

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 314**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/10** (2006.01)  
**A61K 38/07** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**A61K 8/64** (2006.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61P 17/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10768510 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2473517**

54 Título: **Péptido activador de la transglutaminasa y composición cosmética o farmacéutica que lo contiene**

30 Prioridad:

**04.09.2009 FR 0904218**

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

**03.02.2016**

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 2 558 314 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

Péptido activador de la transglutaminasa y composición cosmética o farmacéutica que lo contiene

**[0001]** La presente invención se sitúa en el campo cosmético y farmacéutico y, más en concreto, en el campo de la dermatología. La presente invención se refiere a péptidos de fórmula general (I):

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

**[0002]** La presente invención se refiere igualmente a una composición cosmética o farmacéutica, que comprende un péptido de fórmula general (I), utilizado solo o en combinación con al menos otro principio activo, en un medio fisiológicamente adecuado. La invención hace referencia igualmente a la utilización de este nuevo péptido, como principio activo activador de la transglutaminasa humana.

10 **[0003]** La invención se refiere igualmente a la utilización cosmética de este nuevo péptido, como principio activo, en una composición, para reforzar la función de barrera cutánea y estimular la regeneración y la diferenciación epidérmica.

**[0004]** La invención se refiere igualmente a este nuevo péptido utilizado como medicamento.

15 **[0005]** La función principal de la epidermis es formar una barrera entre el entorno exterior y el medio interior. Es la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, la que asegura esta función. Está compuesto por queratinocitos en la fase final de su diferenciación, los corneocitos, sellados entre sí por un cemento intercelular, flexible e impermeable a la vez. Se distingue de esta manera en el estrato córneo un compartimento celular constituido por corneocitos y un compartimento extracelular constituido principalmente por lípidos, organizados en estructuras multilaminares. Los corneocitos están rodeados por una membrana específica, llamada envoltura

20 córnea, responsable en gran medida de la resistencia, de la insolubilidad y de la elasticidad de la piel. La envoltura córnea está formada por una mezcla de proteínas estructurales unidas entre sí por enlaces covalentes bajo la acción de la transglutaminasa. Las principales proteínas que forman la envoltura córnea son la envoplaquina, la periplaquina, la involucrina, las proteínas Small Prolin-Rich (proteínas SPR) y la loricrina.

25 **[0006]** Las transglutaminasas (EC 2.3.2.13) son una familia de enzimas dependientes de calcio que catalizan la formación de puntos peptídicos entre un  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina y un  $\gamma$ -carboxamida de un residuo de glutamina, estos puentes extramoleculares e intramoleculares son muy resistentes a la degradación (Lorand *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;4(2), 2003). En el ser humano se han identificado 9 transglutaminasas, de las cuales 4 se expresan en la piel.

30 **[0007]** La transglutaminasa-1 (TG1) se expresa en los queratinocitos y está presente en forma unida a la membrana.

35 **[0008]** La transglutaminasa-2 (TG2, tipo 2a o 2b) sólo está presente en la capa basal de la epidermis. Es soluble y no parece tener ninguna función en la formación de la envoltura córnea. La TG2 presenta la capacidad de generar enlaces covalentes entre las proteínas, pero puede igualmente unir el GTP o el GDP, y comportarse entonces como una proteína G, en concreto cuando la célula está en situación de apoptosis o de necrosis. La TG2 puede igualmente exportarse a la membrana y asociarse con las integrinas para aumentar la adhesión celular, la extensión de las células y la migración de las células a la fibronectina de la matriz extracelular. Debido a sus funciones pleiotrópicas, la TG2 está, entre otras cosas, implicada en la cicatrización.

**[0009]** La transglutaminasa-3 (TG3) se expresa en los folículos pilosos y en las fases finales de la diferenciación de los queratinocitos.

40 **[0010]** La transglutaminasa-5 (TG5) está presente en las capas superiores de la epidermis y desempeña igualmente una función en las primeras fases de la diferenciación epidérmica.

**[0011]** En la epidermis, las TG1, TG3 y TG5 participan en la formación de la envoltura córnea (Lorand *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;4(2), 2003).

45 **[0012]** Las TG tienen sustratos muy diversos. De esta manera, son capaces de reticular las queratinas entre sí y con la filagrina, lo que produce la estabilización y la coordinación de la red queratina-filagrina en las células córneas.

50 **[0013]** En las primeras fases de la diferenciación epidérmica, las TG mejoran el anclaje de los desmosomas, después, en la capa granular, estas mismas TG aseguran la adhesión de ciertos lípidos a la envoltura córnea y la unión de la loricrina con las proteínas Small Proline Rich (SPR). En las capas granulares superiores, los lípidos que provienen de los cuerpos de golgi están reticulados por las TG1 y TG5 en las proteínas precursoras de la envoltura, ya parcialmente reticuladas. Finalmente, la fase de descamación, que se encuentra en el nivel de las capas córneas más externas, implica reticulaciones adicionales de la loricrina y de otras proteínas, que implican a la TG1.

[0014] Varios estudios muestran que las tres TG implicadas en la formación de la envoltura córnea en la epidermis tienen funciones diferenciadas (Candi *et al* 1995).

[0015] La función principal de las transglutaminasas en la formación del estrato córneo, más ampliamente en la diferenciación epidérmica y, en consecuencia, en la función de barrera, se confirma por ciertos modelos patológicos. De esta manera, los ratones invalidados por el gen TG1 homocigotos TG1<sup>-/-</sup> sufren malformaciones letales del estrato córneo y mueren rápidamente después de nacer (Matsuki *et al*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, 1998). Por otra parte, en los seres humanos, las mutaciones realizadas por la TG1 son responsables de formas más o menos graves de ictiosis (Huber *et al*. *Science* 267, 1995).

[0016] Durante el envejecimiento de la piel, la integridad de la barrera cutánea, así como sus capacidades de reparación, se alteran. Se observa una deficiencia global en lípidos, que da lugar a una disminución de las multicapas lipídicas del compartimento extracelular del estrato córneo. Estos cambios funcionales están correlacionados con una mayor susceptibilidad de las pieles envejecidas a las agresiones externas (Ghadially R. *et al.*, *J Clin Invest.*, 1995, 95(5): p. 2281-90).

[0017] Independientemente del envejecimiento intrínseco o fotoinducido, pueden producirse alteraciones de la barrera cutánea durante las agresiones externas.

