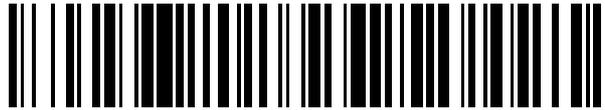


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 454**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012 E 12709676 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2675825**

54 Título: **Nuevos péptidos activadores de la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular y composiciones cosméticas que los comprenden**

30 Prioridad:

18.02.2011 FR 1100497

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

09.07.2015

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 2 540 454 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).

NUEVOS PÉPTIDOS ACTIVADORES DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y COMPOSICIONES COSMÉTICAS QUE LOS COMPRENDEN

5 **Descripción**

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención está en el campo de los agentes activos cosméticos, así como de las composiciones que los comprenden

[0002] La presente invención tiene por objeto proporcionar nuevos péptidos activadores de la expresión de las proteínas de la matriz extracelular.

15 **[0003]** La invención también se refiere a composiciones cosméticas que comprenden dichos péptidos, como agentes activos, en un medio fisiológicamente adecuado.

20 **[0004]** La invención también se refiere al uso de tales composiciones para aumentar la expresión de las proteínas de la matriz extracelular, retardar la aparición de y/o luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento, especialmente las arrugas, la flacidez y la pérdida de volumen cutáneo y la deshidratación de la piel.

Antecedentes de la invención

25

[0005] La piel es un órgano de recubrimiento compuesto de varias capas (dermis, unión dermo-epidérmica, epidermis). La dermis es el tejido de soporte de la piel y se compone de agua, de fibras de elastina y de fibras de colágeno (70% de las fibras dérmicas) envueltas en una matriz intersticial de proteoglicanos. Los fibroblastos son el principal componente celular de la dermis y son responsables de la síntesis de las fibras de colágeno y de las fibras de elastina.

30

[0006] Los glicosaminoglicanos aseguran la estructuración de las fibrillas de colágeno y de elastina y el almacenamiento del agua, gracias a su excepcional higroscopia. El ácido hialurónico es el glicosaminoglicano más abundante de la piel, y el constituyente principal de la dermis, pero también está presente alrededor de los queratinocitos en la epidermis. Los complejos de glicosaminoglicanos y de colágeno son actores principales de la flexibilidad y la firmeza de la piel.

35

[0007] La piel, al igual que todos los demás órganos, está sujeta al complejo proceso fisiológico de envejecimiento. Distinguimos el envejecimiento intrínseco o cronológico y el envejecimiento extrínseco. El envejecimiento intrínseco es la consecuencia de una senescencia genéticamente programada y de alteraciones bioquímicas debidas a factores endógenos. En la piel, se caracteriza por una ralentización de la regeneración de las células y de las matrices extracelulares, lo que resulta en una atrofia dérmica y epidérmica, una sequedad, una reducción de la elasticidad y la aparición de líneas finas y arrugas.

40

45

[0008] El envejecimiento extrínseco, por su parte, se debe a las agresiones ambientales como la contaminación, el sol, las enfermedades, el estilo de vida, etc. Se superpone al envejecimiento intrínseco en zonas expuestas crónicamente a estas agresiones; se habla entonces de fotoenvejecimiento. Las principales alteraciones relacionadas con el fotoenvejecimiento incluyen: la aparición de manchas pigmentarias así como una disminución, la desorganización de las fibras de colágeno que causan la aparición de arrugas

50

55

5 [0009] Las investigaciones para identificar agentes activos capaces de luchar contra el envejecimiento cutáneo han llevado a la puesta en el mercado de muchos agentes activos más o menos eficaces. Sin embargo, todavía es relevante identificar nuevos compuestos capaces de retardar la aparición de o luchar más eficazmente contra los signos del envejecimiento cutáneo. El problema más particularmente contemplado por la invención es identificar nuevos agentes activos capaces de luchar contra los principales signos de envejecimiento cutáneo que se establecen al nivel de la matriz extracelular.

10

Descripción de la invención

15 [0010] Los inventores han demostrado que los péptidos de fórmula general (I) siguiente:



20 eran buenos agentes activadores de la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular. Por consiguiente, estos péptidos son adecuados para luchar contra el envejecimiento y fotoenvejecimiento de la piel.

Los péptidos de acuerdo con la invención se caracterizan porque:

- 25
- aumentan la expresión de los colágenos de tipo I y III
 - aumentan la expresión de la fibronectina,
 - aumentan la expresión del ácido hialurónico,
 - reducen los signos de senescencia de los fibroblastos.

