

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 392**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 5/103</b>	(2006.01) <b>A61K 38/07</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01) <b>A61K 38/08</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/395</b>	(2006.01) <b>A61K 8/97</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/415</b>	(2006.01) <b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/01</b>	(2006.01)	
<b>A61K 8/64</b>	(2006.01)	
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 17/04</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 17/00</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010 E 10718238 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2419438**

54 Título: **Composición cosmética y/o farmacéutica que comprende un hidrolizado peptídico capaz de reforzar la función barrera**

30 Prioridad:

**15.04.2009 FR 0901822**

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

**27.10.2015**

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:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 549 392 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición cosmética y/o farmacéutica que comprende un hidrolizado peptídico capaz de reforzar la función barrera

5

**[0001]** La presente invención se sitúa en el campo de la cosmética y farmacia y, en especial, en el mundo de la dermatología. La invención hace referencia a un hidrolizado peptídico enriquecido con péptido bioactivo, capaz de reforzar la función barrera cutánea y estimular la diferenciación epidérmica. El péptido bioactivo se caracteriza por contener de 4 a 6 aminoácidos, entre los que al menos se encuentra un residuo de glicina, un residuo de leucina y un residuo de ácido glutámico, y posee una secuencia de fórmula general (I) X1-[Gly,Glu,Leu]-X2-X3, elegida entre las secuencias SEQ ID nº1 y SEQ ID nº7, que proviene de la hidrólisis de proteínas de plantas escogidas, entre las que se encuentra la espelta, la patata, el maíz, el guisante o las levaduras del género *Saccharomyces*, y está compuesto por péptidos de peso molecular inferior a 6 kDa. La presente invención también trata sobre una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, un hidrolizado peptídico enriquecido con péptido bioactivo, en cuanto que se trata de un principio activo capaz de reforzar la función barrera de la epidermis. La invención es igualmente aplicable a una composición farmacéutica que comprende un nuevo principio activo en calidad de medicamento. En resumen, la presente invención conlleva la utilización cosmética de dicho hidrolizado peptídico, tratándose de un principio activo para activar la encima HMG-CoA reductasa y así reforzar la función barrera cutánea y estimular la diferenciación epidérmica. Además, la invención recoge un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a prevenir y/o luchar contra las agresiones externas y manifestaciones del envejecimiento cutáneo.

**[0002]** La principal función de la epidermis consiste en formar una barrera entre el entorno exterior y el medio interior. La capa más externa de la epidermis, la capa córnea, es la encargada de llevar a cabo dicha función. Está formada por queratinocitos en su estado último de diferenciación, corneocitos, unidos los unos a los otros por un grueso cemento intercelular, flexible e impermeable. Dentro de la capa córnea se distingue, además, un compartimento celular formado por corneocitos y un compartimento extracelular formado principalmente por lípidos, organizados en estructuras multilaminadas.

**[0003]** El contenido lipídico de la capa córnea humana se estima está constituido por un 15 % de ester de colesterol, un 16 % de ácidos grasos libres saturados de cadena larga, un 32 % de colesterol y un 37 % de ceramidas, si bien las variaciones interindividuales son bastante importantes (Norlen L. y otros, *J. Invest. Dermatol.* 1999; 112(1) p. 72-77). Estos lípidos son sintetizados por los queratinocitos de las capas intermedias de la epidermis y segregados en organitos especializados conocidos como "cuerpos laminados" o cuerpos de Odland. En particular, la epidermis tiene un papel muy activo en la síntesis del colesterol. La fase limitante de dicha síntesis, y la que está regulada con mayor cuidado, es la conversión del 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) en mevalonato. Esta fase se cataliza por medio de una encima membranaria denominada HMG-CoA reductasa (E.C. 1.1.1.34). Los datos de la secuenciación del genoma humano muestran que existen al menos 2 isoformas de HMG-CoA reductasa, codificadas por un único gen, localizado en el cromosoma 5 (Luskey y otros, *J Biol Chem.*, 1985 260(18), p.10271-7).

**[0004]** En la piel, el colesterol juega un papel importante en cuanto a la fluidez de las membranas y, en concreto, parece asegurar la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas dentro de las bicapas lipídicas (Martini M.C., *Pathol. Biol.* 2003, (51), p. 267-270). De esta forma, desde el punto de vista fisiológico, el colesterol se sintetiza a un nivel necesario para mantener una homeostasis. Por el contrario, tras una alteración agresiva de la barrera cutánea, se observa un aumento importante y rápido de la síntesis del colesterol, asociado con un aumento de la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa (Menon G.K. y otros, *J. Lipid, Res.*, 1985, (26), P. 418-427).

**[0005]** El papel clave de la HMG-CoA reductasa la ha convertido en un elemento imprescindible para modular la expresión del colesterol en el organismo. Así mismo, se ha desarrollado un tipo de compuestos farmacológicos, denominadas estatinas, destinadas a inhibir la HMG-CoA reductasa con el objetivo de reducir el colesterol circulante. Dicho efecto inhibitorio de las estatinas también es visible en la piel humana. De hecho, la administración experimental de las estatinas por vía tópica altera la función barrera de la piel (Proksch E. y otros, *British J. Dermatol.*, 1993, (128), p. 473-482). Estos resultados confirman la importancia del colesterol en la función barrera epidérmica y el papel central que juega la HMG-CoA reductasa en la modulación de dicha síntesis.

**[0006]** En el transcurso del envejecimiento cutáneo, la integridad de la barrera cutánea y su capacidad de regeneración se ven alteradas. Se observa una deficiencia global de lípidos, dando lugar a una disminución de las multicapas lipídicas del compartimento extracelular de la capa córnea. Dichos cambios funcionales están relacionados con una susceptibilidad acrecentada en las pieles maduras por las agresiones externas (Ghadially R. y otros, *J Clin Invest.*, 1995 (95) (5), p. 2281-90).

**[0007]** Independientemente del envejecimiento intrínseco o fotoinducido, las alteraciones en la barrera cutánea

pueden producirse durante las agresiones externas.

**[0008]** En este contexto, es preferible intentar prevenir la alteración o restablecer la función barrera de la epidermis. En este campo en particular, se ha escrito mucho sobre la aportación directa de los sustitutos lipídicos, como las ceramidas (EP 1272148, US2007576937) o determinados derivados del colesterol (FR 2 789 312). Por otro lado, la utilización de aceites vegetales para activar la síntesis de los lípidos cutáneos también ha sido objetivo de múltiples estudios (EP 1 707 189). En el campo de la cosmética, se ha acudido recurrentemente a la identificación molecular de la HMG-CoA reductasa pero con la finalidad de inhibir esta encima clave; por ejemplo, mediante el uso de estatinas, ya conocidas por sus propiedades inhibitoras de HMGCOA, y así conseguir un efecto antienvjecimiento (EP 0738510). Sin embargo, a día de hoy, ningún documento recoge o describe el objeto de la presente invención; es decir, que un hidrolizado peptídico enriquecido con péptido bioactivo de acuerdo con lo establecido en la presente invención pueda tener propiedades interesantes para reforzar la función barrera cutánea y para estimular la diferenciación epidérmica. Del mismo modo, gracias a esta acción, es posible mejorar determinadas disfunciones patológicas relacionadas con la función barrera (pieles hipersensibles, irritadas, reactivas, eczema atópico).

**[0009]** El objeto principal de la presente invención hace referencia a un hidrolizado peptídico activador de la HMG-CoA reductasa, caracterizado por provenir de la hidrólisis de plantas escogidas entre la espelta (*Triticum monococum*), la patata (*Solanum tuberosum*), el maíz (*Zea mayz L.*), el guisante (*Pisum sativum*) o levaduras del género de las *Saccharomyces*, preferiblemente, de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y por estar compuesto por péptidos con un peso molecular inferior a 6 kDa y enriquecido con péptido bioactivo capaz de reforzar la función barrera de la epidermis. Además, se caracteriza por comprender entre 4 y 6 aminoácidos entre los que, al menos, se incluye un residuo de glicina, un residuo de leucina y un residuo de ácido glutámico, con una secuencia de fórmula general (I):

25



en la que :

X1 es la alanina, la valina, la isoleucina o cualquier aminoácido,

X2 es la serina o la treonina,

X3 es la leucina, la isoleucina o cualquier aminoácido,

elegido entre las secuencias:

(SEQ ID n°1) Ala-Glu-Gly-Leu-Ser-Ile

(SEQ ID n°2) Leu-Gly-Glu-Ser-Leu

(SEQ ID n°3) Val-Gly-Glu-Leu-Thr

(SEQ ID n°4) Ile-Gly-Glu-Leu-Ser

(SEQ ID n°5) Ala-Gly-Glu-Leu-Ser

(SEQ ID n°6) Gly-Glu-Leu-Thr-Ile

(SEQ ID n°7) Gly-Glu-Leu-Ser.

**[0010]** Los inventores han puesto en relieve una actividad cosmética y terapéutica, principalmente dermatológica, de hidrolizados peptídicos que contienen algunos péptidos particulares denominados, en adelante, péptidos bioactivos.

45

**[0011]** Han hecho especial énfasis en que el hidrolizado peptídico, enriquecido con péptido bioactivo, una vez aplicado sobre la piel, refuerza la función barrera de la epidermis y estimula la diferenciación epidérmica. Estas propiedades han demostrado una mejor protección del tejido cutáneo con respecto a las agresiones externas y un aumento de la producción de los lípidos que forman la capa córnea.

50

**[0012]** De acuerdo con la presente invención, se entiende por "péptido bioactivo" una serie de al menos cuatro aminoácidos, unidos entre ellos por medio de enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, que posee una actividad *in vivo* o *in vitro* característica de la actividad del principio activo.