[0018] Por la expresión "agresión externa" se entiende las agresiones que puede producir el medio ambiente. A modo de ejemplo, se pueden mencionar agresiones tales como la contaminación, los UV, o los productos de carácter irritante tales como los tensioactivos, los conservantes o las fragancias, las agresiones mecánicas, tales como las abrasiones, el afeitado o la depilación. Por contaminación se entiende tanto la contaminación "exterior" debida, por ejemplo, a las partículas de diésel, al ozono o a los metales pesados, como la contaminación "interior" que puede deberse sobre todo a las emisiones de disolventes, pinturas, pegamentos, o papel pintado (tales como tolueno, estireno, xileno o benzaldehído), o incluso al humo de los cigarrillos. Estas agresiones externas dan lugar a una alteración de la función de barrera que se traduce en un malestar cutáneo, fenómenos sensoriales desagradables, tales como rigidez o picazón, incluso fragilidad excesiva y enrojecimiento.

[0019] Las personas particularmente afectadas por esta alteración de la función de barrera por agresiones externas son las personas con piel denominada "frágil" o "sensible", es decir, particularmente sensibles a las variaciones de temperatura o de humedad y/o particularmente reactiva con respecto a los productos agresivos (el caso de las pieles de los bebés, por ejemplo). Las personas con la piel "frágil" incluyen principalmente a las personas cuyos lípidos protectores del estrato córneo son escasos, como es el caso de las personas de edad avanzada y muy avanzada (al menos 75 años), las personas cuya composición de lípidos protectores del estrato córneo está modificada, como es el caso de las personas diabéticas, o con diálisis, o que padecen ciertas enfermedades. Las personas con la piel "sensible" tienen un umbral de reactividad bajo, que puede estar ligado a una hiperactividad neurogénica. Estas pieles sensibles presentarán signos clínicos de manera mucho más rápida y frecuente que los otros tipos de piel.

[0020] Una alteración de la función de barrera cutánea puede traducirse principalmente en un problema de hidratación, en una pérdida de elasticidad de la piel, en una alteración del brillo del cutis, en la aparición de una rugosidad sobre la piel y, de forma más general, en la aparición de signos cutáneos del envejecimiento.

[0021] Conviene entonces intentar evitar la alteración o restablecer la función de barrera de la epidermis. No obstante, la función principal de la transglutaminasa lo ha hecho un objetivo para reforzar la función de barrera de la epidermis. En el campo de la cosmética, la activación de la transglutaminasa ya se ha descrito con el fin de mejorar la función de barrera, utilizando extractos vegetales, por ejemplo extractos de *Asiasarum hétérotropoides* F., o *Asiasarum sieboldi* F., y de *Apocynum venetum* L., como se menciona en la solicitud de patente JP2004115451. La solicitud de patente US2007134172 describe la utilización de flavonoides extraídos preferiblemente de *Sidastrum* para obtener una mejor resistencia de la piel a los factores ambientales y, en concreto, a la sequedad.

[0022] Los inventores han demostrado ahora una actividad cosmética y terapéutica, especialmente dermatológica, de péptidos de fórmula general (I):



[0023] En concreto, se ha demostrado que estos péptidos, cuando se aplican sobre la piel, refuerzan la función de barrera de la epidermis y estimulan la regeneración y la diferenciación epidérmica. Por consiguiente, la presente invención se refiere a péptidos de fórmula general (I) que corresponden a la secuencia (SEQ ID n°5) Arg-Arg-Gly-Gln-NH<sub>2</sub>, así como a la utilización cosmética en composiciones que comprenden péptidos de fórmula general (I) seleccionadas de una de las secuencias (SEQ ID n°4) Arg-Arg-Gly-Gln o (SEQ ID n°5) Arg-Arg-Gly-Gln-NH<sub>2</sub>, como principio activo activador de la transglutaminasa humana, para proteger la piel y las faneras de las agresiones externas y para combatir las manifestaciones del envejecimiento cutáneo.

5 **[0024]** Por "péptido o principio activo activador de la transglutaminasa o capaz de activar la transglutaminasa humana" se entiende cualquier péptido de fórmula general (I) capaz de aumentar la actividad de la transglutaminasa mediante el aumento de la síntesis proteica de la transglutaminasa (por modulación directa o indirecta de la expresión génica de la transglutaminasa), o mediante el aumento de la actividad enzimática de la transglutaminasa, o mediante otros procesos biológicos tales como la estabilización de la proteína transglutaminasa o la estabilización de los transcritos de ARN mensajero.

**[0025]** Por piel se entiende todos los tejidos de recubrimiento que forman la piel y las mucosas.

**[0026]** El término "faneras" engloba todos los apéndices de queratina presentes en la superficie del cuerpo, en concreto, el vello, las pestañas, las cejas, las uñas y el cabello.

10 **[0027]** Por "aplicación tópica" se entiende el hecho de aplicar o extender el principio activo, o una composición que lo contenga, por la superficie de la piel.

**[0028]** Por "fisiológicamente adecuado" se entiende que el principio activo, o una composición que lo contenga, es adecuada para entrar en contacto con la piel sin provocar reacciones de toxicidad o intolerancia.

15 **[0029]** De esta manera, la invención se refiere en primer lugar a un péptido que tiene una secuencia que corresponde a la fórmula general (I):



en la que,

20  $X_1$  es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 $X_2$  es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 $X_3$  es glutamina o asparagina,  
 $X_4$  es prolina, valina o ningún aminoácido,  
 AA representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,  
 25  $R_1$  representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$  saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático, pudiendo seleccionarse el grupo aromático que sustituye la función amina primaria de entre un grupo de tipo benzoílo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,  
 $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$ , o un grupo  $NH_2$ ,  $NHY$  o  $NYY$ ,  
 30 representando Y una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ ,  
 constando dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos, caracterizado porque el péptido es de secuencia (SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln- $NH_2$ .

**[0030]** Los aminoácidos, que constituyen el péptido y están designados por los términos AA o X, pueden estar en configuración isomérica L- y D-. Preferiblemente, los aminoácidos están en forma L.

35 **[0031]** Por "péptido" se entiende el péptido natural o sintético como se describe anteriormente, o al menos un fragmento del mismo, o al menos un derivado del mismo, que se obtenga por proteólisis o de manera sintética, o cualquier péptido natural o sintético cuya secuencia esté constituida en su totalidad por la secuencia del péptido anteriormente descrito.

40 **[0032]** Con el fin de mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido. La forma de protección debe ser obviamente una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con una utilización en el campo de los cosméticos o de la farmacia. Preferiblemente, para proteger la función amina primaria del aminoácido N-terminal se utiliza una sustitución por un grupo  $R_1$  de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$  saturada o insaturada, que puede seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático. Preferiblemente, para proteger la función carboxilo del aminoácido C-terminal se utiliza una sustitución por un grupo  $R_2$  de tipo cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$ , o un grupo  $NH_2$ ,  $NHY$  o  $NYY$ , representando Y una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ .

