo 3 Preparación de un hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos a partir de levaduras *Saccharomyces cerevisiae***

45 [0073] El hidrolizado peptídico puede obtenerse a partir de un extracto de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras se cultivan en un medio adecuado para su desarrollo, preferiblemente en presencia de lactosa, luego se centrifugan para recuperar una biomasa. La biomasa de *Saccharomyces* se disuelve en 10 volúmenes de agua en presencia de 2% de POLYCLAR® 10 (polivinilpirrolidona - insoluble) y 0,2% de carbón activo. La mezcla se ajusta a un pH entre 6 y 7,5 con una solución acuosa de sodio 1M

50 [0074] Despues de ajustar el pH, se añade 2% de papaína en el medio de reacción. La hidrólisis se obtiene despues de agitar durante 2 horas a 55°C. Se procede a la inactivación de la enzima por calentamiento de la solución a 80°C durante 2 horas. Despues de centrifugación, se obtiene entonces la mezcla de reacción correspondiente al extracto de *Saccharomyces*. Se seleccionan condiciones específicas de hidrólisis de manera que permitan un enriquecimiento en péptidos bioactivos a partir de 3 a 5 aminoácidos comprendiendo al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.

[0075] El proceso de purificación se inicia con filtraciones sucesivas utilizando placas de filtro Seitz Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 mm) para obtener una solución brillante y limpida. En esta etapa, el extracto de

Saccharomyces se caracteriza por un seco de 25 a 35 g/kg, un contenido de proteínas de 10 a 15 g/l y un contenido de azúcares de 5-10 g/l.

[0076] La naturaleza proteica de este extracto se evidencia por electroforesis en gel de poliacrilamida. Para este análisis, se utilizan los geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado peptídico se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes en un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS.. Una solución de NuPAGE® antioxidante se añade al recipiente interior (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se re-oxiden durante la electroforesis. La migración de las proteínas se lleva a cabo utilizando tampón NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador de peso molecular. La coloración de las proteínas se realiza utilizando Azul de Coomassie R-250. En estas condiciones, se observan tres grandes familias de proteínas: la primera familia corresponde a proteínas de peso molecular superior a 75 kDa, la segunda familia a proteínas de 20 al 25 kDa y la última familia a proteínas de peso molecular inferior a 5 kDa.

[0077] Esta solución se purifica luego eliminando las proteínas de peso molecular mayor de 5 kDa usando filtración de flujo tangencial. Para ello, el hidrolizado peptídico de Saccharomyces se bombea bajo presión a través de un soporte Pellicon® equipado con casete Pellicon® 2 Biomax 50 kDa. Este primer filtrado se recupera y se filtra a continuación a través de un segundo casete de Pellicon® 2 Biomax 10 kDa. Entonces se recupera un segundo filtrado que todavía se eluye a través de una última casete Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Al final de la purificación se obtiene un extracto vegetal de Saccharomyces beige, brillante y límpido. Se caracteriza por un seco de 35 a 45 g/kg, un contenido de proteínas de 30 a 40 g/l.

[0078] Esta solución se analiza luego en cromatografía líquida a alta presión usando un aparato HP1100 controlado por el software ChemStation. La columna utilizada durante la elución del hidrolizado de Saccharomyces es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 min). Esta columna permite chromatografiar proteínas que tienen pesos moleculares de 0,2 a 25 kDa (de acuerdo con un gradiente de disolventes apropiado, idéntico al Ejemplo 1). Bajo estas condiciones chromatográficas, varias fracciones de péptidos han podido ser aislados.

[0079] Estas diversas fracciones se analizan entonces por espectrometría de masas para identificar específicamente el contenido en aminoácidos de los péptidos de cada pico. También se llevó a cabo un análisis por secuenciación, para determinar la secuencia peptídica de los péptidos bioactivos. Un ejemplo de chromatograma obtenido por CLHP (chromatografía en fase líquida a alta presión), con evidencia del pico correspondiente a los péptidos bioactivos se da en la Figura 4.

[0080] También se realizó la determinación de la composición en aminoácidos del ingrediente activo de la invención. Esta se ha realizado después de la hidrólisis ácida y la identificación por cromatografía líquida de alta presión usando una pre-derivación al PICT (fenilisotiocianato).