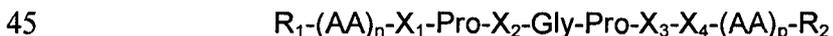
30 [0011] Se entiende por "péptido o activo agente activador de las proteínas de la matriz extracelular", todo péptido de fórmula general (I) capaz de aumentar la cantidad de colágeno, de fibronectina y de ácido hialurónico presente en la célula, o secretada ya sea aumentando la síntesis proteica por modulación directa o indirecta de la expresión génica, o por otros procesos biológicos tales como la estabilización de la proteína o la estabilización de los transcritos de ARN mensajero.

35

[0012] Se entiende por "signos de senescencia de los fibroblastos" el perfil de expresión de marcadores bioquímicos asociados al fenotipo de senescencia celular.

40 [0013] Se entiende por piel, el conjunto de los tejidos de recubrimiento que constituyen la piel, las mucosas y los tegumentos, incluyendo el cabello, las pestañas y las cejas.

[0014] Por lo tanto, la invención tiene por primer objeto un péptido de fórmula general (I)



En la cual

50 X_1 representa la glicina o la alanina o la valina,
 X_2 representa la glicina o la alanina o la valina,
 X_3 representa la asparagina o la lisina o la glutamina o algún aminoácido,
 X_4 representa la fenilalanina o la tirosina o algún aminoácido,
 AA representa cualquier aminoácido y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 2,

5 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en el que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido ya sea por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada, sea por un grupo de tipo acilo ($R-CO-$) en el que el radical R es una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada y preferiblemente un metilo o sea por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxicarbonilo,

10 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY , en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida de 5 a 11 residuos de aminoácidos y pudiendo estar en forma de sales, el péptido siendo de secuencia:

15 (SEC ID nº1) : Ala-Pro-Ala-Gly-Pro- NH_2
 (SEC ID nº2) : Val-Pro-Ala-Gly-Pro
 (SEC ID nº3) : Val-Pro-Gly-Gly-Pro- NH_2
 (SEC ID nº4) : Gly-Pro-Ala-Gly-Pro
 (SEC ID nº5) : Gly-Pro-Ala-Gly-Pro- NH_2
 20 (SEC ID nº6) : Lys-Gly-Ala-Pro-Gly-Gly-Pro-Asn-Tyr- NH_2 .

[0015] Según una forma de realización particularmente interesante, el péptido corresponde a la secuencia SEC ID nº 4.

25 [0016] En otra forma de realización de particular interés, el péptido corresponde a la secuencia SEC ID nº5.

[0017] Los aminoácidos que constituyen el péptido según la invención y designados por los términos AA, pueden estar bajo configuración isomérica L- y D-.
 30 Preferiblemente, los aminoácidos están en L

[0018] El término "péptido" indica un encadenamiento de dos o varios aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

35 [0019] Por "péptido" debe entenderse también el péptido natural o sintético de la invención como se describe anteriormente, o al menos un fragmento del mismo, ya sea obtenido por proteólisis o sintéticamente, o cualquier péptido natural o sintético cuya secuencia esté constituida total o parcialmente por la secuencia del péptido descrito anteriormente.

40 [0020] Con el fin de mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido según la invención. Es posible proteger la función amina primaria del aminoácido N-terminal, sea por una sustitución por un grupo R_1 de tipo acilo ($R-CO-$) en la que el radical R es una cadena alquilo de C_1 a C_{30}
 45 saturada o insaturada preferiblemente de tipo metilo, o sea por una sustitución por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo, o benciloxicarbonilo.

[0021] Preferiblemente, se realiza una protección de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, por una sustitución por un grupo R_2 de tipo de cadena alquilo de C_1 a C_{30} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY con Y representando una cadena alquilo de C_1 a C_4 .
 50

[0022] El péptido de la invención, de secuencia SEC ID nº 1 a SEC ID nº 6, puede estar protegido a nivel del extremo N-terminal, C-terminal o en ambos extremos.
 55

[0023] El péptido de fórmula general (I) según la invención de secuencia SEC ID nº1-6 puede obtenerse ya sea por síntesis química convencional (en fase sólida o en fase homogénea líquida), o por síntesis enzimática (Kullman et al. J. Biol. Chem., 1980, vol. 225, p. 8234 a partir de aminoácidos constituyentes).