**[0013]** La actividad biológica característica de acuerdo con la presente invención viene definida *in vitro* por la capacidad del péptido de activar la HMG-CoA reductasa, ya sea por el aumento de la síntesis de proteínas de la HMG-CoA reductasa (por modulación directa o indirecta de la expresión genética de la HMG-CoA reductasa), ya sea por el aumento de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa, o por otros procesos biológicos tales como la estabilización de la proteína HMG-CoA reductasa o la estabilización de la transcripción del ARN mensajero.

60

**[0014]** Se entiende por "piel" el conjunto de tejidos de recubrimiento que conforman la piel y las mucosas, en las que se comprenden las faneras (cabello, pestañas, pelos, cejas).

**[0015]** Por "hidrolizado peptídico" se contempla un conjunto de compuestos mayoritariamente representados por

65

péptidos u oligopéptidos. De acuerdo con la presente invención, se utilizarán indistintamente los términos “hidrolizado peptídico” y “principio activo”.

5 **[0016]** Con “compuesto de naturaleza peptídica” se hace referencia a los fragmentos de proteínas, péptidos y aminoácidos libres presentes en el hidrolizado peptídico de acuerdo con la presente invención.

10 **[0017]** Por “aplicación tópica” se entiende el hecho de aplicar o extender el principio activo, de acuerdo con la presente invención, o una composición que lo contenga sobre la superficie de la piel o de una mucosa. Por “fisiológicamente aceptable” se deduce que el hidrolizado peptídico o la composición que lo contenga son apropiados para entrar en contacto con la piel o una mucosa sin causar reacciones tóxicas o de intolerancia.

**[0018]** Según un método de realización de particular interés, el péptido biológicamente activo corresponde a la secuencia SEQ ID n°5.

15 **[0019]** El principio activo puede obtenerse por medio de la extracción de proteínas de origen vegetal o de la levadura, seguida de una hidrólisis controlada que libera los compuestos de naturaleza peptídica, entre los que se encuentran los péptidos bioactivos.

20 **[0020]** La utilización de hidrolizados peptídicos, y en particular los hidrolizados peptídicos de bajo peso molecular, presenta diversas ventajas para el mundo de la cosmética. Además, el hecho de generar compuestos de naturaleza peptídica que no preexisten en el conjunto de proteínas de partida permite que la hidrólisis y la purificación obtengan conjuntos más estables, con mayor facilidad de generalización y que no provoquen reacciones alérgicas en la dermatocosmética.

25 **[0021]** Además, es posible utilizar determinados extractos hidrolizados sin purificar los componentes de naturaleza peptídica correspondientes a los péptidos bioactivos de acuerdo con la presente invención, pero garantizando, no obstante, la presencia de dichos péptidos por medio de los análisis apropiados.

30 **[0022]** Muchas de las proteínas que se encuentran en las plantas y en las levaduras son susceptibles de contener péptidos bioactivos en el seno de su estructura. La hidrólisis controlada permite extraer estos compuestos particulares de naturaleza peptídica. Es posible, aunque no necesario para llevar a cabo la presente invención, extraer primero las proteínas en cuestión y después hidrolizarlas, o realizar la hidrólisis primero sobre un extracto en bruto y después purificar los compuestos de naturaleza peptídica.

35 **[0023]** El principio activo en cuestión proviene de la hidrólisis de proteínas de plantas escogidas, entre las que se encuentra la espelta, la patata, el maíz, el guisante o las proteínas de levaduras del género *Saccharomyces*. Es preferible que las plantas empleadas no hayan sido sometidas a una fermentación previa.

40 **[0024]** Así, la presente invención puede efectuarse utilizando granos de escanda (*Triticum monococcum*), un tipo de trigo diploide muy antiguo que cuenta con un nivel especialmente elevado de proteínas (Vallega 1992).

45 **[0025]** La invención puede emplearse igualmente recurriendo a tubérculos de patata del género *Solanum* y, preferiblemente, de la especie *Solanum tuberosum*. El tubérculo no forma parte de la raíz de la planta sino del tallo enterrado, de donde salen unas ramificaciones irregulares llamadas rizomas, en la extremidad de las cuales se forman los tubérculos.

50 **[0026]** La presente invención también se puede aplicar a los granos de cualquiera de las plantas del género *Zea*, de preferir, de la especie *Zea mays* L. Según la presente invención, el material vegetal utilizado será el grano y, especialmente, el grano limpio tras pasar por un proceso de descascarillado.

55 **[0027]** También es de aplicación con cualquiera de las plantas de la familia de los guisantes (fabáceas). De acuerdo con la invención, se utilizan las plantas de la especie de guisantes *Pisum sativum* L. El término “guisante” designa al grano, rico en proteínas (25 %). Según la invención, el material vegetal utilizado será el grano y, de ser posible, el grano limpio tras pasar por un proceso de descascarillado.

**[0028]** Además, se puede llevar a cabo la presente invención utilizando levaduras del género de las *Saccharomyces*, preferiblemente con la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

60 **[0029]** Se puede emplear cualquier método de extracción o purificación conocido por los expertos con el fin de preparar el hidrolizado según la presente invención.

65 **[0030]** En una primera fase, con la ayuda de un triturador para plantas, se muelen los granos o una parte específica de la planta (hojas, tubérculos, raíces, etc.). Al polvo obtenido se le pueden extraer posteriormente los lípidos con la ayuda de un disolvente orgánico tradicional (como, por ejemplo, el alcohol, el hexano o la acetona).

- 5 **[0031]** Cuando se trata de levaduras, en la primera fase, se cultivan de manera tradicional en un medio adaptado a su desarrollo, preferiblemente en presencia de lactosa. Se recogen por medio de centrifugación para ponerlas posteriormente en suspensión en un tampón químico, al poder ser un tampón fosfato. En la segunda fase, con la ayuda de una prensa francesa o un molino de bolas, se rompen las células, separando la mayoría de los componentes membranaarios insolubles por centrifugación o por filtración.
- 10 **[0032]** Acto seguido, se lleva a cabo la extracción de proteínas siguiendo el método tradicional (Osborne, 1924) modificado; el resultado de la trituración de la planta o de la lisis de las levaduras se pone en suspensión en una solución alcalina que contiene un producto absorbente del tipo polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble (0,01 - 20%); de hecho, se ha observado que las operaciones de hidrólisis y purificación posteriores se han visto facilitadas por este medio. En particular, la concentración de sustancias de tipo fenólicas, interactuando con las proteínas, resulta muy reducida.
- 15 **[0033]** La fracción soluble, que contiene las proteínas, los glúcidos y a veces lípidos, se recoge tras las fases de centrifugación y filtración. Dicha solución bruta se hidroliza a continuación en condiciones controladas para generar péptidos solubles. La hidrólisis se define como una reacción química que implica la división de una molécula por medio de agua, pudiéndose hacer en un medio neutro, ácido o básico. De acuerdo con la presente invención, la hidrólisis se lleva a cabo por vía química y/o de manera ventajosa gracias a las enzimas proteolíticas. De esta forma, se puede citar la utilización de endoproteasas de origen vegetal (papaína, bromelina, ficina) y microorganismos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, etc.). Se eligen las condiciones de la hidrólisis para favorecer el enriquecimiento en péptido activo.
- 20 **[0034]** Por el mismo motivo, es decir, la eliminación de sustancias polifenólicas, se añade una cantidad de polivinilpolipirrolidona al medio reactivo en el transcurso de esta etapa de hidrólisis controlada. Tras la filtración, que permite eliminar las enzimas y los polímeros, el producto filtrado resultante (solución) constituye una primera forma del principio activo de acuerdo con la presente invención.
- 25 **[0035]** El hidrolizado obtenido en este punto puede purificarse nuevamente con el fin de seleccionar las fracciones de bajo peso molecular, preferiblemente inferiores a 6 kDa, y los péptidos generados de acuerdo con su naturaleza. El fraccionamiento se puede producir de manera fructífera por medio de etapas de ultrafiltraciones sucesivas a través de filtros de porosidad decreciente, conservando el producto filtrado en cada etapa y/o por medio de un método de tipo cromatográfico, con el objetivo de enriquecer específicamente el hidrolizado con péptido bioactivo.
- 30 **[0036]** Se procede a una fase de dilución en agua o en cualquier preparado que contenga agua y se esteriliza posteriormente por ultrafiltración para así obtener un hidrolizado peptídico caracterizado por un contenido en proteínas de 0,5 a 5,5 g/l. Dicho hidrolizado peptídico corresponde a la forma más purificada del principio activo de la presente invención.
- 35 **[0037]** El hidrolizado peptídico obtenido según la invención se analiza cuantitativa y cualitativamente a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con lo que se permite analizar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según un gradiente de disolvente apropiado). Las diferentes fracciones peptídicas que se han podido aislar se analizan a continuación por su rendimiento biológico. El análisis se lleva a cabo por espectrometría de masa con tal de identificar concretamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. También se procede con un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.
- 40 **[0038]** El hidrolizado obtenido está formado por péptidos de peso molecular inferior a 6 kDa y enriquecido con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos, entre los que se encuentra, al menos, un residuo de glicina, un residuo de leucina y un residuo de ácido glutámico.
- 45 **[0039]** El segundo objeto de la presente invención hace referencia a una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable y como principio activo capaz de reforzar la función barrera de la epidermis, el hidrolizado peptídico enriquecido con péptido bioactivo, de acuerdo con la presente invención, con una concentración comprendida entre 0,0001 % y 20 % aproximadamente, aunque se prefiere una concentración entre 0,05 % y 5 % con relación al peso total de la composición final.
- 50 **[0040]** De acuerdo con una provechosa realización de la presente invención, el principio activo tal cual se describe se solubiliza en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, tradicionalmente utilizados por los expertos, como el agua, el glicerol, el etanol, el propilenoglicol, el butilenglicol, el dipropilenoglicol, el diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, aceite vegetal o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 55 **[0041]** Según otro modo de realización ventajoso de la presente invención, el principio activo se ha solubilizado
- 60
- 65

previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas, o absorbido sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como los talcos y las bentonitas, y, en general, solubilizados o fijados sobre cualquier vector fisiológicamente aceptable.