**[0033]** El péptido se puede proteger en el extremo N-terminal, C-terminal o en ambos extremos.

**[0034]** De esta manera, la invención se refiere a una composición como se define anteriormente, caracterizada por el hecho de que el péptido de SEQ ID nº5 está en forma protegida o no protegida.

50 **[0035]** El péptido de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5 se puede obtener mediante síntesis química clásica (en fase sólida o en fase homogénea líquida), o mediante síntesis enzimática (Kullman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1980, 225, 8234), a partir de aminoácidos constituyentes o de sus derivados.

**[0036]** El péptido puede ser de origen natural o sintético. Preferiblemente, el péptido se obtiene mediante síntesis química.

**[0037]** De conformidad con la invención, dicho péptido de secuencia SEQ ID nº5 se puede utilizar como medicamento.

5 **[0038]** De conformidad con un modo de realización ventajoso de la invención, el péptido de secuencia SEQ ID nº5 se solubiliza en uno o varios disolventes fisiológicamente adecuados, utilizados tradicionalmente por el experto en la materia, tales como agua, glicerol, etanol, propanodiol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes.

10 **[0039]** De conformidad con otro modo de realización ventajoso de la invención, el péptido de secuencia SEQ ID nº5 se solubiliza en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas, o se absorbe sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como los talcos y las bentonitas y, de manera más general, se solubiliza en, o se fija sobre, cualquier vector fisiológicamente adecuado.

15 **[0040]** La invención se refiere en segundo lugar a una composición cosmética o farmacéutica y, en concreto, dermatológica, que comprende, en un medio fisiológicamente adecuado, un péptido de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID nº5, como principio activo capaz de activar la transglutaminasa humana. De conformidad con un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, el péptido se utiliza solo o en combinación con al menos otro principio activo.

**[0041]** Resulta evidente que la invención se dirige a los mamíferos en general, y de manera más concreta a los seres humanos.

20 **[0042]** Preferiblemente, el péptido de secuencia SEQ ID nº5 es más particularmente capaz de activar las transglutaminasas humanas de tipo 1, 2a, 2b, 3 o 5.

25 **[0043]** De conformidad con un modo de realización ventajoso de la invención, el principio activo de secuencia SEQ ID nº5 está presente en las composiciones en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,0005 y 500 ppm (partes por millón) y, preferiblemente, en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,01 y 5 ppm con respecto al peso total de la composición final.

**[0044]** Este intervalo de concentraciones representa la cantidad eficaz de principio activo correspondiente a la cantidad necesaria para obtener el resultado deseado, a saber, activar la transglutaminasa, con el objetivo de reforzar la función de barrera cutánea y de estimular la regeneración y la diferenciación epidérmica.

30 **[0045]** Preferiblemente, la composición se presenta en una forma adecuada para la aplicación por vía tópica y comprende un medio fisiológicamente adecuado para la piel y las faneras. Por "fisiológicamente adecuado" se entienden medios que son adecuados para utilizarse en contacto con la piel o las faneras humanas, sin riesgo de toxicidad, de incompatibilidad, de inestabilidad, de reacción alérgica y otros efectos secundarios.

35 **[0046]** Las composiciones destinadas a aplicarse sobre la piel y las faneras pueden presentarse en forma de solución acuosa o hidroalcohólica, emulsión de agua en aceite o aceite en agua, microemulsión, gel acuoso o anhidro, sérum, o dispersión de vesículas, parche, crema, espray, ungüento, pomada, loción, coloide, solución, suspensión u otras.

40 **[0047]** La composición utilizable de conformidad con la invención puede consistir, en particular, en una composición para el cuidado del cabello y, en concreto, un champú, un acondicionador, una loción limpiadora, una crema para el cabello o gomina, una loción reparadora para el cabello, una mascarilla, etc. La composición cosmética se puede utilizar en particular en los tratamientos que implican una aplicación que va seguida o no de un aclarado, o en forma de champú. Las composiciones también pueden aplicarse sobre las faneras en forma de tinte o de rímel a aplicar con un cepillo o peine, en concreto, sobre las pestañas, las cejas o el cabello, o en forma de cuidado para las uñas, tales como esmaltes de uñas.

45 **[0048]** Se entiende que el principio activo de secuencia SEQ ID nº5 se puede utilizar solo o bien en combinación con al menos otro principio activo, en una composición cosmética o para la preparación de una composición farmacéutica y/o dermatológica. De manera ventajosa, las composiciones utilizables de conformidad con la invención también contienen diversos principios activos protectores o antienvjecimiento, destinados, en particular, a la prevención y/o al tratamiento de desórdenes relacionados con el envejecimiento.

50 **[0049]** Se puede mencionar, de manera no limitativa, las siguientes clases de ingredientes: otros agentes activos peptídicos, extractos vegetales, agentes cicatrizantes, antiedad, antiarrugas, calmantes, antirradicales, anti UV, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético, agentes hidratantes, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, anestésicos, agentes que modulan la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, agentes que estimulan el crecimiento de las uñas o del cabello... Preferiblemente, se utilizará un agente antirradical o antioxidante, o un agente que estimule la síntesis de macromoléculas dérmicas, o un agente que estimule el metabolismo energético.

**[0050]** Además, se pueden añadir a la composición aditivos tales como agentes espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, antioxidantes, agentes filmógenos, quelantes, secuestrantes, acondicionadores, etc.

5 **[0051]** Las composiciones se pueden aplicar por cualquier vía adecuada, en particular, oral, parenteral o tópica externa, y su formulación se adaptará por el experto en la materia, en concreto para composiciones cosméticas o dermatológicas. De manera ventajosa, las composiciones están destinadas a una administración por vía tópica cutánea. Estas composiciones deben, por tanto, contener un medio fisiológicamente adecuado, es decir, compatible con la piel y las faneras, y que incluya todas las formas cosméticas o dermatológicas. En particular, estas composiciones podrán estar en forma de cremas, emulsiones de aceite en agua, o de agua en aceite o emulsiones múltiples, soluciones, suspensiones, geles, leches, lociones, barras o polvos, y son adecuadas para una aplicación sobre la piel, los labios y/o las faneras. Estas composiciones comprenden los excipientes necesarios para su formulación, tales como disolventes, espesantes, diluyentes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes, conservantes, fragancias.

