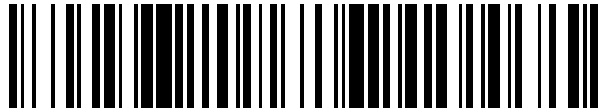


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 383**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12725474 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2705050**

54 Título: **Péptidos novedosos moduladores de la proteína TRF2 y composiciones que comprenden estos**

30 Prioridad:

02.05.2011 FR 1101348

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

25.05.2016

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

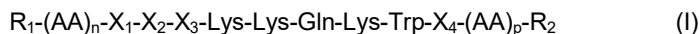
ES 2 571 383 T3

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

Péptidos novedosos moduladores de la proteína TRF2 y composiciones que comprenden estos

- 5 **[0001]** La presente invención se sitúa en el campo de la cosmética. Se refiere a compuestos peptídicos de la fórmula general (I) siguiente:



10

como compuestos moduladores de la proteína TRF2, teniendo así una acción protectora de los telómeros y una acción preventiva sobre las rupturas de doble cadena del ADN. Dichos compuestos peptídicos incluidos en una composición cosmética se destinan a prevenir y/o retardar y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento.

- 15 **[0002]** La senescencia es un proceso biológico al que llegan todas las células de las que «normalmente» está constituido un ser humano. Ello se traduce desde un punto de vista físico en un envejecimiento global del cuerpo humano, ya sean las células de la piel, del cabello, de los órganos...

- 20 **[0003]** Está demostrado científicamente que la senescencia está provocada principalmente por el acortamiento de los telómeros (senescencia replicativa) o por la exposición aguda o crónica a los signos de estrés fisiológicos como por ejemplo el estrés oxidativo. Uno de los medios que se ha explorado con el fin de limitar la senescencia de las células y, por consiguiente, limitar las manifestaciones del envejecimiento en el ser humano consiste en tratar el acortamiento de los telómeros y/o limitar la acción del estrés oxidativo en el ADN.

- 25 **[0004]** Los telómeros se forman a partir de repeticiones de la secuencia TTAGGG y de proteínas específicas. Los telómeros se sitúan en los extremos de los cromosomas y aseguran la estabilidad de estos. Entre las proteínas que se asocian a los telómeros se encuentran las proteínas TRF1 y TRF2 (TRF, siglas de *telomere-binding factor*) que se fijan directamente sobre el ADN telomérico de doble cadena, o incluso la proteína POT1 que se une al extremo 3' monocatenario. Durante las divisiones celulares, los motivos TTAGGG se pierden en el transcurso de la replicación. Esta pérdida de telómeros se compensa parcialmente por una transcriptasa inversa, la telomerasa, que sintetiza *de novo* las repeticiones teloméricas en los extremos de telómeros preexistentes, asegurando de este modo una longitud óptima. El problema que se plantea es que la actividad de dicha telomerasa es extremadamente débil en las células somáticas, lo que lleva a un acortamiento telomérico en cada replicación cromosómica. Una de las estrategias utilizada en la actualidad para limitar el envejecimiento de la piel así como su manifestación en esta consiste en el aumento de la actividad telomerasa de las células de la piel. No obstante, de este modo se expone a una inmortalización de dichas células, lo cual no es deseable puesto que las células inmortalizadas pueden asemejarse a las células cancerosas.

- 35 **[0005]** El solicitante ha explorado otra vía para tratar de retrasar la senescencia celular, modulando la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros y más en concreto la proteína TRF2. De este modo, la solicitante ha preparado unos compuestos peptídicos de la fórmula general (I) siguiente:



- 40 **[0006]** Dichos compuestos son capaces de prevenir y/o retrasar y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento mediante la modulación de la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF). Además, son útiles para prevenir la aparición de rupturas de doble cadena en el ADN de las células de la piel cuando se produzcan daños gracias a la modulación de la cantidad de proteínas TRF presentes en la célula.

- 50 **[0007]** Los compuestos moduladores de las proteínas TRF o incluso estabilizadores de los telómeros ya se han propuesto en el pasado, como se expone en las solicitudes de patente US20020076719, WO9836066 o incluso WO2004092395. Sin embargo, ninguno de los documentos citados anteriormente describe ni da a conocer los compuestos peptídicos expuestos en la presente solicitud de patente, ni el uso cosmético de dichos compuestos como agente que combate los signos cutáneos del envejecimiento.