5 **[0042]** La composición a utilizar de acuerdo con la presente invención puede consistir en un preparado para el cuidado capilar; principalmente, un champú, un acondicionador, una loción de tratamiento, una crema o gel fijador, una loción reparadora del cabello, una mascarilla, etc. El preparado también puede presentarse en forma de tinte o de mascarilla para aplicar con pincel o peine, para las cejas, pestañas o el pelo.

10 **[0043]** La composición de la invención elegida podrá aplicarse por cualquier vía que se considere apropiada, especialmente oral, parenteral o tópica, y los expertos se encargarán de adaptar la formulación de la composición, especialmente para cosmética o dermatología. Con mayores ventajas, las composiciones de la invención se destinarán a una administración por vía tópica. Por tanto, dichas composiciones deben contener un medio fisiológicamente aceptable, es decir, compatible con la piel y las faneras, y cubrir todas las formas  
15 cosméticas o dermatológicas.

**[0044]** Evidentemente el principio activo de la presente invención se puede utilizar en solitario o bien asociado con otros principios activos.

20 **[0045]** Ventajosamente, las composiciones utilizadas según la presente invención contienen, además, diversos principios activos protectores o con antienvjecimiento, destinados a favorecer y a completar la acción de dicho principio activo. Se pueden citar, entre otros, los siguientes ingredientes: agentes cicatrizantes, antiedad, antiarrugas, calmantes, antirradicales, anti-UV, agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o del metabolismo energético, agentes hidratantes, antibacterianos, fungicidas, antiinflamatorios,  
25 anestésicos, agentes modulantes de la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, agentes estimulantes para el crecimiento de las uñas y el cabello. Es preferible el uso de un agente que presente una actividad antiarrugas, como un agente antirradicales o antioxidante, o un agente estimulante de la síntesis de macromoléculas dérmicas, agente estimulante del metabolismo energético o inhibidor de la metaloproteinasas.

30 **[0046]** Por ejemplo, se pueden añadir otros principios activos con una acción antirradicales o antioxidantes, elegidos entre la vitamina C, vitamina E, la coenzima Q 10 y los extractos polifenólicos de plantas, los retinoides.

35 **[0047]** La composición de la presente invención puede asociarse al principio activo según la invención o a otros principios activos que estimulen la síntesis de las macromoléculas dérmicas (laminina, fibronectina y colágeno) como, por ejemplo, los péptidos de colágeno comercializados bajo el nombre "Collaxyl®", de los laboratorios Vincience.

40 **[0048]** La composición según la invención se puede asociar, a su vez, al principio activo de la invención o a otros principios activos que estimulan el metabolismo energético, como el principio activo comercializado bajo el nombre "GP4G®", de los laboratorios Vincience.

**[0049]** Claramente la invención está dirigida a los mamíferos en general y a los seres humanos en particular.

45 **[0050]** Dichas composiciones podrán presentarse especialmente en forma de solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa, o de emulsión de aceite-en-agua, de agua-en-aceite o emulsiones múltiples. También pueden tomar forma de cremas, suspensiones o incluso polvos, adecuados para la aplicación sobre la piel, mucosas, labios y/o faneras. Dichas composiciones podrán ser más o menos fluidas y presentar un aspecto de crema, loción, leche, sérum, pomada, gel, pasta o mousse. También pueden presentarse en forma sólida, como una barra, o aplicarse sobre la piel por medio de un aerosol. Pueden comercializarse como productos de cuidados y/o  
50 maquillaje para la piel.

55 **[0051]** Estas composiciones incluyen, además, cualquier aditivo utilizado habitualmente en el campo de la aplicación prevista así como los aditivos necesarios para su formación, como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, otros principios activos cosméticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc.

60 **[0052]** En todos los casos, los expertos se asegurarán de que estos aditivos así como sus proporciones se elijan de modo que no afecten a las propiedades ventajosas de la composición según la presente invención. Estos aditivos pueden, por ejemplo, corresponder a una concentración que va del 0,01 al 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición de la presente invención se presenta en forma de emulsión, la fase grasa puede representar del 5 al 80 % del peso, aunque se prefiere un peso del 5 al 50 % con referencia al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición serán  
65 seleccionados entre los utilizados tradicionalmente en el campo. Por ejemplo, se pueden utilizar en una

cantidad que va del 0,3 al 30 % en peso con respecto al peso total de la composición.

**[0053]** La invención tiene por tercer objeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico según la presente invención, en forma de medicamento. Por ejemplo, la composición farmacéutica podrá destinarse a prevenir o tratar patologías características por una alteración de la función barrera, como las pieles hipersensibles, irritadas, reactivas y con eczema atópico.

**[0054]** Según esta realización de la presente invención, las composiciones serán apropiadas para una administración oral en un uso farmacéutico. Así pues, las composiciones podrán comercializarse en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, masticables, polvos para ser consumidos como tales o para mezclar extemporáneamente con un líquido, jarabe, gel, y cualquier otra forma conocida por el experto. Estas composiciones contendrán, además, cualquier aditivo ampliamente utilizado en el campo de aplicación contemplado, así como los aditivos necesarios para su formulación, entre los que se encuentran disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, otros principios activos farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, etc.

**[0055]** Como cuarto objeto, la invención presenta un uso cosmético, con una composición con una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico según la invención como principio activo activador de la HMG-CoA reductasa humana, para reforzar la función barrera de la epidermis y estimular la diferenciación epidérmica.

**[0056]** Por “cantidad eficaz” del principio activo se entiende la cantidad necesaria para obtener el resultado buscado; a saber, activar la HMG-CoA reductasa con el fin de mejorar la función barrera de la epidermis y estimular la diferenciación epidérmica.

**[0057]** Por “reforzar la función barrera cutánea y estimular la diferenciación epidérmica” se comprende la mejora de la capacidad de protección de la capa córnea y el aumento de la expresión de los marcadores biológicos de diferenciación, como las queratinas.

**[0058]** De esta forma, dicho principio activo, gracias a las propiedades que lo caracterizan, podrá utilizarse formando parte de una composición cosmética destinada a reforzar la función barrera cutánea y a estimular la diferenciación epidérmica.

**[0059]** Por otro lado, el hidrolizado peptídico podrá utilizarse con grandes ventajas como principio activo en una composición cosmética destinada a luchar de manera preventiva y/o curativa contra los signos del envejecimiento cutáneo y, en especial, contra el envejecimiento cutáneo fotoinducido (fotoenvejecimiento). Por “signos cutáneos de envejecimiento o fotoenvejecimiento” se entiende tanto cualquier modificación en el aspecto exterior de la piel y las faneras debida al envejecimiento, como las rugosidades superficiales de la capa córnea, las arrugas y patas de gallo, o cualquier modificación interna de la piel que no se traduzca sistemáticamente en un aspecto exterior modificado, como, por ejemplo, reducción de la epidermis o cualquier degradación interna de la piel consecutiva a una exposición de los rayos ultravioletas (UV).

**[0060]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el hidrolizado peptídico podrá utilizarse positivamente como principio activo en una composición cosmética destinada a proteger la piel contra cualquier agresión externa.

**[0061]** En la expresión “agresión externa” se engloban las agresiones que puede causar el medio ambiente. Por ejemplo, se pueden citar las agresiones provocadas por la contaminación y los rayos UV; por productos irritantes como los tensioactivos, los conservantes o los perfumes; y por agresiones mecánicas, como las abrasiones, el afeitado o la depilación. Con “contaminación” se hace referencia tanto a la contaminación “externa” causada por las partículas de diésel, ozono o metales pesados, como a la contaminación “interna”, debida especialmente a las emisiones de disolventes de pinturas, colas y papeles pintados (como el tolueno, estireno, xileno o benzaldehído), o incluso al humo del tabaco. La sequedad del ambiente también es una causa a considerar como agresión cutánea. Dichas agresiones exteriores desembocan en alteraciones de la función barrera que se traducen en malestar cutáneo y fenómenos sensoriales desagradables, como tirantez, picor, fragilidad excesiva o rojeces.

**[0062]** En particular, la invención tiene por objeto la utilización cosmética del hidrolizado tal y como en ella se establece con una composición destinada a prevenir o tratar los daños causado en la piel por las agresiones externas, tales como los tratamientos mecánicos (afeitado o depilación), las limpiezas intensas con detergentes, las condiciones climáticas extremas o las variaciones bruscas de temperatura y de humedad en el aire.

**[0063]** Como quinto objeto, la presente invención presenta un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a prevenir y/o luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y/o fotoenvejecimiento, según el cual se aplica una composición con una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico según la invención sobre las zonas a tratar.

**[0064]** Las realizaciones particulares de este procedimiento de tratamiento cosmético se corresponden igualmente a la descripción anterior. Otras ventajas y características de la invención se presentarán mejor ilustradas en la lectura de los ejemplos aportados a título ilustrativo que no restrictivo.

5

#### **Listado de figuras**

#### **[0065]**

- 10 - La Figura 1 muestra un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de espelta.  
 - La Figura 2 recoge un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de patata.  
 15 - La Figura 3 ilustra un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de maíz.  
 - La Figura 4 presenta un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de guisante.  
 - La Figura 5 dibuja un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de soja.  
 20 - La Figura 6 dispone un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC, marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo de un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **Ejemplo 1 : Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de espelta (*Triticum monococcum*)**

25 **[0066]** Los granos de espelta (*Triticum monococcum*) se introducen en una solución de 10 volúmenes de agua en presencia de un 2 % de POLYCAR® 10 (polivinilpirrolidona – PVPP – insoluble). El preparado se ajusta a un pH comprendido entre 6 y 8 con una solución acuosa de sosa 1M.

30 **[0067]** Una vez ajustado el pH, se añade una amilasa (hasidase®) y una proteasa (papaína al 2%) en el medio reactivo. Tras dos horas de agitación a 50°C se obtiene la hidrólisis. A continuación, se procede a la inactivación de la enzima calentando la solución a 80°C durante 2 horas. Tras la centrifugación, se obtendrá la solución acuosa resultante correspondiente a un hidrolizado en bruto de espelta. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.