5

[0024] El péptido de la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferentemente según la invención, el péptido es de origen sintético, obtenido por síntesis química.

10

[0025] Según la invención, el agente activo puede ser un péptido único o una mezcla de péptidos.

15

[0026] El péptido de la invención está ventajosamente disuelto en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, tales como el agua, el glicerol, el etanol, el propanodiol, el butilenglicol, el dipropilenglicol, los diglicoles etoxilados o propoxilados, los polioles cíclicos, o cualquier mezcla de estos disolventes.

20

[0027] El término "fisiológicamente adaptado" significa disolventes o medios que son adecuados para un uso en contacto con la piel o los tegumentos humanos, sin riesgo de toxicidad, de intolerancia, de inestabilidad, de respuesta alérgica y otros efectos secundarios.

[0028] El péptido diluido se esteriliza después por filtración estéril.

25

[0029] Después de esta etapa de dilución, el péptido puede ser encapsulado o incluido en un vector cosmético, tales como los liposomas o cualquier otra microcápsula utilizada en el campo de la cosmética o adsorbido sobre polímeros orgánicos pulverulentos, soportes minerales como los talcos y bentonitas, y más generalmente solubilizado en, o fijado sobre, cualquier vector fisiológicamente adecuado.

30

[0030] La invención tiene por segundo objeto una composición cosmética que comprende, en un medio fisiológicamente adecuado, un péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID nº1-6, como agente activo activador de la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular de la piel.

35

[0031] Según una realización ventajosa de la invención, el agente activo está presente en las composiciones en una concentración de entre 0,0005 y 500 mg/kg, y preferiblemente entre 0,01 y 5 mg/kg respecto al peso total de la composición final. Este intervalo de concentraciones representa la cantidad requerida de agente activo para obtener el efecto molecular buscado, a saber, activar la expresión de los colágenos tipo I y III, de la fibronectina y del ácido hialurónico.

40

[0032] Preferiblemente, la composición según la invención se presenta en una forma adecuada para aplicación tópica que comprende un medio fisiológicamente adecuado para la piel.

45

[0033] Se entiende por "aplicación tópica", el hecho de aplicar o extender el agente activo de la invención, o una composición que lo contiene, sobre la superficie de la piel.

50

[0034] Estas composiciones pueden notablemente presentarse bajo forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa, una emulsión aceite-en-agua, agua-en-aceite o emulsiones múltiples, gel acuoso o anhidro, coloide. Estas composiciones también pueden presentarse en forma de cremas, suspensiones, o polvos, adecuadas para la aplicación sobre la piel, las mucosas, los labios y/o los tegumentos. Estas

55

5 composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, de una loción, de una leche, de un suero, de una pomada, de una crema, de una pasta o de una espuma. También pueden presentarse en forma sólida como un palo, o ser aplicadas sobre la piel en forma de aerosol. Pueden ser utilizadas como un producto para el cuidado y/o como producto de maquillaje de la piel.

10 **[0035]** El conjunto de estas composiciones comprende además cualquier aditivo habitualmente utilizado en el campo de aplicación contemplado así como los aditivos necesarios para su formulación, tales como co-disolventes (etanol, glicerol, alcohol bencílico, humectante. ..), espesantes, diluyentes, emulsionantes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, aceites esenciales, oligo-elementos, ácidos grasos esenciales, surfactantes, polímeros formadores de película, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes o
15 aguas termales, etc. Se puede, por ejemplo, citar polímeros hidrosolubles de tipo polímero natural, tales como los polisacáridos o polipéptidos, derivados celulósicos de tipo metil celulosa o hidroxipropil celulosa, o polímeros sintéticos, polaxámeros, carbómeros, siloxanos, PVA o PVP, y notablemente los polímeros vendidos por la sociedad ISP.

20 **[0036]** En todos los casos, el experto en la materia se asegurará de que estos adyuvantes y sus proporciones se eligen de forma que no perjudiquen las propiedades ventajosas investigadas de la composición según la invención. Estos aditivos pueden, por ejemplo, estar presente en concentraciones que van de 0,01 a 20% del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase
25 grasa puede representar de 5 a 80% en peso y preferiblemente de 5 a 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y co-emulsionantes utilizados en la composición se elegirán 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, respecto al peso total de la composición.

30 **[0037]** Se entiende que el agente activo de la invención puede ser utilizado solo o en combinación con otros agentes activos.