Ejemplo 4: Demostración del efecto activador del hidrolizado peptídico de maíz según el Ejemplo 1, sobre la actividad enzimática del proteasoma 20S sobre queratinocitos envejecidos mantenidos en cultivo

[0081] Queratinocitos envejecidos experimentalmente mantenidos en cultivo durante 15 días, son tratados con 1% de nuestro hidrolizado peptídico derivado del maíz realizado según el Ejemplo 1. Se estudian entonces las actividades enzimáticas del proteasoma 20S. De hecho, el proteasoma 20S es la subunidad responsable de la hidrólisis enzimática. Tres actividades enzimáticas pueden ser estudiadas: la actividad tipo tripsina, tipo quimotripsina e hidrolasa peptidilglutamil-péptido (PGPH). Nos proponemos estudiar estas actividades por una dosificación enzimática específica de cada actividad.

Protocolo

[0082] Los queratinocitos envejecidos se mantienen en cultivo durante 15 días. El tratamiento de las células se efectúa mediante la adición de una solución al 1% de nuestro hidrolizado peptídico directamente en el medio, que se repite 3 veces por semana durante la duración del experimento.

[0083] La dosis de cada actividad se ha establecido usando sustratos específicos marcados con un compuesto fluorescente: el 7-amido-4-metil-cumarina (AMC). Después de la escisión, el AMC cuya longitud de onda de excitación es de 350 nm, la lectura de la fluorescencia se realiza a 440 nm. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo obtenido y, en consecuencia, esta cantidad es proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado.

[0084] El péptido sintético Boc-Leu-Arg-Arg-AMC es específico para la actividad de la tripsina.

[0085] El péptido sintético Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC es específico de la actividad quimotripsica.

[0086] El péptido sintético Z-Leu-Leu-Gly-AMC es específico de la actividad hidrolasa- peptidilglutamil-péptido.

[0087] Estos péptidos han sido suministrados y marcados por SIGMA ALDRICH, St. Louis, MI, EE.UU..

[0088] Las células se separan del soporte en un tampón de extracción. Después, son sonicadas durante 1 minuto a 4°C, después centrifugadas a 15.000 g durante 30 minutos a 4°C. La dosificación de las proteínas se lleva a cabo por el kit BCA (Pierce). Después de incubación del lisado celular con el sustrato sintético específico de la actividad estudiada, se lee la fluorescencia en el espectrofotómetro Sinergy (BIOTEK, Vermont, EE.UU.) a 440 nm.

5 Resultados:

[0089] Constatamos que para las tres actividades estudiadas, el hidrolizado peptídico según el Ejemplo 1, ha permitido incrementar la actividad enzimática del proteasoma 20S. La actividad de tipo tripsina se incrementa en 155,3% con el tratamiento por el activo, la actividad de tipo quimotripsina se incrementa en 130% y se registra un incremento de 144,6% para la actividad hidrolasa peptidilglutamilo-péptido.

10 Conclusiones

[0090] El hidrolizado peptídico enriquecido en péptidos bioactivos según el Ejemplo 1, utilizado a 1% en los queratinocitos envejecidos experimentalmente en cultivo permite aumentar las actividades enzimáticas específicas del proteasoma 20S.

15 **[0091]** El experimento se realizó varias veces, y ha podido realizarse un test estadístico (test estadístico t de Student). El aumento de las actividades es significativo para el estudio de la actividad de tipo tripsina, de tipo quimotripsina ($p = 0,033$ y $p = 0,0477$, respectivamente) y altamente significativo para la actividad hidrolasa peptidilglutamilo-péptido ($p = 0,00053$).

Ejemplo 5: Puesta en evidencia del efecto anti-envejecimiento del hidrolizado peptídico de levadura según el Ejemplo 3 sobre queratinocitos envejecidos en cultivo

20 **[0092]** Se ha realizado un estudio del efecto anti-envejecimiento del hidrolizado peptídico de levadura evaluando la expresión de la proteína beta-galactosidasa en los queratinocitos envejecidos experimentalmente en cultivo. De hecho, la actividad betagalactosidasa se conoce por estar presente en las células senescentes cuando no encontramos galactosidasa en las células pre-senescientes, quiescentes o inmortales.

Protocolo

25 **[0093]** Queratinocitos envejecidos experimentalmente en labteck 8 pocillos se cultivan y se mantiene durante 20 días en presencia o no de 1% de hidrolizado peptídico de levadura enriquecido en péptidos bioactivos. El tratamiento se lleva a cabo 3 veces por semana por adición directa en el medio.