35

**[0068]** El procedimiento de purificación del hidrolizado en bruto comienza con filtraciones sucesivas con la ayuda de un filtro de placas Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución brillante y clara, calificada como hidrolizado 1.

40 **[0069]** En esta fase, el hidrolizado 1 de espelta se caracteriza por un color amarillo claro y por un extracto seco de 20 a 25 g/kg, con un nivel de proteínas de 10 a 12 g/l y de azúcares de 5 a 8 g/l.

45 **[0070]** La naturaleza proteica del hidrolizado 1 se refleja tras un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico de espelta se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes dentro de un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Se añade una solución de NuPAGE® Antioxidante a la cubeta (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. El desplazamiento de las proteínas se realiza dentro de un tampón de desplazamiento NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador del peso molecular. La coloración de las proteínas se lleva a cabo gracias al Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observa una banda de 24 kDa, correspondiente a la enzima, así como proteínas inferiores a 6 kDa.

50 **[0071]** Seguidamente, el hidrolizado 1 se purifica por medio de ultrafiltración con la ayuda del cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa para así eliminar cualquier rastro de enzimas. Una vez finalizado el proceso de purificación, se obtiene un hidrolizado peptídico amarillo-naranja, brillante y claro. Se procede a una fase de dilución para obtener un hidrolizado peptídico caracterizado por un contenido en proteínas de 1,5 a 3,5 g/l. El hidrolizado peptídico corresponde al principio activo según la invención. Posteriormente, dicho hidrolizado peptídico se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del hidrolizado es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mn), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa en las siguientes condiciones:

Un gradiente de metanol:

65 - Columna Uptisphere OPB 125 x 3 mm



- Disolvente A: agua grado HPLC con 0,1% de ácido heptafluorobutírico (HFBA)
- Disolvente B: metanol grado HPLC
- Gradiente: del 100 al 40 % de disolvente A durante 13 minutos, después del 40 al 10 % 5 minutos.

5 **[0072]** En estas condiciones cromatográficas, es posible aislar más fracciones peptídicas. Un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución) se recoge en la Figura 1, en la que se muestra el pico correspondiente al péptido bioactivo.

10 **[0073]** Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.

15 **[0074]** También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato).

**[0075]** En la siguiente tabla se recoge un ejemplo de composición de aminoácidos del hidrolizado (en %):

20

25

30

35

40

45

Aminoácidos	%
Alanina	3,1
Ácido aspartico	4,7
Arginina	3,1
Ácido glutámico	32,8
Glicina	3,1
Histidina	< 3,0
Isoleucina	< 5,5
Leucina	6,2
Lisina	< 2,2
Fenilalanina	4,5
Prolina	10,9
Serina	4,7
Treonina	3,1
Tirosina	< 3,6
Valina	4,7
Triptofano	< 1,5

50 **Ejemplo 2: Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de tubérculos de la especie *Solanum tuberosum***

55 **[0076]** Los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) se colocan en una dilución de 10 volúmenes de agua junto con un 2 % de POLYCAR® 10 (polivinilpirrolidina – PVPP – insoluble). El preparado se ajusta a un pH comprendido entre 6 y 8 con una solución acuosa de sosa 1M. Después se lleva a cabo una precipitación en un medio ácido. El residuo se introduce en la solución, se ajusta el pH y se añade papaína al 2 % en el medio reactivo. Tras dos horas de agitación a 55°C se obtiene la hidrólisis y se procede a la inactivación de la enzima calentando la solución a 80°C durante dos horas. Tras la centrifugación, se obtendrá la solución acuosa resultante correspondiente a un hidrolizado en bruto de patata. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.

60 **[0077]** El procedimiento de purificación del hidrolizado en bruto comienza con filtraciones sucesivas con la ayuda de un filtro de placas Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución amarilla brillante y clara, calificada como hidrolizado 1.

65

**[0078]** En esta fase, el hidrolizado 1 de patata se caracteriza por un extracto seco de 40 a 60 g/kg, con un nivel de proteínas de 20 a 25 g/l y de azúcares de 1 a 3 g/l.

**[0079]** La naturaleza proteica del hidrolizado 1 se refleja tras un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico de patata se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes dentro de un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Se añade una solución de NuPAGE® Antioxidante a la cubeta (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. El desplazamiento de las proteínas se realiza dentro de un tampón de desplazamiento NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador del peso molecular. La coloración de las proteínas se lleva a cabo gracias al Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observa que el peso molecular de las proteínas obtenidas es inferior a 6 kDa.

**[0080]** Seguidamente, el hidrolizado 1 se purifica con el objetivo de conservar únicamente los péptidos con un peso molecular inferior a 5 kDa con la ayuda de un filtro de flujo tangencial. Para ello, se bombea a presión el hidrolizado 1 a través de un soporte Pellicon® equipado con un cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Una vez finalizado el proceso de purificación, se obtiene un hidrolizado peptídico brillante y claro. Se procede a una fase de dilución para obtener un hidrolizado peptídico caracterizado por un contenido en proteínas de 3,5 a 5,5 g/l. El hidrolizado peptídico corresponde al principio activo según la invención. Posteriormente, dicho hidrolizado peptídico se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del hidrolizado es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según condiciones idénticas al ejemplo 1). En estas condiciones cromatográficas, se han podido aislar varias fracciones peptídicas.

**[0081]** Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.

**[0082]** La Figura 2 presenta un ejemplo de cromatografía obtenida por HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución) marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo.

**[0083]** También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato).

**[0084]** En la siguiente tabla se recoge un ejemplo de composición de aminoácidos del hidrolizado (en %):

Aminoácidos	%
Alanina	7,8
Ácido aspartico	20,1
Arginina	7,3
Ácido glutámico	17,4
Glicina	7,3
Histidina	3,2
Isoleucina	9,1
Leucina	15,1
Lisina	11,4
Fenilalanina	8,7
Prolina	7,7
Serina	8,7
Treonina	9,1
Tirosina	8,2
Valina	10,5
Triptofano	1,4

**Ejemplo 3: Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de turtó de maíz (*Zae mays L.*)**

- 5 **[0085]** El turtó de maíz (*Zae mays L.*) se introduce en una solución de 10 volúmenes de agua en presencia de un 2 % de POLYCAR® 10 (polivinilpirrolidona – PVPP – insoluble). El preparado se ajusta a un pH comprendido entre 6 y 8 con una solución acuosa de sosa 1M.
- 10 **[0086]** Una vez ajustado el pH, se añade papaína al 2% en el medio reactivo. Tras dos horas de agitación a 55°C se obtiene la hidrólisis. A continuación, se procede a la inactivación de la enzima calentando la solución a 80°C durante 2 horas. Tras la centrifugación, se obtendrá la solución acuosa resultante correspondiente a un hidrolizado en bruto de maíz. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.
- 15 **[0087]** El procedimiento de purificación del hidrolizado en bruto comienza con filtraciones sucesivas con la ayuda de un filtro de placas Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución amarilla, brillante y clara, calificada como hidrolizado 1.
- 20 **[0088]** En esta fase, el hidrolizado 1 de maíz se caracteriza por un extracto seco de 20 a 30 g/kg, con un nivel de proteínas de 20 a 25 g/l y de azúcares de 2 a 5 g/l.
- 25 **[0089]** La naturaleza proteica del hidrolizado 1 se refleja tras un análisis por electroforesis en gel de poli-acrilamida NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico de maíz se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturizantes dentro de un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Se añade una solución de NuPAGE® Antioxidante a la cubeta (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. El desplazamiento de las proteínas se realiza dentro de un tampón de desplazamiento NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador del peso molecular. La coloración de las proteínas se lleva a cabo gracias al Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observa que el peso molecular de las proteínas obtenidas es inferior a 6 kDa.
- 30 **[0090]** Seguidamente, el hidrolizado 1 se purifica con el objetivo de eliminar las proteínas de alto peso molecular por medio de ultrafiltración con la ayuda de un cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa con el fin de conservar únicamente los compuestos de naturaleza peptídica inferiores a 5 kDa.
- 35 **[0091]** Tras esta purificación final, se procede a una fase de dilución para obtener un hidrolizado peptídico caracterizado por un contenido en proteínas de 3,5 a 5,5 g/l. El hidrolizado peptídico corresponde al principio activo según la invención.
- 40 **[0092]** Posteriormente, dicho hidrolizado peptídico se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del hidrolizado es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según condiciones idénticas al ejemplo 1). En estas condiciones cromatográficas, se han podido aislar varias fracciones peptídicas.
- 45 **[0093]** La Figura 3 presenta un ejemplo de cromatografía obtenida por HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución) marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo.
- 50 **[0094]** Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.
- 55 **[0095]** También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato). En la siguiente tabla se recoge un ejemplo de composición de aminoácidos del hidrolizado (en %):
- 60
- 65

Aminoácidos	%
Alanina	9,4
Ácido aspartico	7,2
Arginina	3,6
Ácido glutámico	23,7
Glicina	3,6
Histidina	2,2
Isoleucina	4,5
Leucina	16,1
Lisina	2,2
Fenilalanina	6,7
Prolina	10,3
Serina	6,3
Treonina	4,0
Tirosina	5,8
Valina	5,4
Triptofano	<0,5

#### **Ejemplo 4: Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de guisante (*Pisum sativum L.*)**

**[0096]** El hidrolizado peptídico se obtiene a partir de un extracto de plantas de la especie *Pisum sativum L.* Obviamente, el extracto se puede preparar a partir de plantas de cualquiera de las numerosas variedades y especies del género *Pisum*.

**[0097]** En una primera fase, se extraen los lípidos de 1 kg de guisantes sin piel mediante un disolvente orgánico: el hexano.