35 **[0038]** Ventajosamente, las composiciones utilizadas según la invención contienen, además, al menos otro agente activo destinado a reforzar la acción del agente activo de la invención, en el campo de la prevención y de la mejora de los signos cutáneos del envejecimiento, u otro agente activo que permita ampliar la gama de propiedades de la composición considerada.

40 **[0039]** Se puede citar, sin limitación, las clases de ingredientes siguientes: los agentes regenerantes, anti-edad, anti-arrugas, calmantes, anti-radicales, anti-glicación, hidratantes, antibacterianos, antifúngicos, queratolíticos, relajantes musculares, descamantes, reafirmantes, los agentes estimulantes de la síntesis de
45 macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético o la microcirculación o el crecimiento del cabello, los agentes que modulan la diferenciación o la pigmentación de la epidermis, los agentes inhibidores de las metalo-proteinasas o las pantallas o filtros solares.

50 **[0040]** En una realización más particular, la composición según la invención comprenderá, además del péptido de la invención,

- al menos un compuesto activador del citocromo c y/o,
- al menos un compuesto hidratante, tal como un compuesto activador de las acuaporinas y/o,
- 55 - al menos un compuesto activador de las sirtuinas y/o,

- al menos un compuesto que aumenta la adhesión celular y/o,
- al menos un compuesto que aumenta la producción de proteínas matriciales tales como el colágeno, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos y/o,
- al menos un compuesto que modula la actividad del proteasoma y/o,
- 5 - al menos un modulador compuesto del ritmo circadiano y/o,
- al menos un modulador compuesto de las proteínas HSP y/o,
- al menos un compuesto que aumenta la energía celular y/o,
- al menos un compuesto que modula la pigmentación de la piel y/o,
- 10 - al menos un compuesto activador de la coenzima Q10 y/o,
- al menos un compuesto de mejora de la función de barrera, tal como un compuesto activador de la transglutaminasa o de la HMG-CoA reductasa y/o,
- al menos un compuesto protector de la mitocondria.

15 **[0041]** Dichos compuestos anteriores pueden ser de origen natural, tales como hidrolizados peptídicos de plantas, o de origen sintético, como péptidos.

20 **[0042]** Independientemente de sus funciones, los otros agentes activos asociados con el agente activo de la invención en la composición pueden tener muy diferentes estructuras químicas. Se puede citar, pero no se limitan a, los péptidos, la vitamina C y sus derivados, las vitaminas del grupo B, la DHEA (deshidroepiandrosterona), los fitoesteroles, el ácido salicílico y sus derivados, los retinoides, los flavonoides, los aminados de azúcares, los azoles, las sales metálicas, los extractos peptídicos de origen vegetal o los polímeros.

25 **[0043]** La invención tiene por tercer objeto la utilización de una composición cosmética que comprende el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID n°1-6 como agente activo, para aumentar la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular por las células de la piel.

30 **[0044]** Más particularmente, el péptido de la invención se utiliza para aumentar la síntesis de los colágenos I y III y de la fibronectina por los fibroblastos de la piel humana.

35 **[0045]** De acuerdo con esta forma de realización particular de la invención, el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID n°1-6 se utiliza para aumentar la densidad de la dermis, y por lo tanto la firmeza de la piel, retardar o reducir la flacidez de los rasgos faciales, la pérdida de volumen de la dermis, el adelgazamiento de la piel, la atonía, las líneas finas, las arrugas profundas y la atrofia dérmica.

40 **[0046]** La invención tiene por cuarto objeto la utilización de una composición cosmética que comprende el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID n°1-6 como agente activo para aumentar la expresión del ácido hialurónico a la vez por los fibroblastos y los queratinocitos.

45 **[0047]** De acuerdo con esta realización particular de la invención, el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID n°1-6 se utiliza para aumentar la capacidad de todas las capas de la piel para retener el agua y retraso o reducir la deshidratación de la piel debida al envejecimiento.

50 **[0048]** La invención tiene por quinto objeto la utilización de una composición cosmética que comprende el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEC ID n°1-6 como agente activo para retardar la aparición o reducir la senescencia de las células de la piel.

5 **[0049]** Se entiende por la expresión "retardar la aparición o reducir la senescencia de las células de la dermis" que, de acuerdo con este aspecto ventajoso de la invención, el péptido de la invención disminuye la expresión de marcadores de senescencia en fibroblastos humanos cuya senescencia ha sido inducida por extinción del gen FOXO3a.