30 **[0094]** Células no tratadas se mantienen en cultivo durante el mismo tiempo de la experiencia y sirven de control. El día de marcado, las células se lavan, se fijan en una mezcla 2% glutaraldehído-2% formaldehído durante 3 minutos.

35 Las células se enjuagan a continuación y se aplica 300 ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo β -D-galactosidasa comúnmente llamado X-gal (sustrato de la beta-galactosidasa). La incubación se efectúa durante 24 horas en el incubador de CO₂, luego las células se enjuagan y se monta rápidamente la labteck en un medio adecuado. La observación se lleva a cabo al microscopio de transmisión. El principio es simple: cuando las células son senescentes y contienen la beta-galactosidasa, el sustrato X-gal se escinde en un producto azul insoluble. La actividad beta-galactosidasa se evidencia por una coloración de las células azules. Cuantas más células azules, más elevado es el número de células senescentes.

Resultados/Conclusiones :

[0095] Observamos que, en presencia del activo, es decir, el hidrolizado peptídico de levadura, la actividad betagalactosidasa se reduce en gran medida en las células tratadas en comparación con las células no tratadas.

40 **[0096]** Por lo tanto, el hidrolizado peptídico según la invención tiene un efecto anti-envejecimiento sobre queratinocitos cultivados envejecidos experimentalmente durante 20 días de cultivo.

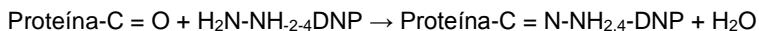
Ejemplo 6 : Evaluación de la carbonilación de las proteínas en fibroblastos tratados con el hidrolizado peptídico de arroz y sometidos a rayos ultravioleta (UVB)

Protocolo :

45 **[0097]** Fibroblastos humanos normales en cultivo se siembran en cajas de diámetros 100. Cuando las células alcanzan 70% de confluencia, las células se tratan 48 horas con un hidrolizado peptídico de arroz enriquecido en péptidos bioactivos diluidos a 1% en el medio. Las células se someten a radiación UVB a 100 mJ/cm², y luego se siguen tratando 48 horas suplementarias en presencia del principio activo. Cajas de control con células no tratadas con el principio activo, pero irradiadas sirven de testigo. Las células se lavan y luego se separan del soporte utilizando un tampón de extracción adecuado. Las proteínas así extraídas se centrifugan a 4°C a 10.000 rpm durante 10 minutos antes de ser dosificadas por el kit de dosificación de proteínas BCA (Pierce). La carbonilación de las

proteínas se realiza por un test basado en la inmunodetección de los grupos carbonilados previamente derivados por la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) (SIGMA).

[0098] Según la reacción:



5 **[0099]** En resumen, 15 ml de la muestra se hacen reaccionar con 45 ml de DNP durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se diluye 5 ml de la mezcla en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y 200 ml de esta dilución se colocan en una placa de 96 pocillos durante la noche a 4°C en presencia de 150 ml de BSA (fracción V).

10 **[0100]** Después de 3 lavados en tampón fosfato salino (PBS), el anticuerpo biotinilado de conejo anti-dinitrofenilo (CALBIOCHEM) se diluye a 1/5000 en el tampón 0,1% de albúmina de suero en presencia de 0,1% de Tween 20 y se incuba en las microplacas durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados, se incuba el complejo estreptavidina-peroxidasa (DAKO) diluido a 1/3000 en el tampón 0,1% de albúmina de suero en presencia de 0,1% de Tween 20 y se incuba en las microplacas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, el revelado se hace con 200 ml de tetrametilbencidina (TMB, SIGMA) 25 minutos a temperatura ambiente. Después, la adición de 100 ml de ácido sulfúrico 2,5 M permite detener la reacción. La lectura de la DO se realiza a 490 nm. Para convertir la DO obtenida en grupos carbonilo presentes en las muestras, se ha establecido una curva estándar haciendo variar proporciones de 0 a 100% de BSA oxidado.