**[0098]** La harina de guisante obtenida se introduce en una solución de 10 volúmenes de agua en presencia de un 2 % de POLYCAR® 10 (polivinilpirrolidona – PVPP – insoluble). El preparado se ajusta a un pH comprendido entre 6 y 7 con una solución acuosa de sosa 1M.

**[0099]** Una vez ajustado el pH, se añade un 2% de flavourzym® al medio reactivo. Tras dos horas de agitación a 50°C se obtiene la hidrólisis. A continuación, se procede a la inactivación de la enzima calentando la solución a 80°C durante 2 horas. El preparado resultante corresponde al extracto de guisante. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.

**[0100]** El procedimiento de purificación del hidrolizado en bruto comienza con filtraciones sucesivas con la ayuda de un filtro de placas Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución brillante y clara. En esta fase, el hidrolizado de guisante se caracteriza por un extracto seco de 70-80 g/kg, un nivel de proteínas de 55 a 65 g/l, azúcares de 2 a 5 g/l y polifenol de 1 a 3 g/l.

**[0101]** La naturaleza proteica del hidrolizado 1 se refleja tras un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida. Para este tipo de análisis, se recurre a los geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico de guisante se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturantes dentro de un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Se añade una solución de NuPAGE® Antioxidante a la cubeta (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. El desplazamiento de las proteínas se realiza dentro de un tampón de desplazamiento NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador del peso molecular. La coloración de las proteínas se lleva a cabo gracias al Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observan dos grandes familias de proteínas: una corresponde a las proteínas de peso molecular de 25 a 20 kDa y en la otra familia presentan un peso molecular inferior a 5 kDa.

[0102] Dicha solución se purifica para eliminar las proteínas con un peso molecular superior a 5 kDa con la ayuda de filtro de flujo tangencial.

[0103] Para ello, se bombea a presión el hidrolizado de guisante a través de un soporte Pellicon® equipado con un cassette Pellicon® 30 Biomax 5 kDa. Este primer filtrado se recupera para filtrarse nuevamente por otro cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Al finalizar la purificación, se obtiene un hidrolizado peptídico de guisante amarillo-beige, brillante y claro. Se caracteriza por un extracto seco de 50 a 55 g/kg, con un nivel de proteínas de 50 a 52 g/l.

[0104] Posteriormente, dicha solución se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del extracto de guisante es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según el gradiente de disolvente apropiado, idéntico al ejemplo 1). En estas condiciones cromatográficas, se han podido aislar varias fracciones peptídicas.

[0105] Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo. La Figura 4 presenta un ejemplo de cromatografía obtenida por HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución) marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo.

[0106] También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato).

#### **Ejemplo 5: Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de turtó de soja (*Glycine Max. L.*)**

[0107] El principio activo se obtiene a partir de plantas de la especie *Glycine max L.* Obviamente, el extracto se puede preparar a partir de plantas de cualquiera de las numerosas variedades y especies del género *Glycine*. Los turtós conforman residuos sólidos obtenidos tras la extracción de aceite de los granos de soja. Representan del 50 al 75 % de la masa de los granos.

[0108] En una primera fase, se muele 1 kg de turtó de soja en un triturador de cereales. A la harina obtenida se le extraen los lípidos por medio de un disolvente orgánico, el hexano. Tras la filtración y el secado al vacío, la harina obtenida se pone en suspensión en una solución acuosa alcalina (dilución 1/10) pH 10 y con un 1 % de polivinilpirrolidona (Polycar V ISP). El preparado se agita durante el tiempo suficiente para permitir que se solubilizan las fracciones solubles. La temperatura de extracción variará (entre 4 y 80°C), aunque se prefiere que la operación se realice en frío. Tras esta fase de extracción, el medio se clarifica por medio de la centrifugación y después se filtra en un filtro de placas. Dicho filtrado, que contiene fracciones solubles de la soja, se somete después a una precipitación de proteínas haciendo variar la fuerza iónica del medio neutro o ácido, lo que permite eliminar los componentes glucídicos solubles, los lípidos y los ácidos nucleicos. El medio se establece en un pH 3,5. El resto flotante se elimina y el precipitado se lava con la ayuda de un disolvente como el etanol o el metanol, que posteriormente se evapora durante el secado al vacío.

[0109] En esta fase, se obtienen alrededor de 50 gramos de polvo de color amarillo claro de extracto proteico bruto, que contiene:

- Proteínas: 75 %
- Glúcidos: 20 %
- Lípidos 5 %

[0110] El precipitado rico en proteínas se introduce nuevamente en agua o en otro disolvente.

[0111] El extracto proteico en bruto se somete a una serie de hidrólisis controladas y selectivas, en concreto, hidrólisis químicas y enzimáticas, en presencia de un 0,5 % de PVPP (Polycar V) y de endopeptidasas de cisteína (papaína, ficina). Tras la reacción, el hidrolizado se filtra por placas y después mediante un cartucho esterilizante (0,2 µm).

[0112] Así pues, se obtiene un hidrolizado de color claro, con un extracto seco de 15 a 30 g/l, que se diluye, por el método de Lowry, de manera que la concentración de compuestos de naturaleza peptídica determinada se encuentre entre el 0,1 y 5 g/l, aunque preferiblemente entre 0,5 y 2 g/l. El análisis fisicoquímico del hidrolizado peptídico, que forma el principio activo, muestra que su pH se encuentra entre 4 y 7 (de preferir, entre 5 y 6), el extracto seco entre 1 y 8 g/l (de preferir, entre 2 y 5 g/l), el contenido de compuestos de naturaleza peptídica entre 0,1 y 5 g/l (de preferir, entre 0,5 y 2 g/l) y el contenido en azúcares entre 0,5 y 2,5 g/l. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos

conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.

[0113] A continuación, se procede a una ultrafiltración de la solución con un cartucho de filtración Millipore Helicon (umbral de corte 1 kDa). Se descartan los altos pesos moleculares contenidos en el remanente y se conserva el filtrado.

[0114] Posteriormente, dicha solución se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del hidrolizado de soja es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según el gradiente de disolvente apropiado, idéntico al ejemplo 1). En estas condiciones cromatográficas, se han podido aislar varias fracciones peptídicas.

[0115] Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo. La Figura 5 presenta un ejemplo de cromatografía obtenida por HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución) marcando el pico correspondiente al péptido bioactivo.

[0116] También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato).

[0117] Una variante del protocolo consiste en llevar a cabo una purificación del principio activo, obtenido según el protocolo anterior, mediante una cromatografía de intercambio iónico, con una columna TSK gel (TosoHaas) y con un tampón de fosfato pH7, con el objetivo de enriquecer el hidrolizado peptídico con péptido bioactivo.

#### **Ejemplo 6: Preparación de un hidrolizado peptídico a partir de levaduras *Saccharomyces cerevisiae***

[0118] El hidrolizado peptídico se obtiene a partir de un extracto de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Dichas levaduras se cultivan en un medio adaptado para su desarrollo, especialmente en presencia de lactosa, para después centrifugarlas y recuperar una biomasa. La biomasa de *saccharomyces* se introduce en una solución de 10 volúmenes de agua en presencia de un 2 % de POLYCAR® 10 (polivinilpirrolidona – PVPP – insoluble) y un 0,2 % de carbón activo. El preparado se ajusta a un pH comprendido entre 6 y 7,5 con una solución acuosa de sosa 1M.

[0119] Una vez ajustado el pH, se añade un 2% de papaína en el medio reactivo. Tras dos horas de agitación a 55°C se obtiene la hidrólisis. A continuación, se procede a la inactivación de la enzima calentando la solución a 80°C durante 2 horas. Tras la centrifugación, el preparado reactivo corresponde al extracto de *saccharomyces* obtenido. Las condiciones de la hidrólisis se elegirán de forma que permitan un enriquecimiento con péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos conteniendo residuos de glicina, leucina y ácido glutámico.

[0120] El procedimiento de purificación del hidrolizado en bruto comienza con filtraciones sucesivas con la ayuda de un filtro de placas Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución brillante y clara. En esta fase, el extracto de *saccharomyces* se caracteriza por un extracto seco de 25-35 g/kg, un nivel de proteínas de 10 a 15 g/l y de azúcares de 5 a 10 g/l.

[0121] La naturaleza proteica de dicho extracto se refleja tras un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida. Para este tipo de análisis, se recurre a los geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado proteico se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes dentro de un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Se añade una solución de NuPAGE® Antioxidante a la cubeta (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. El desplazamiento de las proteínas se realiza dentro de un tampón de desplazamiento NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador del peso molecular. La coloración de las proteínas se lleva a cabo gracias al Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observan tres grandes familias de proteínas: la primera corresponde a las proteínas de peso molecular superior a 75 kDa, la segunda familia a proteínas entre 20 y 25 kDa y la otra familia con peso molecular inferior a 5 kDa.

[0122] Dicha solución se purifica para eliminar las proteínas con un peso molecular superior a 5 kDa con la ayuda de filtro de flujo tangencial.

[0123] Para ello, se bombea a presión el hidrolizado de *saccharomyces* a través de un soporte Pellicon® equipado con un cassette Pellicon® 2 Biomax 50 kDa. Este primer filtrado se recupera para filtrarse nuevamente por un cassette Pellicon® 2 Biomax 10 kDa. Este segundo filtrado, se vuelve a pasar una última vez por un cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Al finalizar la purificación, se obtiene un extracto vegetal de *saccharomyces* beige, brillante y claro. Se caracteriza por un extracto seco de 35 a 45 g/kg, con un nivel de proteínas de 30 a 40

g/l.

[0124] Posteriormente, dicha solución se analiza a través de cromatografía líquida de alta resolución con la ayuda del aparato HP1100 gestionado por el sistema informático ChemStation. La columna utilizada para la elución del extracto de guisante es una Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), que permite cromatografiar las proteínas con un peso molecular de 0,2 a 25 kDa (según el gradiente de disolvente apropiado, idéntico al ejemplo 1). En estas condiciones cromatográficas, se han podido aislar varias fracciones peptídicas.