10 **[0052]** De conformidad con otra forma de la invención, las composiciones serán adecuadas para una administración oral para un uso farmacéutico. De esta manera, las composiciones podrán presentarse, en particular, en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, comprimidos masticables, polvos para consumir tal cual o para mezclarse extemporáneamente con un líquido, siropes, geles y cualquier otra forma conocida por el experto en la materia. Contendrán excipientes de formulación adecuados, tales como colorantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes de relleno, aglutinantes y conservantes.

15 **[0053]** En concreto, estas composiciones pueden presentarse en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa; de emulsión de aceite en agua, agua en aceite o emulsiones múltiples; también pueden presentarse en forma de cremas, suspensiones, o polvos, adecuados para una aplicación sobre la piel, las mucosas, los labios y/o las faneras. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, loción, leche, sérum, pomada, gel, pasta o espuma. También pueden presentarse en forma sólida, como una barra, o aplicarse sobre la piel en forma de aerosol. Se pueden utilizar como producto de cuidado y/o como producto de maquillaje de la piel.

20 **[0054]** Estas composiciones comprenden, además, cualquier aditivo comúnmente utilizado en el campo de aplicación previsto, así como los adyuvantes necesarios para su formulación, tales como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, rellenos, conservantes, fragancias, absorbentes de olor, activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc.

25 **[0055]** En cualquier caso, el experto en la materia se asegurará de que estos adyuvantes, así como sus proporciones, se seleccionen de manera que no se perjudiquen las propiedades ventajosas buscadas de la composición. Estos adyuvantes pueden, por ejemplo, corresponder a 0,01 % a 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición es una emulsión, la fase grasa puede representar de 5 % a 80 % en peso y, preferiblemente, de 5 % a 50 % en peso en relación con el peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición se seleccionarán de los utilizados tradicionalmente en el campo considerado. Por ejemplo, se pueden utilizar en una proporción que vaya de 0,3 % a 30 % en peso, en relación al peso total de la composición.

30 **[0056]** La invención se refiere en tercer lugar a la utilización cosmética de una composición que comprende el péptido de fórmula general (I):



en la que,

35  $X_1$  es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 $X_2$  es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 $X_3$  es glutamina o asparagina,  
 $X_4$  es prolina, valina o ningún aminoácido,  
 AA representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,  
 40  $R_1$  representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$  saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático, sustituyendo el grupo aromático la función amina primaria que se puede seleccionar de un grupo de tipo benzoilo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,  
 $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$ , o un grupo  $NH_2$ ,  $NHY$  o  $NYY$ ,  
 55 representando Y una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ ,  
 constando dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos, seleccionada de una de las secuencias siguientes:

(SEQ ID nº4) Arg-Arg-Gly-Gln,  
(SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln-NH<sub>2</sub>,

como principio activo, para reforzar la función de barrera cutánea y estimular la regeneración y la diferenciación epidérmica.

5 **[0057]** Por “reforzar la función de barrera cutánea y estimular la regeneración y la diferenciación epidérmica” se entiende la mejora de la estructura de la capa córnea, el aumento de los signos de regeneraciones celulares, tales como la densidad de las capas basales epidérmicas y la velocidad de migración de los fibroblastos, y el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación de queratinocitos.

10 **[0058]** La invención se refiere en cuarto lugar a la utilización cosmética de una composición que comprende el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5, como principio activo, para combatir de manera preventiva y/o curativa los signos del envejecimiento cutáneo, y más en concreto el envejecimiento fotoinducido (fotoenvejecimiento). Por manifestaciones cutáneas del envejecimiento se entiende cualquier modificación del aspecto exterior de la piel y de las faneras debida al envejecimiento como, por ejemplo, las rugosidades superficiales de la capa córnea, las arrugas y patas de gallo, pero también cualquier modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente en un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis o cualquier otra degradación interna de la piel consecutiva a una exposición a la radiación ultravioleta (UV).

15 **[0059]** La invención se refiere en quinto lugar a la utilización cosmética de una composición que comprende el péptido de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5, como principio activo, para proteger la piel y las faneras contra todo tipo de agresiones externas.

20 **[0060]** En concreto, la invención se refiere a la utilización cosmética de una composición que comprende una cantidad efectiva de péptido de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5 para prevenir o tratar los daños causados a la piel y a las faneras por tratamientos mecánicos, tales como el afeitado o la depilación.

25 **[0061]** En concreto, la invención se refiere a la utilización cosmética de una composición que comprende una cantidad efectiva de péptido de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5, para prevenir o tratar los daños causados a la piel y a las faneras por condiciones climáticas extremas o variaciones extremas de temperatura y de higrometría.

30 **[0062]** En concreto, la invención se refiere a la utilización cosmética de una composición que comprende una cantidad efectiva de péptido de secuencia SEQ ID nº4 o SEQ ID nº5, para prevenir o tratar los daños causados a la piel y a las faneras por exposiciones a la radiación ultravioleta (UV).

**[0063]** Se aplica tópicamente sobre la piel o las faneras a tratar una composición que contiene una cantidad eficaz de principio activo para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento o proteger la piel y las faneras contra las agresiones externas, en concreto, para proteger la piel y las faneras contra las agresiones debidas a la radiación UV.

35 **[0064]** La invención se refiere finalmente a la utilización del péptido de fórmula general (I)



en la que,

40 X<sub>1</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
X<sub>2</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
X<sub>3</sub> es glutamina o asparagina,  
X<sub>4</sub> es prolina, valina o ningún aminoácido,  
AA representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,  
45 R<sub>1</sub> representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático, sustituyendo el grupo aromático la función amina primaria que se puede seleccionar de un grupo de tipo benzóilo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,  
R<sub>2</sub> representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, o un grupo NH<sub>2</sub>, NHY o NYY,  
50 representando Y una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,  
constando dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos, seleccionada de una de las secuencias siguientes:

(SEQ ID nº4) Arg-Arg-Gly-Gln,  
(SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln-NH<sub>2</sub>,

como principio activo, utilizado solo o en combinación con al menos otro principio activo, en una composición farmacéutica destinada a prevenir o tratar las patologías caracterizadas por una alteración de la función de barrera, tales como las pieles hipersensibles, irritadas o reactivas y la eccema atópica.

5 [0065] Otras ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto con la lectura de los ejemplos proporcionados a título ilustrativo y no limitativo.

#### **Lista de las figuras**

[0066] Figura 1: Gráfico que representa los resultados del análisis de la actividad transglutaminasa total en los queratinocitos humanos normales tratados con el péptido SEQ ID N°5 al 1 %.