Resultados :

20 **[0101]** En presencia de UVB las células no tratadas son fuertemente carboniladas y aumentan el 110% en comparación con las células no irradiadas y no tratadas. En presencia del hidrolizado peptídico de arroz enriquecido en péptidos bioactivos al 1%, la tasa de carbonilación disminuye un 34%. El experimento se llevó a cabo varias veces, y se ha podido realizar un test estadístico (test estadístico t de Student). La disminución de la carbonilación es significativa y $p = 0,0298$.

25 **[0102]** En conclusión, el principio activo de la invención permite proteger las células contra los efectos nocivos de la radiación UV, es decir, contra sus efectos oxidativos. El hidrolizado peptídico de arroz permite reducir más del 34% la oxidación de las proteínas.

Ejemplo 7: Ensayo clínico

Protocolo para la evaluación clínica

30 **[0103]** 12 voluntarios de 29 a 56 años se aplicaron bien un placebo o el hidrolizado peptídico de levaduras enriquecido en péptidos bioactivos según el ejemplo 3, 2 veces al día, mañana y tarde, en una dosis de 2 mg/cm² durante 24 días. Una evaluación clínica de los resultados ha permitido medir varios parámetros de líneas y arrugas.

[0104] La medición de líneas y arrugas se ha realizado gracias a QUANTIRIDE que es un método de evaluación que permite medir el número, longitud y profundidad de las arrugas haciendo una réplica de la piel antes y después del tratamiento con ayuda de un polímero de silicona.

[0105] Los resultados se recogen en las siguientes tablas:

35 Resultados de la cuantificación de arrugas

[0106]

<u>Longitud de las arrugas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Medida (mm)</u>	<u>Wilcoxon</u>	<u>% de voluntarios antes de una mejora</u>
Hidrolizado	J 23-J 0	-0.104	0.017	83.3%
Placebo	J23-J 0	0,0029	N/A	N/A
<u>Número de arrugas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Medida (mm)</u>	<u>Wilcoxon</u>	<u>% de voluntarios antes de una mejora</u>
Hidrolizado	J 23-J 0	-9.5833	0.0249*	75%
Placebo	J23-J 0	5.8333	N/A	N/A

<u>Profundidad de las arrugas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Medida (mm)</u>	<u>Wilcoxon</u>	<u>% de voluntarios antes de una mejora</u>
<u>Hidrolizado</u>	J 23-J 0	-6,5557	0,0075	75%
<u>Placebo</u>	J23-J 0	3,6284	N/A	N/A

Conclusiones:

5 [0107] Despues de 24 días de tratamiento, observamos una reducción estadística de la longitud total de las arrugas en 83,3% de los sujetos tratados, y una disminución del número de arrugas en 75% de los sujetos. En cuanto a la longitud de las arrugas, se constata una diferencia significativa entre el hidrolizado peptídico de levaduras enriquecido en péptidos bioactivos y el placebo ($p = 0,017$). Para la profundidad de las arrugas, la diferencia entre el principio activo y el placebo también es significativa ($p = 0,0075$) y se observa en 75% de los voluntarios.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0108]

- 10 <110> ISP Investments INC.
 <120> HIDROLIZADOS PEPTÍDICOS ACTIVADORES DEL PROTEASOMA Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN
 <130> Bv PCT 09-126
 <150> FR 09 01978
- 15 <151> 2009-04-23
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 5
- 20 <212> PRT
 <213> Planta OR saccharomyces cerevisiae
 <400> 1

Arg Asp Cys Arg Arg
 1 5

25

- <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Planta OR saccharomyces cerevisiae
- 30 <400> 2

Asn Asp Cys Arg Lys
 1 5

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
5 <213> Plant OR saccharomyces cerevisiae
<400> 3

Asp Cys Arg His
1

<210> 4
10 <211> 4
<212> PRT
<213> Planta OR saccharomyces cerevisiae
<400> 4

Val Asp Cys Arg
1

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
20 <213> Planta OR Saccharomyces cerevisiae
<400> 5
Asp Cys Arg

REIVINDICACIONES

5 **1.** Hidrolizado peptídico activador del proteasoma, **caracterizado porque** el hidrolizado se deriva de la hidrólisis de levaduras del género *Saccharomyces*, y más particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, o guisante (*Pisum sativum*) y está enriquecido en péptidos bioactivos de peso molecular inferior a 6 kDa, teniendo 3 a 5 aminoácidos, cada péptido bioactivo comprendiendo al menos un residuo de ácido aspártico, un residuo de cisteína y un residuo de arginina.