55

[0008] Por tanto, la presente invención tiene por primer objeto un compuesto peptídico de la fórmula general siguiente (I):



60

según la reivindicación 1

[0009] La presente invención tiene por segundo objeto una composición cosmética que comprende, como principio activo, dicho compuesto peptídico de fórmula (I), según la reivindicación 1.

[0010] Además, la presente invención tiene por tercer objeto el uso cosmético de una composición que comprende dicho compuesto peptídico de fórmula (I) para prevenir y/o retrasar y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento. En concreto, dicha composición cosmética será útil (i) para modular la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF) y/o retrasar la senescencia de las células de la piel, (ii) para prevenir la aparición de rupturas de doble cadena en el ADN de las células de la piel cuando se produzcan daños, (iii), para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del fotoenvejecimiento de la piel y por último (iv) para proteger la piel de las agresiones externas.

[0011] Por último, la presente invención tiene por cuarto objeto un procedimiento de tratamiento cosmético de la piel o de sus faneras para tratarse por medio de la composición que comprende dicho compuesto peptídico de fórmula (I), o incluso un procedimiento de tratamiento cosmético por medio del péptido según la invención para limitar la degradación de los telómeros sin modificar la cantidad y/o actividad de la telomerasa.

[0012] Los compuestos peptídicos según la invención se caracterizan por el hecho de que:

- modulan la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF) y en concreto la proteína TRF2;
- limitan el aumento y la acumulación de la proteínas del citoesqueleto vimentina en las células que presentan un fenotipo de células envejecidas;
- limitan la aparición de daños en las biopsias de piel sometidas a metilglioxalo; y
- en conclusión, permiten prevenir y/o retrasar y/o tratar los signos de la senescencia en las células tratadas.

[0013] El primer objeto de la presente invención se refiere a un compuesto peptídico de fórmula general (I):



en el cual,

X_1 representa una asparagina, una glicina, una treonina, una alanina o ningún aminoácido,

X_2 representa una isoleucina, una leucina, una metionina, una prolina o ningún aminoácido,

X_3 representa una treonina, una asparagina, una serina o ningún aminoácido,

X_4 representa una serina, una cisteína, una treonina, una asparagina, una glutamina o ningún aminoácido,

AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 2,

R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en la cual uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada de tipo acetilo o por un grupo aromático de tipo benzoílo, tosilo o benciloxicarbonilo,

R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} o por un grupo NH_2 , NHY o NYN en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

estando constituida dicha secuencia de fórmula general (I) por 5 a 13 residuos de aminoácidos.

[0014] El término «compuesto peptídico» o «péptido» designa un encadenamiento de dos o varios aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por enlaces peptídicos modificados.

[0015] Por «compuesto peptídico» o «péptido» cabe entender el péptido natural o sintético de la invención del modo descrito anteriormente, o al menos uno de sus fragmentos, que se obtenga por proteólisis o de forma sintética, o incluso todo péptido natural o sintético cuya secuencia está total o parcialmente constituida por la secuencia del péptido anteriormente descrito.

[0016] Los aminoácidos que constituyen el compuesto peptídico según la invención pueden estar en una configuración levógira, es decir L-, y/o dextrógira, es decir D-. El péptido según la invención puede estar entonces en forma L-, D- o DL-.

[0017] Con el fin de mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido según la invención. Evidentemente, la forma de protección debe ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con un uso en el campo de la cosmética. Preferiblemente, para proteger la función amina primaria del aminoácido N-terminal se utiliza una sustitución por un grupo R_1 de tipo acilo que posee una cadena alquilo de C_1 a C_{30} , saturada o insaturada, pudiendo estar seleccionada de entre un grupo acetilo o un grupo aromático. Preferiblemente, para proteger la función carboxilo del aminoácido C-terminal se

utiliza una sustitución por un grupo R₂ de tipo cadena alquilo de C₁ a C₃₀, o un grupo NH₂, NHY o NYY en el que Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄.

5 **[0018]** El péptido según la invención puede estar protegido en el extremo N-terminal, C-terminal o en los dos extremos.