10 **[0050]** Por manifestaciones cutáneas del envejecimiento, se entiende todos los cambios de la apariencia externa de la piel y de los tegumentos debidos al envejecimiento como, por ejemplo, el adelgazamiento de la piel, la flacidez, la pérdida de hidratación y la atonía, las profundas y las finas, la pérdida de firmeza y tonicidad, y la atrofia dérmica o toda otra degradación interna de la piel consecutiva a una exposición a la radiación UV.

15 **[0051]** Otras características y ventajas de la invención se pondrán mejor de manifiesto con la lectura de los ejemplos dados a título ilustrativo y no restrictivo.

20 **Ejemplo 1: Demostración del efecto activador de los péptidos de SEC ID nº 4 y nº 5 sobre la expresión del colágeno I, del colágeno III, del procolágeno, de la fibronectina y del ácido hialurónico en fibroblastos humanos**

25 **[0052]** El propósito de este estudio es determinar la influencia de los péptidos SEC ID nº 4 y nº 5 y del péptidos SEC ID nº 4 sobre la expresión de las proteínas de la matriz extracelular siguientes: colágeno I, colágeno III, procolágeno, fibronectina y ácido hialurónico en los fibroblastos humanos. Para esto, se han realizado marcados específicos en cultivos de fibroblastos humanos normales de la dermis.

30 **[0053]** Protocolo de los marcados específicos: fibroblastos humanos en cultivo son tratadas con el péptido SEC ID nº5 o el péptido SEC ID nº 4 en una concentración final de 0,5%, 1% y/o 3% (a partir de una solución madre a 40 mg / kg) durante 24, 48 y/o 72 horas. Las células se lavan a continuación, se fijan con metanol frío durante 4 minutos a 4°C (para los marcados colágeno I, colágeno III y ácido hialurónico) o con formaldehído al 3,7% durante 10 minutos a temperatura ambiente (para los marcados procolágeno y fibronectina). Las células se incuban en presencia de un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno I (Rockland, Ref: 600-401-103-0.5), de un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno III (Rockland, Ref: 600-401 - 105-,5), de un anticuerpo policlonal de rata específico del procolágeno (Millipore, ref: MAB1912), de un anticuerpo policlonal de conejo específico de la fibronectina (Sigma, ref: F-3648), después de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen, ref: A21206) o anti-rata acoplado a un fluorocromo (Invitrogen A11006). Para el etiquetado del ácido hialurónico, las células se incuban en presencia de una proteína biotinilada específica (Fogger, Ref: 4007631A), a continuación en presencia de estreptavidina acoplada a un fluorocromo (Invitrogen, Ref: S32354). Las células se examinan luego al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

45 **[0054]** Resultados: En todas las condiciones ensayadas, se observa una fluorescencia más intensa en los fibroblastos tratados por el péptido SEC ID nº5 o el péptido SEC ID nº 4 que en las condiciones de control.

50 **[0055]** Conclusiones: Los péptidos SEC ID nº5 y SEC ID nº 4 estimulan la expresión del colágeno I, del colágeno III, del pro-colágeno, de la fibronectina y del ácido hialurónico por los fibroblastos humanos dérmicos.

Ejemplo 2: Demostración del efecto activador del péptido SEC ID nº5 sobre la expresión del colágeno I, del colágeno III, del pro-colágeno y del ácido hialurónico en biopsias de piel

5 **[0056]** El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID nº5 sobre la expresión de las proteínas de la matriz extracelular siguientes: colágeno I, colágeno III, pro-colágeno, fibronectina y ácido hialurónico en la piel humana. Para esto se han realizado marcados específicos se hicieron sobre muestras de pieles humanas cultivadas *ex vivo*.

10 **[0057] Protocolo:** Muestras de piel humana se cultivan en la interfase aire/líquido. El péptido SEC ID nº5 se aplica tópicamente sobre las muestras a concentraciones finales de 0,5%, 1% o 3% (a partir de una solución madre de 40 mg/kg) y luego las muestras se incuban durante 24, 48 y/o 72 horas a 37°C.

15 **[0058]** Estas muestras de piel se fijan a continuación con formaldehído y luego se embeben en parafina o se fijan y embeben en OCT y luego se congelan a -20°C. Se realizan entonces cortes de espesor 4 mm (6 mm para los cortes en frío).