2. Hidrolizado peptídico enriquecido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el péptido bioactivo es de fórmula general (I):

10 $X_1 - [\text{Asp, Cys, Arg}] - X_2$

en la cual,

X_1 es una asparagina, una lisina, un aspartato, una valina, una arginina, o está ausente,

X_2 es una histidina, una lisina, una arginina, o está ausente.

15 **3.** Hidrolizado peptídico enriquecido según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el péptido bioactivo es una de las siguientes fórmulas:

(SEC ID nº1) Arg - Asp - Cys - Arg - Arg

(SEC ID nº2) Asn - Asp - Cys - Arg - Lys

(SEC ID nº3) Asp - Cys - Arg - His

20 (SEC ID nº4) Val - Asp - Cys - Arg

(SEC ID nº5) Asp - Cys - Arg.

4. Hidrolizado peptídico enriquecido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** contiene entre 0,5 y 5,5 g/l de compuestos de naturaleza peptídica.

25 **5.** Hidrolizado peptídico enriquecido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se utiliza como medicamento.

6. Composición cosmética que comprende como principio activo dicho hidrolizado peptídico enriquecido según una de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada porque** se presenta en una forma adecuada a la aplicación por vía tópica y comprende un medio cosméticamente aceptable.

30 **8.** Composición según la reivindicación 6 o 7, **caracterizada porque** dicho hidrolizado peptídico enriquecido está presente en la composición en una cantidad que representa de 0,0001% a 20% del peso total de la composición, y preferiblemente en una cantidad que representa de 0,05% a 5% del peso total de la composición.

35 **9.** Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizada porque** contiene además al menos otro principio activo que favorece la acción de dicho hidrolizado peptídicoenriquecido seleccionado entre las vitaminas, los fitosteroles, los flavonoides, la DHEA, un inhibidor de metaloproteinasa, un retinoides.

10. Uso cosmético de una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para aumentar la actividad del proteasoma y mejorar la degradación por el proteasoma de las proteínas dañadas.

40 **11.** Uso cosmético de una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para la prevención y/o tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento, tales como las arrugas y las arrugas profundas y gruesas, las líneas finas, las grietas, la flacidez de los tejidos cutáneos y subcutáneos, la pérdida de elasticidad cutánea y la atonía, pérdida de firmeza y de tonicidad, y la atrofia dérmica.

12. Uso cosmético según la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicha composición permite proteger la piel contra las agresiones debidas a la radiación UV.

45 **13.** Procedimiento de tratamiento cosmético **caracterizado porque** se aplica por vía tópica sobre la piel o los tegumentos a tratar, una composición que comprende una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico enriquecido como

se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento.