[0125] Estas fracciones se analizan a continuación por espectrometría de masa para así identificar detalladamente el contenido de aminoácidos de los péptidos de cada pico. De la misma forma, se lleva a cabo un análisis de secuencia para determinar la secuencia peptídica del péptido bioactivo.

[0126] También se procede a la determinación de la composición de aminoácidos del principio activo según la presente invención. Se lleva a cabo tras la hidrólisis ácida y la identificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución y con la ayuda de una prederivación al PICT (fenilisotiocianato).

#### **Ejemplo 7: Estudio ultraestructural de cuerpos laminados en queratinocitos humanos tratados por el hidrolizado según el ejemplo 1**

[0127] El objetivo de este estudio es investigar de manera ultraestructural, a través de microscopio electrónico de transmisión, los queratinocitos tratados con el hidrolizado según el ejemplo 1 al un 1 %.

[0128] **Protocolo:** Los queratinocitos humanos normales en cultivo se tratan con una solución al 1 % del hidrolizado, según el ejemplo 1, durante 48 horas (el medio en presencia del activo se cambia cada 24 h). Las células se lavan en un PBS, se fijan por fijación hipertónica de Karnofsky (4% paraformaldehído, 5% glutaraldehído, en un tampón fosfato 0,08M) durante 1 hora a temperatura ambiente y, después, 24 horas a 4°C. Las células se liberan mediante raspado y se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm. El resultante flotante se elimina y se coloca un tampón de calcodilato de sodio 1M sobre el residuo. Se mezclan las células con un 2% de agar y se fijan posteriormente con tétroxido de osmio 1 hora. Se deshidratan los ejemplares mediante pasajes sucesivos en alcohol (50 a 100 %). A continuación, se cubren las células con una resina. La polimerización se lleva a cabo durante 12 horas a 60°C. Mediante el ultramicrotomo se realizan unas secciones semifinas de 0,5 µm. Dichas secciones se colocan sobre una lámina adherida con calor y coloreada de azul de toluidina. Después, se deshidratan nuevamente las láminas y se colocan en el medio adecuado. Una vez elegida la zona de estudio óptimo, el bloque se corta a la medida deseada y se realizan secciones ultrafinas, con un color "gris-plata" y las dimensiones deseadas, que se colocan en el microscopio electrónico doblemente marcadas gracias al uranil acetato y el citrato de plomo, y se examinan por el microscopio de transmisión a 60 u 80 KV.

[0129] **Resultados:** El estudio ultraestructural muestra que el aparato de Golgi está algo más desarrollado que en las células testigo. Este aumento va ligado a una superproducción de cuerpos laminados (o cuerpos de Odland) que marcan el aumento de la síntesis lipídica.

[0130] **Conclusiones:** El hidrolizado según el ejemplo 1 al 1 % es capaz de producir un aumento de la síntesis lipídica en los queratinocitos humanos normales.

#### **Ejemplo 8: Estudio ultraestructural de "caveolas" en fibroblastos humanos tratados con el hidrolizado según el ejemplo 2**

[0131] El objetivo de este estudio es investigar a nivel ultraestructural las caveolas en los fibroblastos dérmicos humanos.

[0132] **Protocolo:** Los fibroblastos dérmicos humanos normales en cultivo se tratan con el hidrolizado según el ejemplo 2 al 1 % durante 48 h (el medio que contiene el activo se cambia cada 24 h).

[0133] **Resultados:** el estudio ultraestructural muestra un aumento importante de caveolas en las células tratadas por el hidrolizado según el ejemplo 2 al 1 %, en comparación con las células testigo no tratadas. Estos resultados muestran un efecto positivo del principio activo puesto que las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que permiten la externalización de moléculas como el colesterol.

[0134] **Conclusión:** El hidrolizado según el ejemplo 2 al 1 % produce el aumento de estructuras membranas de externalización del colesterol.

#### **Ejemplo 9: Estudio de la diferenciación de queratinocitos humanos tratados con el hidrolizado según el ejemplo 2**

[0135] La finalidad del este estudio es determinar la influencia del hidrolizado según el ejemplo en la

diferenciación epidérmica y, más en concreto, en la expresión del conjunto de citoqueratinas (o panqueratinas), marcadores de la diferenciación queratinocitaria.

**[0136] Protocolo:** Los queratinocitos humanos normales en cultivo se tratan con el hidrolizado según el ejemplo 2 al 1% durante 48 horas (el medio en presencia del activo se cambia cada 24 horas). A continuación, se lavan las células y se fijan con metanol frío durante 4 minutos a 4°C. Se incuban en presencia de un anticuerpo anticitopanqueratinas monoclonal al 1/200 durante 1 hora a temperatura ambiente; después, con un segundo anticuerpo a 1/50 durante 1 hora a temperatura ambiente, junto con un marcador fluorocromo "Alexa 288". Tras el ensamblaje en un medio *ad hoc*, se observan las láminas con el microscopio de epifluorescencia.

**[0137] Resultados:** El hidrolizado según el ejemplo 2 aumenta la expresión de panqueratinas en las células tratadas.

**[0138] Conclusión:** El hidrolizado según el ejemplo 2 aumenta la expresión de las citoqueratinas en los queratinocitos humanos normales. En presencia de dicho hidrolizado según el ejemplo 2, se estimulan las células en vista a la diferenciación.

#### **Ejemplo 10: Estudio del efecto protector del hidrolizado según el ejemplo 2 sobre células cutáneas sometidas a los rayos ultravioleta (UVB)**

**[0139]** El objetivo de este estudio radica en determinar el efecto protector del hidrolizado según el ejemplo 2 con respecto a los queratinocitos humanos normales sometidos a un estrés causado por los rayos UVB. Para ello, se llevan a cabo pruebas de viabilidad celular por la técnica del MTT.

**[0140] Protocolo:** Los queratinocitos humanos normales se tratan con el hidrolizado según el ejemplo 2 al 0,5 % durante 24 horas, irradiados por rayos UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>), con un posterior cultivo de 24 horas en presencia de la misma concentración del hidrolizado según el ejemplo 2. También se llevan a cabo, en las mismas condiciones, controles no tratados e irradiados. Al final del experimento, las células se incuban en una solución con 0,1 mg/ml de MTT (3-[4, 5-dimetiltiazol- 2-yl]-2, 5-difeniltetrazolio, bromuro). Las células vivas absorben dicho compuesto, después lo metabolizan a través de las enzimas mitocondriales en un compuesto azul violeta, el formazán, que se dosificará por espectrometría a 540 nm. Así, la densidad óptica (D.O.) es directamente proporcional a la actividad enzimática mitocondrial, así como al número de células vivas.

**[0141] Resultados:** La evaluación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTT muestra que el hidrolizado según el ejemplo 2 aumenta la viabilidad celular tras la irradiación de los UVB al 16 %.

**[0142] Conclusión:** El hidrolizado según el ejemplo 2 al 0,5% aumenta la viabilidad celular y protege eficazmente las células cutáneas contra los efectos citotóxicos de los rayos UVB.

#### **Ejemplo 11: Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa en las biopsias de piel, en presencia del hidrolizado según el ejemplo 1**

**[0143]** El objetivo de este estudio reside en determinar la influencia del hidrolizado según el ejemplo 1 al 0,5% en la expresión de la HMG-CoA reductasa.

**[0144] Protocolo:** Se toman muestras de piel humana que se ponen en cultivo en la interfaz aire-líquido. Se aplica el hidrolizado del ejemplo 1 al 0,5% para, posteriormente, incubar las muestras durante 24 o 48 horas.

**[0145]** A continuación, se fijan dichas muestras de piel con un formaldehído incluido en la parafina y, después, se llevan a cabo secciones de 2 a 3 µm. Se realiza el inmunomarcado tras el desenmascarado de lugares específicos por medio de un tratamiento de microondas e incubación en tripsina. Dicho inmunomarcado se lleva a cabo con la ayuda de un anticuerpo policlonal de conejo específico de la HMG-CoA reductasa (Millipore, Upstate), para posteriormente utilizar un anticuerpo secundario junto con un marcador fluorescente. Las secciones de piel se examinan con un microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

**[0146] Resultados:** Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia más fuerte en las secciones superiores de la epidermis de pieles tratadas con el hidrolizado según el ejemplo 1 al 0,5% con respecto al control no tratado.

**[0147] Conclusión:** El hidrolizado según el ejemplo 1 estimula la expresión de la HMG-CoA reductasa en las capas superiores de la epidermis.



**Ejemplo 12: Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa en los queratinocitos humanos normales, en presencia del hidrolizado según el ejemplo 2**

[0148] El estudio tiene como objetivo determinar la influencia del hidrolizado según el ejemplo 2 sobre la expresión de la HMG-CoA reductasa en los queratinocitos humanos normales.

[0149] Protocolo: Los queratinocitos humanos normales en cultivo se tratan con el hidrolizado según el ejemplo 2 al 0,5% durante 24 o 48 horas (el medio que contiene el activo se cambia cada 24 horas). Posteriormente, se lavan las células y se fijan con metanol frío durante 4 minutos a 4°C. Se incuban las células en presencia de un anticuerpos policlonal de conejo específico de la HMG-CoA reductasa (Millipore, Upstate), para posteriormente utilizar un anticuerpo secundario junto con un marcador fluorescente. Las células se examinan con un microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E600).

[0150] Resultados: Las observaciones microscópicas muestran una fluorescencia citoplasmática más intensa en las células tratadas con el hidrolizado según el ejemplo 2 al 0,5%.

[0151] Conclusión: El hidrolizado según el ejemplo 2 al 0,5 % estimula la expresión de la HMG-CoA reductasa en los queratinocitos humanos normales.