20 **[0059]** Los marcados del colágeno I y del colágeno III, sobre muestras embebidas en parafina, se llevan a cabo después de desenmascarar sitios específicos. Los inmunomarcados se realizan usando un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno I (Rockland, Ref: 600-401-103-0.5), de un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno III (Rockland, Ref: 600 -401-105-0.5), a continuación de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen, ref: A21206).
25 Para el etiquetado del ácido hialurónico, las células se incuban en presencia de una proteína biotinilada específica (Fogger, Ref: 4007631 A), luego en presencia de estreptavidina acoplada a un fluorocromo (Invitrogen, Ref: S32354).

30 **[0060]** El inmunomarcado del procolágeno, sobre las muestras incluidas en el OCT, se realiza después de un fijado de 10 minutos con acetona fría. El inmunomarcado se realiza usando un anticuerpo policlonal de rata específico del procolágeno (Millipore, ref: MAB1912) luego de un anticuerpo secundario anti-rata, acoplado a un marcador fluorescente (Invitrogen A11006).

35 **[0061]** Las células se examinan luego al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

40 **[0062] Resultados:** Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia más intensa al nivel de la dermis de las muestras de piel tratadas con el péptido SEC ID nº5. En el caso del inmunomarcado del ácido hialurónico, también se observa un aumento de la fluorescencia al nivel de la epidermis de las muestras de piel tratadas con el péptido SEC ID nº5.

45 **[0063] Conclusiones:** El péptido SEC ID nº 5 estimula la expresión del colágeno I, del colágeno III, del pro-colágeno en la dermis y estimula la expresión del ácido hialurónico en la dermis y la epidermis humanas.

Ejemplo 3: Demostración del efecto activador del péptido SEC ID nº5 sobre la expresión de los ARN mensajeros del colágeno I por PCR en tiempo real

50 **[0064]** El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID nº5 sobre la expresión de los ARN mensajeros del colágeno I en los fibroblastos humanos. Para esto, la expresión de colágeno I ha sido estudiada por PCR en tiempo real.

55

5 [0065] Protocolo: Fibroblastos humanos en cultivo son tratados con el péptido SEC ID n°5 a concentraciones finales de 0,5% y 1% (a partir de una solución madre a 40 mg/kg) durante 24, 48 y 72 horas. Los ARN totales se extraen usando un kit de extracción (QIAGEN) y se transcriben inversamente con un kit específico que contiene
10 inhibidores de RNasa (Applied Biosystems). Se realiza un PCR en tiempo real en un termociclador usando un Ensayo TaqMan Gene Expression específico del colágeno I (Applied Biosystem, Hs99999901_s1) y de un Ensayo TaqMan Gene Expression específicos del 18S usado como control endógeno (Applied Biosystems, Hs00164004_m1). La cuantificación relativa de la expresión de los ARN mensajeros del colágeno I se lleva a cabo por el método comparativa de los Ct (Ct, ciclo umbral, es la intersección entre la curva de amplificación y la línea de suelo).

15 [0066] Resultados/Conclusión: El péptido SEC ID n°5 estimula la expresión de los ARN mensajeros del colágeno I en los fibroblastos humanos.

Ejemplo 4: Estudio de la expresión del marcador de senescencia P16 en presencia del péptido SEO ID n° 5

20 [0067] El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID n°5 sobre la expresión de P16, una proteína cuya expresión en la piel aumenta con la edad. P16 es una proteína implicada en la regulación negativa del ciclo celular, que ha sido descrita como un marcador fiable de la senescencia celular (Brookes, S. et al. Experimental Cell Research 298, 2004).

25 [0068] Protocolo: Fibroblastos humanos en cultivo son tratados con el péptido SEC ID n°5 a concentraciones finales de 0,5% y 1% (a partir de una solución madre de 40 mg/kg) durante 48 horas. Las células se preparan de acuerdo con el kit Sistema de Preparación Celular Shandon Cytoblock® (Thermo Scientific, Ref: 7401150).

30 [0069] Las células son fijadas a continuación con formaldehído y luego incluidas en la parafina. sS llevaron a cabo a continuación cortes de 4 mm. El marcado de p16 sobre las células embebidas en parafina se realiza después de desenmascarar sitios específicos. Los inmunomarcados se realizan utilizando un anticuerpo policlonal de ratón específico de p16 (Santa-Cruz, Ref: sc-81157) y luego de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a un fluorocromo (Invitrogen, ref: A21202). Las células se examinan luego al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).
35

40 [0070] Resultados: Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia nuclear menos intensa en las células tratadas por el péptido SEC ID n°5.

[0071] Conclusiones: El péptido SEC ID n°5 disminuye la expresión del marcador de senescencia p16 en los fibroblastos humanos.