10 **Ejemplo 1: Demostración del aumento de la actividad enzimática global de las transglutaminasas por el péptido SEQ ID n°5**

[0067] El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEQ ID n°5 en la actividad total de las transglutaminasas en los queratinocitos humanos normales (KHN, por sus siglas en francés). Para ello, la actividad enzimática total de las transglutaminasas se analiza por espectrofotometría utilizando un sustrato donante de aminoácidos marcado con la fluoresceína.

15 [0068] **Protocolo:** Se colocaron KHN en placas de 96 pocillos negros. Después de 4 días de cultivo, los KHN se trataron con una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID n°5 durante 24 o 48 horas (se añadió el principio activo cada 24 horas). Se realizó un control positivo, por tratamiento de las células con EGCG (galato de epigallocatequina, el polifenol principal del té verde) a una concentración de 20 µg/ml. El sustrato utilizado fue cadaverina marcada con fluoresceína (Invitrogen A10466) diluida a 100 µM en el medio de cultivo. El sustrato se incubó durante 2 horas con las células en una cantidad de 200 µl/pocillo). A continuación, las células se enjuagaron dos veces en el tampón HBSS y se fijaron mediante una mezcla de ácido acético-etanol-agua (1:49:50) durante 20 min. Después de dos enjuagues en etanol y a continuación tres enjuagues en el tampón HBSS, se añadieron 100 µl de PBS en cada pocillo y se realizó una lectura mediante espectrofotómetro con longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm. En estas condiciones, la actividad transglutaminasa fue proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida (expresada en unidades de fluorescencia), en relación con la cantidad total de proteínas presente en cada pocillo, previamente analizada mediante la técnica BCA.

20

25

[0069] **Resultados:** Los resultados se expresan en porcentaje en relación al control no tratado y se presentan en la Figura 1. En presencia de 0,5 ppm de péptido SEQ ID n°5, la actividad enzimática aumentó 30 % después de 30 24 horas y 47,7 % después de 48 horas.

[0070] **Conclusión:** El péptido SEQ ID n°5 aumenta significativamente la actividad enzimática total de las transglutaminasas en los queratinocitos humanos normales.

#### **Ejemplo 2: Demostración del efecto activador del péptido SEQ ID n°5 en la expresión de las TG1, TG2, TG3 y TG5**

35 [0071] El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEQ ID n°5 en la expresión de las diferentes transglutaminasas expresadas en la piel humana. Para ello, se realizaron marcajes específicos mediante inmunofluorescencia sobre el cultivo de queratinocitos humanos normales (KHN) y sobre una biopsia de piel. Se realizaron igualmente marcajes mediante inmunofluorescencia sobre cultivos de fibroblastos humanos normales específicamente para la TG2, expresada en este tipo de células.

40 [0072] **Protocolo de los inmunomarcajes sobre queratinocitos humanos normales en cultivo:** Se trataron KHN en cultivo con una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID n°5 durante 24 horas. Para el inmunomarcaje por el anticuerpo anti TG1, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 10 minutos. A continuación, se incubaron las células en presencia de un anticuerpo específico anti TG1 (Clinisciences BT-621, monoclonal de ratón), después en presencia de un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a un marcador fluorescente. Para los otros inmunomarcajes, las células se lavaron y se fijaron con metanol frío durante 1 minuto. A continuación, se incubaron las células en presencia de un anticuerpo específico; anti-TG2 (Abcam ab2972, policlonal de conejo), anti TG3 (Abcam ab53236, monoclonal de ratón) o anti TG5 (Abcam ab26992, policlonal de conejo). Después del montaje en un medio *ad hoc*, se observaron las láminas en un microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E 80i).

45

50

[0073] **Protocolo de los inmunomarcajes sobre fibroblastos humanos normales en cultivo:** Se trataron fibroblastos humanos dérmicos y se inmunomarcaron mediante un anticuerpo anti TG2 según el mismo protocolo que para los KHN.

[0074] Protocolo de los inmunomarcajes sobre biopsias de piel: Se pusieron en cultivo biopsias de piel humana en la interfaz aire/líquido. Se aplicó tópicamente una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5 durante 24 horas.

5 [0075] Para los marcajes de la TG1 y de la TG2, a continuación se incluyeron las biopsias de piel en resina y se congelaron en nitrógeno. Después se realizaron cortes de aproximadamente 6 µm en el criostato. El inmunomarcaje se realizó mediante un anticuerpo específico; anti TG1 (Clinisciences BT-621, monoclonal de ratón) o anti-TG2 (Abcam ab2972, policlonal de conejo), después en presencia de un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a un marcador fluorescente. Entonces se examinaron los cortes de piel en el microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E 80i).

10 [0076] Para los marcajes de la TG3, se incluyeron las biopsias de piel en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 µm de espesor. Las láminas se desparafinaron, se hidrataron y después se sometieron a un inmunomarcaje mediante un anticuerpo dirigido contra la TG3 (Abcam ab53236, monoclonal de ratón) después en presencia de un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a un marcador fluorescente. Entonces se examinaron los cortes de piel mediante microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E 80i).

15 [0077] Resultados: En todas las condiciones probadas, se observa una fluorescencia más intensa en los cultivos y sobre los cortes de piel tratados con 0,5 ppm de péptido SEQ ID nº5 que en las condiciones de control, no tratado.

[0078] Conclusiones: El péptido SEQ ID nº5 a 0,5 ppm estimula la expresión de las TG1, TG2, TG3 y TG5 en los queratinocitos humanos normales en cultivo, así como la expresión de la TG2 en los fibroblastos humanos.

20 [0079] El péptido SEQ ID nº5 a 0,5 ppm estimula la expresión de las TG1, TG2, y TG3 en las biopsias de pieles cultivadas *ex vivo*.

### **Ejemplo 3: Demostración del efecto activador del péptido SEQ ID nº5 en la diferenciación epidérmica**

[0080] El objetivo de este estudio es determinar la influencia del péptido SEQ ID nº5 en la diferenciación epidérmica. Para ello, se estudió la expresión de los principales marcadores de la diferenciación epidérmica, expresados específicamente en los queratinocitos de las capas suprabasales. Los marcadores probados son la transglutaminasa 1, las panqueratinas, la filagrina, la involucrina y la loricrina. Por otro lado, la filagrina, la involucrina y la loricrina son precursores de la envoltura córnea y de los sustratos de las transglutaminasas.