**Ejemplo 13: Preparación de las composiciones**

1. Crema de protección solar

[0152]

Nombres comerciales	Nomenclatura INCI	% masa
<b>FASE A</b>		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Pemulen TR1	Acrilatos/C10-30 crosopolímero de acrilato	0,40
Glicerina	Glicerina	3,00
Nipastat Sodium	Metilparabeno de sodio (y) etilparabeno de sodio (y) butilparabeno de sodio (y) propilparabeno de sodio (y) isobutilparabeno de sodio	0,15
<b>FASE B</b>		
Parsol MCX	Etilexil metoxicinamato	7,50
Eusolex 4360	Benzofenona 3	3,00
Parsol 1789	Butil metoxidibenzoilmetano	2,00
Myritol 318	Triglicérido cáprico/caprílico	4,00
Emulgade SEV	Gliceridos de palma hidrogenados (y) cetearil-20 (y) cetearil-12 (y) Alcohol ceteostearílico	5,00
Propilparaben	Propilparabeno	0,15
Nacol 16-98	Alcohol ceteostearílico	1,00
<b>FASE C</b>		
TEA	Trietanolamina	0,20
<b>Fase D</b>		
Hidrolizado según ejemplo 1		0,5%
Perfume	Perfume (fragancia)	qsp
Colorante		qsp

[0153] Los componentes de la fase A y de la fase B se calientan por separado entre 70 y 75°C. La fase B se emulsiona con la fase A por agitación. La fase C se añade a 45°C aumentando la agitación. La fase D se incorpora posteriormente cuando la temperatura se sitúa por debajo de los 40°C. El enfriamiento se lleva a cabo posteriormente, sin dejar de agitar, hasta que llega a los 25°C.

2. Crema de antiedad

[0154]

Nombres comerciales	Nomenclatura INCI	% masa
<b>FASE A</b>		
Montanov 68	Alcohol ceteostearílico (y) glucosido cetearílico	6,00
Squalane	Escualeno	3,00

ES 2 549 392 T3

Cetiol SB 45	Butyrosperum parkii (karité)	2,00
Waglinol 250	Etilexanoato cetearílico	3,00
Amerchol L-101	Aceite mineral (y) alcohol laolino	2,00
Abil 350	Dimeticona	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzima Q10	Ubiquinona	0,10
FASE B		
Aceite de aguacate	Aceite de aguacate (Pareassea Gratíssima)	1,25
Fenonip	Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) etilparabeno (y) butilparabeno (y) propilparabeno (y) isobutilparabeno	0,75
FASE C		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Butilenglicol	Butilenglicol	2,00
Glucam E10	Metil Gluceth-10	1,00
Allantoin	Alantoina	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbopol	0,20
FASE D		
TEA	Trietanolamina	0,18
FASE E		
Hidrolizado según el ejemplo 1		1%
GP4G	Agua (y) extracto de Artemia	1,50
Collaxyl	Agua (y) butilenglicol (y) hexapéptido 9	3,00
FASE F		
Perfume	Perfume (fragancia)	gsp
Colorante		gsp

[0155] Se prepara y se funde la fase A a 65-70°C. Se calienta la fase C a 65-70°C. Se añade la fase B a la A justo antes de que la A emulsione dentro de la B. Cuando está a unos 45°C, se neutraliza el carbopol con la adición de la fase D. Seguidamente se introduciría la E con una ligera agitación y enfriamiento hasta los 25°C. Si se desea, finalmente se añadiría la fase F.

5

3. Crema protectora de día :

10

[0156]

Nombres comerciales	Nomenclatura INCI	% masa
<b>FASE A</b>		
Emulium Delta	Alcohol cetílico (y) gliceril estearato (y) estearato PEG-75 (y) ceteth-20 (y) steareth-20	4,00
Lanette O	Alcohol cetearílico	1,50
D C 200 Fluido/100 cs	Dimeticona	1,00
DUB 810C	Coco Caprilato/Caprato	1,00
DPPG	Propilenoglicol Diperlagonato	3,00
DUB DPHCC	Dipentaeritritol hexacaprilato/hexacarpato	1,50
Cegesoft PS6	Aceite vegetal	1,00
Vitamina E	Tocoferol	0,30
Fenonip	Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) etilparabeno (y) butilparabeno (y) propilparabeno (y) isobutilparabeno	0,70
FASE B		
Agua desmineralizada	Aqua	qsp 100
Glicerina	Glicerina	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrilatos/C10-30 crosopolímero de acrilato	0,15
Keltrol BT	Xanato	0,30
FASE C		
Hidróxido de sodio (sol. al 10%)	Hidróxido de sodio	0,30
FASE D		
Agua desmineralizada	Aqua	5,00
Stay-C 50	Sodio ascorbil fosfato	0,50
FASE E		

ES 2 549 392 T3

Butilenglicol	Butilenglicol	2,00
Debaken CP	Clorfenesina	0,20
FASE F		
GP4G	Agua (y) extracto de Artemia	1,00
Hidrolizado según el ejemplo 1		2%

**[0157]** Se prepara la fase A y se calienta a 75°C con agitación. Se prepara la fase B dispersando el carbopol y después se agita el xanato. Se deja reposar. Se calienta a 75°C.

5 **[0158]** Cuando ha alcanzado la temperatura, se emulsiona A en B mientras se agita con un rotor-estator. Se neutraliza con la fase C en agitación rápida. Tras el enfriamiento a 40°C, se añade la fase D y, después, la E. Al enfriamiento con una suave agitación le sigue la adición de la fase F.

10 LISTADO DE SECUENCIA

**[0159]**

<110> ISP Investments INC.

15

<120> COMPOSICIÓN COSMÉTICA Y/O FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN HIDROLIZADO PEPTÍDICO CAPAZ DE REFORZAR LA FUNCIÓN BARRERA

<130> Bv PCT 09-122

20

<150> FR 09 01822

<151> 2009-04-15

25

<160> 7

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

30

<211> 6

<212> PRT

<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

35

Ala Glu Gly Leu Ser Ile  
1 5

<210> 2

<211> 5

40

<212> PRT

<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

Leu Gly Glu Ser Leu  
1 5

45

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

50

<400> 3

Val Gly Glu Leu Thr  
1 5

55

<210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

5

<400> 4

Ile Gly Glu Leu Ser  
1 5

10

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Planta o saccharomyces cerevisiae

15

<400> 5

20

Ala Gly Glu Leu Ser

1

5

<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

25

<400> 6

30

Gly Glu Leu Thr Ile  
1 5

<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Planta o Saccharomyces cerevisiae