45 **Ejemplo 5: Demostración de la reversión de la senescencia celular inducida en los fibroblastos, por el péptidos SEC ID N°5**

50 [0072] El propósito de este estudio es determinar la influencia del péptido SEC ID n°5 sobre fibroblastos senescentes, cuya senescencia ha sido inducida por la extinción del gen FOXO3a. Estas células sobreexpresan la beta-galactosidasa, en relación con su estado senescente. FOXO3a es un factor de transcripción de tipo Forkhead involucrado en la longevidad celular. En la piel, la regulación negativa FOXO3a acelera la senescencia de los fibroblastos humanos normales (Hyun Kyong K. et al. J. of Gerontol., 2005, Vol. 60A No. 1, páginas 4-9). Esta propiedad se ha explotado para

inducir la senescencia en fibroblastos humanos extinguiendo la expresión de FOXO3a por un ARN de interferencia (ARNsi) específico.

5 **[0073] Protocolo:** Los fibroblastos humanos en cultivo se hacen senescentes por un tratamiento con un ARNsi específico de FOXO3a a una concentración final de 25 nM usando la técnica de transfección por la Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, Ref: 13778-075). Se realizan controles no tratados. Los fibroblastos son tratados en paralelo por el péptido SEC ID nº5 a una concentración final de 1% (a partir de una solución madre a 40 mg/kg) durante 48 horas.

10 **[0074]** Las células se enjuagan y se fijan en un tampón de fijación (0,2% de glutaraldehído, 2% de formaldehído). Las células se incuban a continuación a 37°C sin CO₂ durante 24 horas con una solución de X-Gal a 1 mg/ml en 40 mM de ácido cítrico/fosfato (pH 6), 5 mM K₃FeCN₆, 5 mM K₄FeCN₆, 150 mM NaCl y 2 mM MgCl₂.
15 Las células se examinan entonces al microscopio de luz blanca (microscopio Nikon Eclipse E600).

20 **[0075] Resultados:** Las células senescentes con una actividad β-galactosidasa específica se colorean en azul. Las células tratadas con el ARNsi específico de FOXO3a muestran un aumento de la actividad β-galactosidasa ligada a la inducción de la senescencia, lo que se traduce en un aumento del número de células coloreadas en azul. Las células tratadas con los ARNs específicos de FOXO3a y el péptido SEC ID nº 5 al 1% muestran una disminución de la actividad β-galactosidasa, que se traduce en una disminución del número de células coloreadas en azul.

25 **[0076] Conclusión:** El péptido SEC ID nº5 es capaz de disminuir el fenotipo de senescencia inducida en fibroblastos humanos.

30 **Ejemplo 6: Preparación de composiciones**

1 -Crème de cara antiedad:

[0077]

Nombres Comerciales	Nombres INCI	% másico
Fase A		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
ISP Bonjour Refined shea butter	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Si-tec DM 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzyme Q10	Ubiquinone	0,10
Fase B		
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Optiphen	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	1
Fase C		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Butilenglicol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Alantoina	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
Fase D		
TEA	Triethanolamine	0,18

Fase E		
Péptido SEC ID nº 5		3 mg/kg
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 **[0078]** Preparar y derretir 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 C. A unos 45°C, el carbómero se neutraliza por adición de la fase D. A unos 30°C, la fase E se añade a continuación con agitación ligera y el enfriamiento se continúa hasta 25°C. La fase F se añade a continuación si se desea.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0079]**

<110> ISP Investments INC.

15 <120> NUEVOS PÉPTIDOS ACTIVADORES DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y COMPOSICIONES COSMÉTICAS QUE LOS COMPRENDEN

<130> Bv PCT 11-150

20 <150> FR1100497
<151> 2011-02-18

<160> 6

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

35 <223> AMIDACIÓN

<400> 1

Ala Pro Ala Gly Pro
1 5

40 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Péptido sintético

45 <400> 2

Val Pro Ala Gly Pro
1 5

5
<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Péptido sintético

10
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> AMIDACIÓN

<400> 3

Val Pro Gly Gly Pro
1 5

15
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Péptido sintético

20
<400> 4

Gly Pro Ala Gly Pro
1 5

25
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Péptido sintético

30
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> AMIDACIÓN

<400> 5

Gly Pro Ala Gly Pro
1 5

35
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Péptido sintético

40
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9) .. (9)
<223> AMIDACIÓN