[0081] Protocolo de los inmunomarcajes sobre queratinocitos humanos normales en cultivo: Se trataron KHN en cultivo con una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5 durante 24 horas. A continuación, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 10 minutos. Después del desmascaramiento de los sitios específicos, las células se incubaron en presencia de un anticuerpo específico dirigido contra TG1 (Clinisciences BT-621, monoclonal de ratón), o contra la loricrina (Abcam ab24722, policlonal de conejo), o la involucrina (Novocastra NCL-INV, monoclonal de ratón, clon SY5), después se incubaron en presencia de un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a un marcador fluorescente. Para una mayor facilidad de observación, los núcleos de las células se pueden contrateñir mediante DAPI (4',6' Di Amidino-2-Fenil Indol), una molécula fluorescente azul capaz de unirse fuertemente al ADN). Después del montaje en un medio *ad hoc*, se observaron las láminas en un microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E 80i).

[0082] Protocolo de los inmunomarcajes sobre biopsias de piel: Se pusieron en cultivo biopsias de piel humana en la interfaz aire/líquido. Se aplicó tópicamente una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5 durante 24 horas. A continuación, las biopsias de piel se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 µm de espesor. Las láminas se desparafinaron, se hidrataron y después se sometieron a un inmunomarcaje mediante un anticuerpo dirigido contra la TG1 (Clinisciences BT-621, monoclonal de ratón) o las cito-panqueratinas (Novocastra (NCL-CK10, monoclonal de ratón), o la loricrina (Abcam ab24722, policlonal de conejo), o la involucrina (Novocastra NCL-INV, clon SY5, monoclonal de ratón) o la filagrina (Tebu Santa Cruz sc-58761, monoclonal de ratón). Para una mayor facilidad de observación, los núcleos de las células se pueden contrateñir mediante DAPI (4',6' Di Amidino-2-Fenil Indol, una molécula fluorescente azul capaz de unirse fuertemente al ADN). Después se utilizó un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a un marcador fluorescente. Después del montaje en un medio *ad hoc*, se observaron las láminas en un microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse E 80i).

[0083] Protocolo de las inmunoelectrotransferencias: Se trataron KHN en cultivo con una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5 durante 24 horas. A continuación, se enjuagaron las células y después se separaron del soporte mediante raspado en un tampón RIPA en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.). Las células lisadas se centrifugaron a 4 °C a 10 000 rpm durante 20 minutos y se recogieron los sobrenadantes. A continuación, las muestras se estandarizaron mediante el análisis de las proteínas mediante el kit BCA (Pierce, Francia). Las muestras se mezclaron y después se sometieron a una electroforesis en gel NuPAGE 3-8 % Tris-acetato, en un tampón de

migración NuPAGE Tris-acetato y después se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa mediante un dispositivo de transferencia (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las membranas se saturaron en TBS-leche al 5 %, 2 horas a temperatura ambiente, y después se incubaron a 4 °C toda la noche con un anticuerpo primario dirigido contra la TG1 (Clinisciences BT-621, monoclonal de ratón) o contra la involucrina (Novocastra NCL-INV, clon SY5, monoclonal de ratón) o contra la loricrina (Abcam ab24722, policlonal de conejo). Después del lavado mediante tampón TBS-Tween al 0,05 %, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario adecuado, acoplado a la peroxidasa. A continuación, se desarrollaron las transferencias mediante un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, Brebiere, Francia). Las bandas de proteínas específicas reveladas de esta manera se cuantificaron mediante un analizador de imagen Chemi-Imager technology (Alpha Innotech Corporation).

**[0084] Resultados:** En todas las condiciones probadas por inmunofluorescencia, se observa una fluorescencia más intensa en los cultivos y sobre los cortes de piel tratados con 0,5 ppm de péptido SEQ ID nº5 que en las condiciones de control, no tratado. En los cortes de piel *ex vivo*, se observa una diferenciación epidérmica con presencia de una capa córnea más gruesa. El análisis cuantitativo de las inmunoelectrotransferencias permite evaluar el aumento de la expresión de los marcadores probados. El aumento de la TG1 es de 20 %, el de la involucrina es de 30 % y el de la loricrina es de 16 %.

**[0085] Conclusiones:** El péptido SEQ ID nº5 estimula la expresión de las panqueratinas, de la involucrina, de la filagrina, de la loricrina, así como de la TG1 en los queratinocitos humanos normales. El péptido SEQ ID nº5 a 0,5 ppm mejora igualmente la diferenciación epidérmica y, en concreto, la morfología de la capa córnea.

#### **Ejemplo 4: Demostración del efecto protector con respecto a las agresiones externas del péptido SEQ ID nº5**

**[0086]** El objetivo de este estudio es determinar el efecto protector sobre la piel del péptido de conformidad con la invención con respecto a las agresiones externas. Para ello, se utilizó un modelo *ex vivo* de agresión severa de la barrera cutánea.

**[0087] Protocolo:** Las biopsias de piel humana se sometieron a una agresión provocada por desgarros sucesivos de estratos de la capa córnea mediante cinta adhesiva (técnica conocida como "tape stripping"). La etapa de desgarro se repitió 20 veces seguidas sobre la misma zona. Las biopsias de piel humana "desgarradas" se pusieron a continuación en cultivo y se trataron con 0,5 ppm y 1,5 ppm del péptido SEQ ID nº5, de conformidad con el protocolo del ejemplo 2, durante 48 horas. Después, las biopsias de piel se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 µm de espesor. Los cortes se depositaron sobre láminas Superfrost Plus (Menzel Gläser, Thermo Scientific), después se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie de soluciones de alcohol-agua. A continuación, los cortes se tiñeron con hematoxilina al 50 % durante 3 min, se enjuagaron, y después se tiñeron con eosina al 60 %, durante 3 min y se enjuagaron con agua. Los cortes se deshidrataron, se montaron en Eukitt y se examinaron mediante microscopía óptica.

**[0088] Resultados:** los cortes histológicos de piel tratada con 0,5 ppm y 1,5 ppm del péptido SEQ ID nº5 muestran una mayor neosíntesis de las capas córneas. Todas las capas epidérmicas presentan menos células vacuoladas, así como una densidad celular mayor.

**[0089] Conclusión:** El péptido SEQ ID nº5 mejora la reconstrucción de la epidermis agredida.

#### **Ejemplo 5: Demostración del efecto regenerador del péptido SEQ ID nº5**

**[0090]** El objetivo de este estudio es determinar el efecto regenerador del péptido SEQ ID nº5 en los fibroblastos dérmicos y en la epidermis.