35

<400> 7

40

Gly Glu Leu Ser  
1

45

50

55

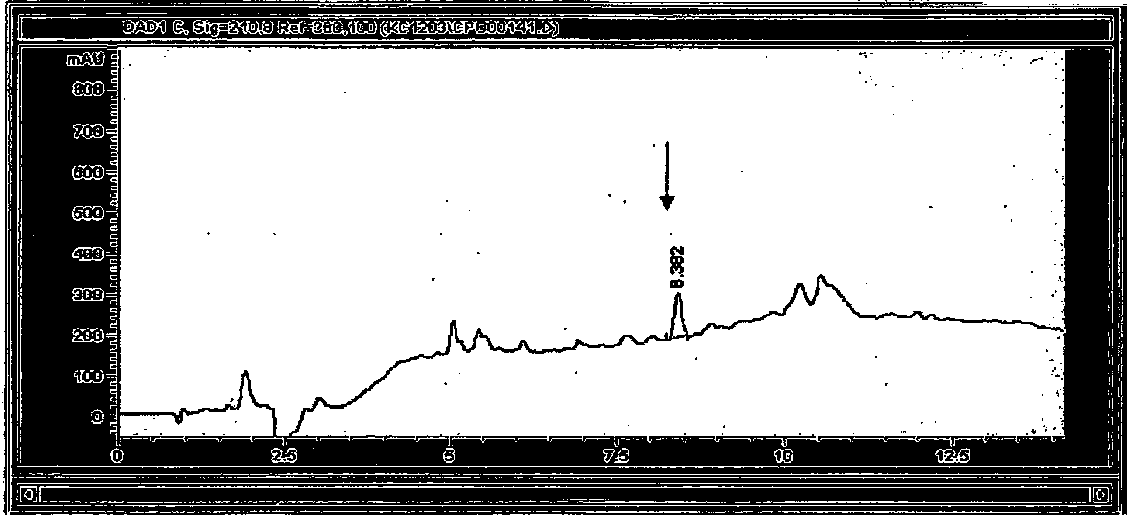
60

65

## REIVINDICACIONES

1. Hidrolizado peptídico activador de la HMG-CoA reductasa, **caracterizado porque** proviene de la hidrólisis de plantas seleccionadas como, entre otras, la espelta (*Triticum monococum*), la patata (*Solanum tuberosum*), el maíz (*Zea mayz L.*), el guisante (*Pisum sativum*) o levaduras del género *Saccharomyces* y, en especial, de la *Saccharomyces cerevisiae*, y está compuesto por péptidos de peso molecular inferior a 6 kDa y enriquecido con péptido bioactivo capaz de reforzar la función de barrera de la epidermis, conteniendo dicho péptido bioactivo de 4 a 6 aminoácidos, en los que al menos se incluye un residuo de glicina, uno de leucina y uno de ácido glutámico, con una secuencia de fórmula general (I) :
- X1-[Gly,Glu,Leu]-X2-X3
- en la que :
- X1 es la alanina, la valina, la isoleucina o ningún aminoácido,  
X2 es la serina o la treonina,  
X3 es la leucina, la isoleucina o ningún aminoácido,  
elegido entre las secuencias:
- (SEQ ID n°1) Ala-Glu-Gly-Leu-Ser-Ile  
(SEQ ID n°2) Leu-Gly-Glu-Ser-Leu  
(SEQ ID n°3) Val-Gly-Glu-Leu-Thr  
(SEQ ID n°4) Ile-Gly-Glu-Leu-Ser  
(SEQ ID n°5) Ala-Gly-Glu-Leu-Ser  
(SEQ ID n°6) Gly-Glu-Leu-Thr-Ile  
(SEQ ID n°7) Gly-Glu-Leu-Ser.
2. Hidrolizado peptídico según la reivindicación precedente, **caracterizado porque** contiene entre 0,5 y 5,5 g/l de compuestos de naturaleza peptídica.
3. Composición cosmética que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, en forma de un principio activo capaz de reforzar la función de barrera de la epidermis, un hidrolizado peptídico definido según la reivindicaciones precedentes, en una cantidad que representa entre el 0,0001% y el 20% del peso total de la composición y, preferentemente, en una cantidad que representa entre el 0,05 y el 5 % del peso total de la composición.
4. Composición según la reivindicación 3, **caracterizada porque** se presenta en una forma adaptada a la aplicación por vía tópica.
5. Composición según las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizada porque** comprende, además, al menos otro principio activo que favorece la acción de dicho hidrolizado peptídico, entre los que se encuentran la vitamina C, vitamina E, la coenzima Q10, los extractos polifenólicos de plantas, los retinoides, los péptidos en secuencia Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln (COL-LAXYL®) y el extracto de Artemia (GP4G®).
6. Composición farmacéutica que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, el hidrolizado peptídico definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en forma de medicamento.
7. Utilización cosmética de una cantidad eficaz de un hidrolizado peptídico según una de las reivindicaciones 1 o 2 para reforzar la función de barrera de la epidermis y estimular la diferenciación epidérmica.
8. Utilización según la reivindicación 7 para prevenir y luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento.
9. Utilización según la reivindicación 7 para proteger la piel de las agresiones externas.
10. Procedimiento de tratamiento cosmético destinado a prevenir o tratar las manifestaciones cutáneas de envejecimiento y/o fotoenvejecimiento, **caracterizado porque** se puede aplicar de forma tópica sobre la piel o las faneras a tratar, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de hidrolizado peptídico, tal y como se define en una de las reivindicaciones 1 o 2.

**Figura 1: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de espelta**



**Figura 2: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de patata**

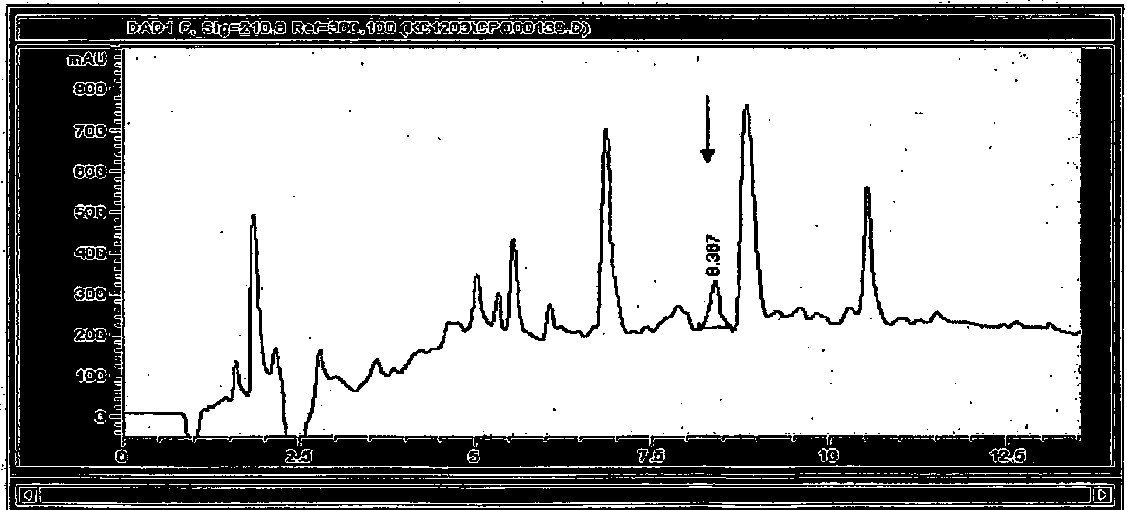


Figura 3: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de maíz

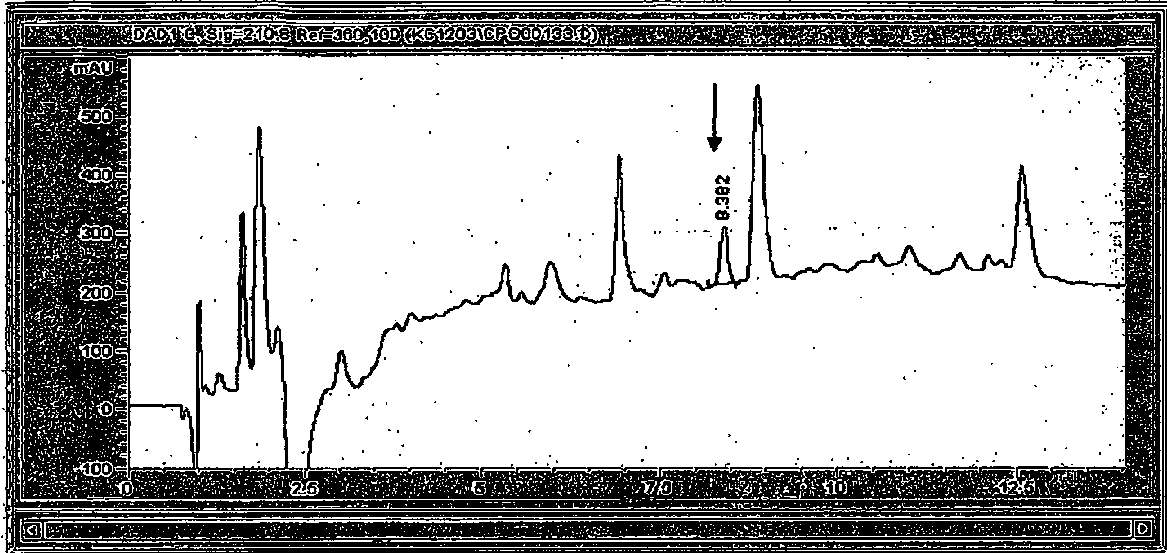


Figura 4: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de guisante

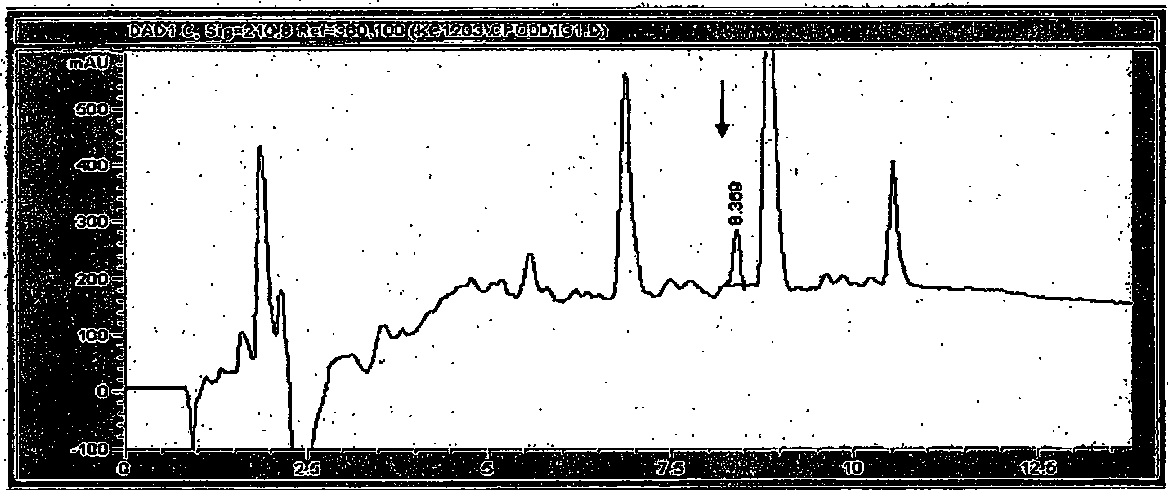


Figura 5: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de soja

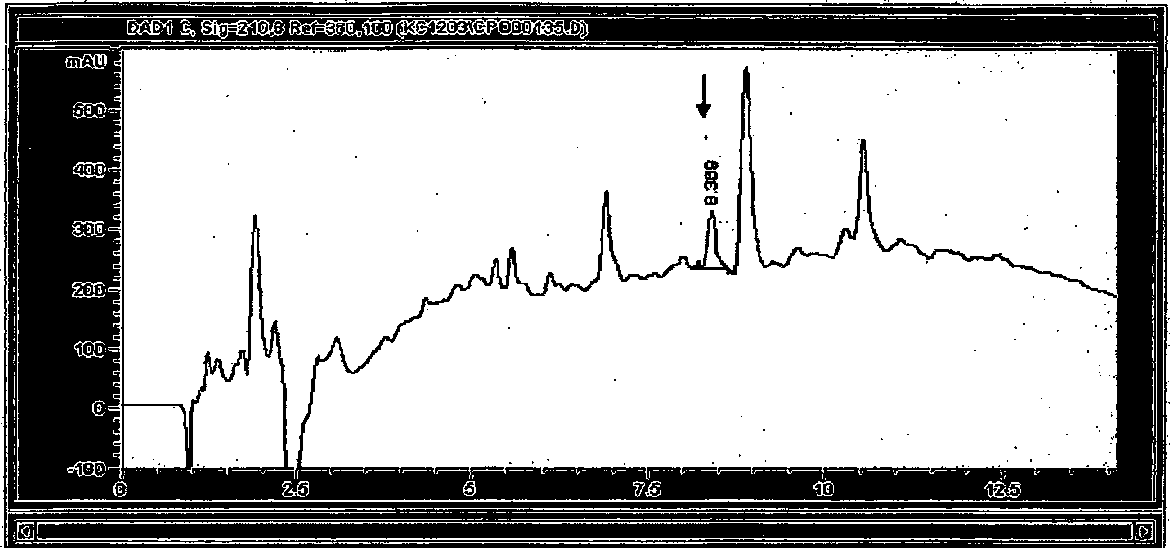


Figura 6: Cromatograma HPLC de un hidrolizado de Saccharomyces