45
<400> 6

Lys Gly Ala Pro Gly Gly Pro Asn Tyr
1 5

Reivindicaciones**1. Péptido de fórmula general (I):**

5 $R_1-(AA)_n-X_1-Pro-X_2-Gly-Pro-X_3-X_4-(AA)_p-R_2$

en la cual

10 X_1 representa la glicina o la alanina o la valina,
 X_2 representa la glicina o la alanina o la valina,
 X_3 representa la asparagina o la lisina o la glutamina o algún aminoácido,
 X_4 representa la fenilalanina o la tirosina o algún aminoácido,
 AA representa cualquier aminoácido y n y p son números enteros entre 0 y 2,
 15 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, -NH₂, en la que uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido ya sea por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ saturada o insaturada, sea por un grupo de tipo acilo (R-CO-) en el que el radical R es una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ saturada o insaturada y preferiblemente un metilo, sea por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxicarbonilo,
 20 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, -OH, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀, o un grupo NH₂, NHY o NY₂, en el que Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄,

25 dicha secuencia de fórmula general (I) estando constituida de 5 a 11 residuos de aminoácidos y pudiendo estar en forma de sales, **caracterizado porque** corresponde a una de las siguientes secuencias:

30 (SEC ID nº1) : Ala-Pro-Ala-Gly-Pro-NH₂
 (SEC ID nº2) : Val-Pro-Ala-Gly-Pro
 (SEC ID nº3) : Val-Pro-Gly-Gly-Pro-NH₂
 (SEC ID nº4) : Gly-Pro-Ala-Gly-Pro
 (SEC ID nº5) : Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-NH₂
 (SEC ID nº6) : Lys-Gly-Ala-Pro-Gly-Gly-Pro-Asn-Tyr-NH₂.

35

2. Péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque corresponde a la secuencia SEC ID nº 4 o a la secuencia SEC ID nº.5.

40 **3. Péptido según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque** está solubilizado en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, tales como el agua, el glicerol, el etanol, el propanodiol, el butilenglicol, el dipropilenglicol, los diglicoles etoxilados o propoxilados, los polioles cíclicos, o cualquier mezcla de estos disolventes.

45 **4. Composición cosmética que comprende en un medio fisiológicamente adecuado, al menos un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como agente activo.**

50 **5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada porque** dicho péptido está presente en una concentración comprendida entre 0,0005 a 500 mg/kg, y preferiblemente entre 0,01 a 5 mg/kg con respecto al peso total de la composición final

6. Composición según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizada porque está destinado a una administración por vía tópica.

55

7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizada porque** contiene además al menos otro agente activo.
- 5
10
15
20
25
30
35
40
8. Composición según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el otro agente activo se selecciona entre los agentes regenerantes, anti-edad, anti-arrugas, calmantes, anti-radicales, anti-glicación, hidratantes, antibacterianos, antifúngicos, queratolíticos, relajantes musculares, descamantes, reafirmantes, los agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético o la microcirculación o el crecimiento de las uñas o el crecimiento del cabello, los agentes que modulan la diferenciación o la pigmentación de la epidermis, los agentes inhibidores de las metalo-proteinasas, o las pantallas o filtros solares.
9. Utilización cosmética de una composición que comprende el péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como agente activo, en un medio fisiológicamente adecuado, para aumentar la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular por las células de la piel.
10. Utilización cosmética de una composición que comprende el péptido como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3 como agente activo, en un medio fisiológicamente adecuado, para aumentar la síntesis de los colágenos de tipo I y III y de la fibronectina por los fibroblastos.
11. Utilización cosmética de una composición según la reivindicación precedente para aumentar la densidad de la dermis y la elasticidad de la piel, y para retardar o reducir la flacidez de los rasgos faciales, la pérdida de volumen de la dermis, el adelgazamiento de la piel, la atonía, las líneas finas, las arrugas profundas.
12. Utilización cosmética de una composición que comprende el péptido como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3 como agente activo, en un medio fisiológicamente adecuado, para aumentar la expresión del ácido hialurónico por los fibroblastos y los queratinocitos de la piel.
13. Utilización cosmética de una composición según la reivindicación precedente para aumentar la capacidad de todas las capas de la piel para retener el agua y para retardar o reducir la deshidratación de la piel ligada al envejecimiento.
14. Utilización cosmética de una composición que comprende el péptido como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3 como agente activo, en un medio fisiológicamente adecuado, para retardar la aparición o reducir la senescencia de las células de la piel.