**[0091] Protocolo de utilización del modelo *in vitro* de regeneración fibroblástica lbidi:** Se utilizó el modelo de cicatrización *In vitro* lbidi (Biovalley, Marne la Vallée, Francia). Se cultivaron fibroblastos humanos en dos compartimentos separados de un inserto lbidi y después éste se depositó en una placa de cultivo. En confluencia, se retiró el inserto creando así una zona acelular de 400 µm de ancho entre las dos capas celulares. El péptido diluido al 1 % y al 3 % a partir de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5 se añadió entonces al medio de cultivo, y el tratamiento se llevó a cabo durante 48 horas con renovación del principio activo cada 24 horas. Se realizaron observaciones mediante microscopía de contraste de fase (microscopio Olympus CK40, x5, conectado a una cámara Olympus E-510) en distintos momentos (0 a 48 horas) durante el proceso de migración.

**[0092] Protocolo de estudio de la regeneración epidérmica:** Se pusieron en cultivo biopsias de piel humana en la interfaz aire/líquido. Se aplicó tópicamente una solución al 1 % de una solución madre que contenía 50 ppm del péptido SEQ ID nº5, después se incubaron las muestras durante 24 horas. A continuación, se incluyeron las biopsias de piel en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 µm de espesor. Los cortes se depositaron sobre láminas Superfrost Plus (Menzel Gläser, Thermo Scientific), después se desparafinaron en xileno y se

rehidrataron en una serie de soluciones de alcohol-agua. A continuación, los cortes se tiñeron con hematoxilina al 50 % durante 3 min, se enjuagaron, y después se tiñeron con eosina al 60 %, durante 3 min y se enjuagaron con agua. Después, los cortes se deshidrataron, se montaron en Eukitt y se examinaron mediante microscopía óptica.

5 Resultados:

**[0093]**

- i) La invasión por los fibroblastos de la zona acelular es más rápida cuando las células se tratan con 0,5 ppm y 1,5 ppm del péptido SEQ ID nº5, en comparación con las condiciones del control. El efecto depende de la dosis.
- 10 ii) Los cortes histológicos de la epidermis tratados con el péptido SEQ ID nº5 muestran una neosíntesis de la capa córnea, que aparece más gruesa y mejor hidratada. Se observa igualmente una mayor densidad de las células de la capa basal, que aparecen mejor orientadas en el eje vertical y más homogéneas.

Conclusiones: El péptido SEQ ID nº5 asegura una regeneración de los fibroblastos dérmicos y de la epidermis. Induce una mayor cohesión de las capas córneas.

**Ejemplo 6: Preparación de composiciones**

15 1 - Crema de protección solar:

**[0094]**

Nombres comerciales	Nombres INCI	% en peso
<b>FASE A</b>		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Pemulen TR1	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,40
Glicerina	Glycerin	3,00
Nipastat Sodium	Sodium Methylparaben (and) Sodium Ethylparaben (and) Sodium Butyl paraben (and) Sodium Propylparaben (and) Sodium Isobutylparaben	0,15
<b>FASE B</b>		
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnamate	7,50
Eusolex 4360	Benzophenone-3	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	2,00
Myritol 318	Caprylic/Capric Triglyceride	4,00
Emulgade SEV	Hydrogenated Palm Glycerides (and) Ceteareth-20 (and) Ceteareth-12 (and) Cetearyl Alcohol	5,00
Propilparabeno	Propylparaben	0,15
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
<b>FASE C</b>		
TEA	Triethanolamine	0,20
<b>FASE D</b>		
Péptido SEQ ID nº 5		3 ppm
Fragancia	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorante		qsp

- 20 **[0095]** Los componentes de la fase A y de la fase B se calientan por separado entre 70 °C y 75 °C. La fase B se emulsiona en la fase A con agitación. La fase C se añade, a 45 °C, aumentando la agitación. La fase D se añade después cuando la temperatura se sitúa por debajo de los 40 °C. Se continúa el enfriamiento hasta 25 °C con agitación vigorosa.

2-Crema antiedad:

**[0096]**

<i>Nombres comerciales</i>	<i>Nombres INCI</i>	<i>% en peso</i>
<b>Fase A</b>		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
Cetiol SB 45	Butyrospermum Parkii ( Shea Butter)	2,00

ES 2 558 314 T3

<b>Nombres comerciales</b>	<b>Nombres INCI</b>	<b>% en peso</b>
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Abil 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzima Q10	Ubiquinone	0,10
<b>Fase B</b>		
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,75
<b>Fase C</b>		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	qsp
Butilenglicol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Allantoin	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
<b>Fase D</b>		
TEA	Triethanolamine	0,18
<b>Fase E</b>		
Péptido SEQ ID n°5		0,5 ppm
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,50
Collaxyl	Water (and) Butylene Glycol (and) Hexapeptide-9	3,00
<b>Fase F</b>		
Fragancia	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorante		qsp

[0097] Preparar y fundir la fase A a 65-70 °C. Calentar la fase C a 65-70 °C. La fase B se añade a la fase A justo antes de emulsionar A en B. A aproximadamente 45 °C, el carbopol se neutraliza por adición de la fase D. La fase E se añade a continuación con agitación suave y se continúa el enfriamiento hasta 25 °C. Después se añade la fase F si se desea.

5

3 -Crema protectora de día:

[0098]

<b>Nombres comerciales</b>	<b>Nombres INCI</b>	<b>% en peso</b>
<b>Fase A</b>		
Emulium Delta	Cetyl alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-75 Stearate (and) Ceteth-20 (and) Steareth-20	4,00
Lanette O	Cetearyl Alcohol	1,50
D C 200 Fluid/100cs	Dimethicone	1,00
DUB 810C	Coco Caprylate/Caprato	1,00
DPPG	Propylene Glycol Dipelargonate	3,00
DUB DPHCC	Dipentaerythryl Hexacaprylate/Hexacaprate	1,50
Cegesoft PS6	Vegetable Oil	1,00
Vitamina E	Tocopherol	0,30
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,70
<b>Fase B</b>		
Agua desmineralizada	Aqua	qsp 100
Glicerina	Glycerin	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,15
Keltrol BT	Xanthan Gum	0,30
<b>Fase C</b>		

<b>Nombres comerciales</b>	<b>Nombres INCI</b>	<b>% en peso</b>
Hidroxido de sodio (sol.al 10 %)	Sodium Hydroxide	0,30
<b>Fase D</b>		
Agua desmineralizada	Aqua	5,00
Stay-C 50	Sodium Ascorbyl Phosphate	0,50
<b>Fase E</b>		
Butilenglicol	Butylene Glycol	2,00
Dekaben CP	Chlorphenesin	0,20
<b>Fase F</b>		
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,00
Péptido SEQ ID n°5		5 ppm

**[0099]** Preparar la fase A y calentar a 75 °C con agitación. Preparar la fase B dispersando el carbopol, después la goma xantana con agitación. Dejar reposar. Calentar a 75 °C.