Figura 1: Cromatograma CLHP de un hidrolizado de maíz

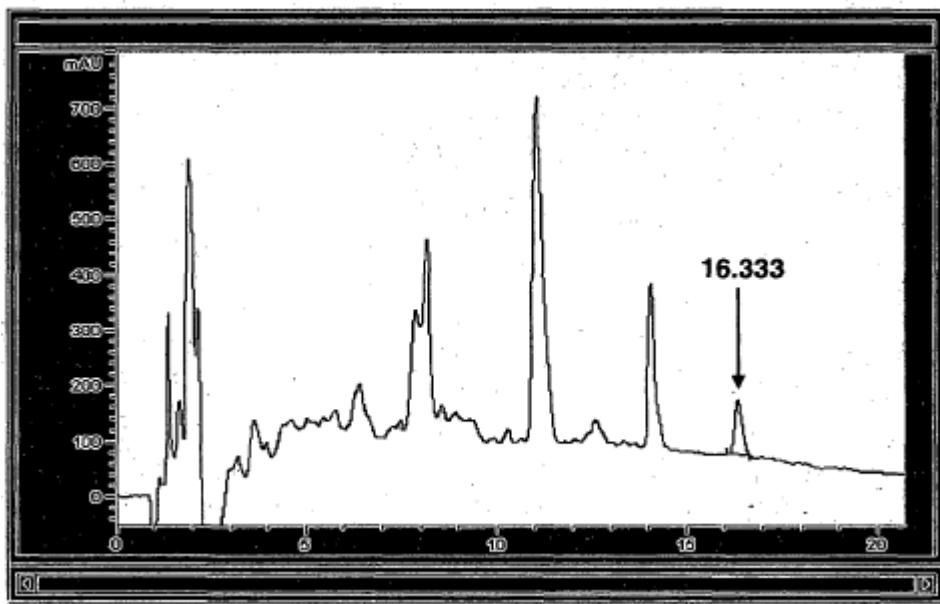


Figura 2: Cromatograma CLHP de un hidrolizado de guisante

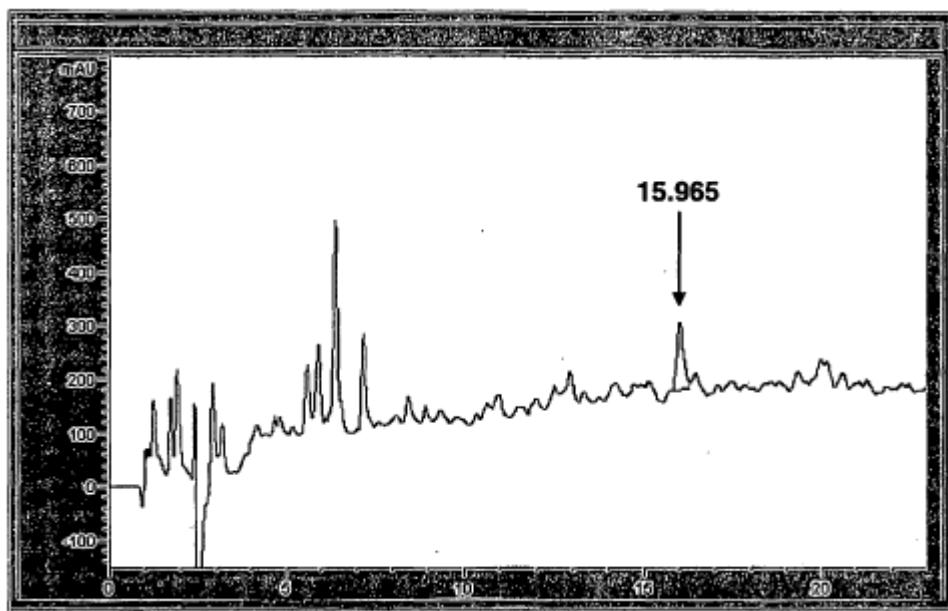


Figura 3: Cromatograma CLHP de un hidrolizado de arroz

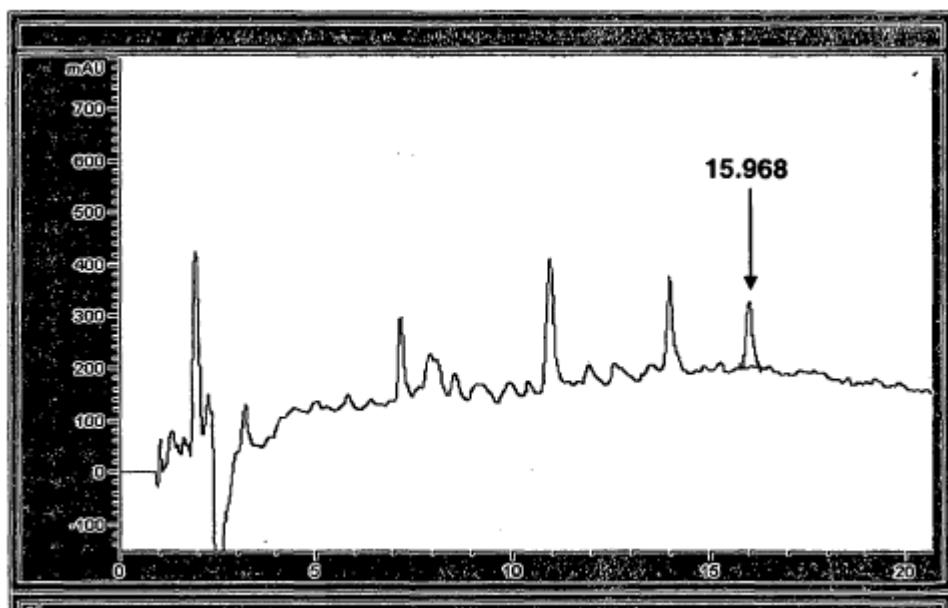


Figura 4: Cromatograma CLHP de un hidrolizado de *saccharomyces*