5 **[0100]** A temperatura, emulsionar A en B con agitación rotor-estátor. Neutralizar con la fase C con agitación rápida. Después de enfriar a 40 °C, añadir la fase D y después la fase E. Se continúa el enfriamiento con agitación suave y se añade la fase F.

LISTA DE SECUENCIAS

**[0101]**

<110> ISP Investments INC.

10 <120> PÉPTIDO ACTIVADOR DE LA TRANSGLUTAMINASA Y COMPOSICIÓN COSMÉTICA O FARMACÉUTICA QUE LO CONTIENE

<130> Bv PCT 09-130

<150> 0904218

<151> 2009-09-04

15 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Péptido sintético

<400> 1

Val Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu  
1 5 10

25 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

30 <221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> AMIDACIÓN

<400> 2

35 Val Ala Arg Arg Gly Gln Pro Phe  
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

ES 2 558 314 T3

<213> Péptido sintético  
<400> 3

Ala Ala Arg Arg Gly Asn Pro  
1 5

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

10 <400> 4

Arg Arg Gly Gln  
1

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

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 5

Arg Arg Gly Gln  
1

25 <210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

30 <400> 6

Ala Ala Arg Arg Gly Asn  
1 5

35 <210> 7  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 7

Val Val Arg Arg Gly Gln  
1 5

45 <210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Péptido sintético

50 <400> 8

Ala Val Arg Arg Gly Asn  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Péptido de fórmula general (I):



en la que,

- 5 X<sub>1</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 X<sub>2</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 X<sub>3</sub> es glutamina o asparagina,  
 X<sub>4</sub> es prolina, valina o ningún aminoácido,  
 AA representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y n y p son números enteros comprendidos  
 10 entre 0 y 4,  
 R<sub>1</sub> representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático. El grupo aromático que sustituye la función amina primaria se puede seleccionar de un grupo de tipo benzoílo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,  
 15 R<sub>2</sub> representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, o un grupo NH<sub>2</sub>, NHY o NYY, representando Y una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

constando dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos, **caracterizado porque** corresponde a la secuencia (SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln-NH<sub>2</sub>.

- 20 **2.** Péptido de conformidad con la reivindicación anterior, **caracterizado porque** se utiliza como medicamento.
- 3.** Péptido de conformidad con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se solubiliza en uno o varios disolventes fisiológicamente adecuados seleccionados de entre agua, glicerol, etanol, propanodiol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 25 **4.** Composición cosmética o farmacéutica **caracterizada porque** comprende, en un medio fisiológicamente adecuado, el péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, como principio activo activador de la transglutaminasa humana, utilizado solo o en combinación con al menos otro principio activo.
- 30 **5.** Composición cosmética o farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizada porque** el principio activo es capaz de activar las transglutaminasas humanas de tipo 1, 2a, 2b, 3 o 5.
- 6.** Composición cosmética o farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizada porque** dicho péptido está presente en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,0005 y 500 ppm.
- 35 **7.** Composición cosmética o farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6, **caracterizada porque** dicho péptido está presente en una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm.
- 8.** Composición cosmética o farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones de la 4 a la 7, **caracterizada porque** está destinada a una administración por vía tópica.
- 9.** Composición cosmética o farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones de la 4 a la 8, **caracterizada porque** contiene, además, al menos otro principio activo que tiene propiedades protectoras o propiedades de antienvjecimiento seleccionado de entre principios activos antioxidantes, o que estimulan la síntesis de las macromoléculas dérmicas, o que estimulan el metabolismo energético.
- 40 **10.** Utilización cosmética de una composición que comprende un péptido de fórmula general (I):



en la que,

- 45 X<sub>1</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 X<sub>2</sub> es alanina, valina o ningún aminoácido,  
 X<sub>3</sub> es glutamina o asparagina,  
 X<sub>4</sub> es prolina, valina o ningún aminoácido,  
 AA representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y n y p son números enteros comprendidos  
 50 entre 0 y 4,  
 R<sub>1</sub> representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub> saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo

acetilo o un grupo aromático. El grupo aromático que sustituye la función amina primaria se puede seleccionar de un grupo de tipo benzoílo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,  $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$ , o un grupo  $NH_2$ ,  $NHY$  o  $NYY$ , representando  $Y$  una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ , constanding dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos seleccionada de una de las secuencias siguientes:

(SEQ ID nº4) Arg-Arg-Gly-Gln,  
(SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln- $NH_2$ ,

10 para reforzar la función de barrera de la epidermis y estimular la regeneración y la diferenciación epidérmica.

11. Utilización cosmética de una composición de conformidad con la reivindicación 10 para prevenir y combatir los signos cutáneos del envejecimiento y del fotoenvejecimiento.

12. Utilización cosmética de una composición de conformidad con la reivindicación 10 para proteger la piel y las faneras contra cualquier tipo de agresiones externas.

15 13. Péptido de fórmula general (I):



en la que,

$X_1$  es alanina, valina o ningún aminoácido,

$X_2$  es alanina, valina o ningún aminoácido,

20  $X_3$  es glutamina o asparagina,

$X_4$  es prolina, valina o ningún aminoácido,

$AA$  representa cualquier aminoácido, o un derivado del mismo, y  $n$  y  $p$  son números enteros comprendidos entre 0 y 4,

25  $R_1$  representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo de tipo acilo que tiene una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$  saturada o insaturada, pudiendo seleccionarse de un grupo acetilo o un grupo aromático. El grupo aromático que sustituye la función amina primaria se puede seleccionar de un grupo de tipo benzoílo, de tipo tosilo, o de tipo benciloxicarbonilo,

30  $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o sustituido por un grupo pudiendo seleccionarse de una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_{30}$ , o un grupo  $NH_2$ ,  $NHY$  o  $NYY$ , representando  $Y$  una cadena alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ ,

constando dicha secuencia de fórmula general (I) de 4 a 15 residuos de aminoácidos seleccionada de una de las secuencias siguientes:

(SEQ ID nº4) Arg-Arg-Gly-Gln,  
(SEQ ID nº5) Arg-Arg-Gly-Gln- $NH_2$ ,

35 como principio activo, utilizado solo o en combinación con al menos otro principio activo, en una composición farmacéutica destinada a prevenir o tratar las patologías **caracterizadas por** una alteración de la función de barrera seleccionadas de entre pieles hipersensibles, irritadas o reactivas y eccema atópica.

**FIGURA 1**

**Actividad transglutaminasa total en los queratinocitos humanos normales tratados con el péptido SEQ ID N°5 al 1 %**