[0019] En una primera forma de realización de la invención, en la fórmula general (I), *n* y *p* son iguales a cero y la secuencia de fórmula general (I) está constituida por 5 a 9 residuos de aminoácidos. Por tanto, ello significa que en la fórmula general (I):

10

X₁ representa una asparagina, una glicina, una treonina, una alanina o ningún aminoácido,

X₂ representa una isoleucina, una leucina, una metionina, una prolina o ningún aminoácido,

15

X₃ representa una treonina, una asparagina, una serina o ningún aminoácido,

X₄ representa una serina, una cisteína, una treonina, una asparagina, una glutamina o ningún aminoácido,

20

los números enteros *n* y *p* son iguales a cero,

R₁ representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, -NH₂, en la cual uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ saturada o insaturada de tipo acetilo o por un grupo aromático de tipo benzoílo, tosilo o benciloxicarbonilo,

25

R₂ representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, -OH, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C₁ a C₃₀ o por un grupo NH₂, NHY o NYY en el que Y representa una cadena alquilo de C₁ a C₄,

30

estando constituida dicha secuencia de fórmula general (I) por 5 a 9 residuos de aminoácidos.

[0020] En una segunda forma de realización preferida, el compuesto peptídico corresponde a una de las fórmulas siguientes:

35

(SEQ ID n°1) Asn-Thr-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Thr-Asn-NH₂

(SEQ ID n°2) Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-NH₂

(SEQ ID n°3) Gly-Gly-Leu-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Asn-Leu-Tyr

(SEQ ID n°4) Ala-Met-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-NH₂

(SEQ ID n°5) Ala-Leu-Ser-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Gln

(SEQ ID n°6) Cys-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Ser-NH₂

40

[0021] La invención se refiere también a formas homólogas de dichas secuencias. El término «homólogo» designa, según la invención, a toda secuencia peptídica idéntica en al menos un 50 %, o preferiblemente al menos un 80 %, y todavía más preferiblemente en al menos un 90 % a dicha secuencia peptídica, seleccionada de entre las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 6. Por «secuencia peptídica idéntica en al menos un X %» se entiende que se designa a un porcentaje de identidad entre los residuos de aminoácidos de las dos secuencias que se comparan, obtenido tras el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo se obtiene por medio de algoritmos de homologías locales como los utilizados por el programa informático BLAST P disponible en el sitio web de la NCBI.

50

[0022] Del mismo modo, el término «homólogo» puede designar a un péptido que difiere de la secuencia de un péptido de secuencia SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 6 en la sustitución de aminoácidos químicamente equivalentes, es decir, en la sustitución de un residuo por otro que posea las mismas características. Así, las sustituciones clásicas se realizan entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

55

[0023] El péptido de fórmula general (I) según la invención puede obtenerse o bien por síntesis química clásica (en fase sólida o en fase homogénea líquida) o por síntesis enzimática (Kullmann *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1980; 225:8234) a partir de aminoácidos constitutivos o de sus derivados.

60

[0024] El péptido según la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferiblemente, según la invención, el péptido se obtiene por síntesis química.

[0025] Por último, el principio activo puede ser un péptido único, una mezcla de péptidos o de derivados peptídicos y/o estar constituido por derivados de aminoácidos.

[0026] Según una forma de realización ventajosa de la invención, el compuesto peptídico según la invención se solubiliza en uno o varios disolventes fisiológicamente adaptados, clásicamente utilizados por el experto en la materia, como el agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o toda mezcla de dichos disolventes.

[0027] Según incluso otra forma de realización ventajosa de la invención, el compuesto peptídico según la invención se solubiliza en un vector cosmético como los liposomas, o se absorbe sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como talcos y bentonitas, y más generalmente se solubiliza en, o se fija sobre, todo vector fisiológicamente adaptado.

[0028] El segundo objeto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende como principio activo dicho compuesto peptídico de fórmula general (I).

De forma preferida, las composiciones según la invención se presentan en una forma adaptada a la aplicación por vía tópica que comprende un medio cosméticamente aceptable. Por «cosméticamente aceptable» se entienden aquellos medios que sirven para utilizarse en contacto con la piel humana o sus faneras, sin riesgo de toxicidad, de incompatibilidad, de inestabilidad, de respuesta alérgica y similares. Las composiciones destinadas a su aplicación sobre la piel pueden presentarse en forma de crema, emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o emulsión múltiple, solución, suspensión, microemulsión, gel acuoso o anhidro, sérum, o incluso de dispersión de gotas, de parche, pulverizador, ungüento, pomada, loción, coloide, leche, barra o incluso de polvo, todos adaptados a una aplicación sobre la piel, los labios y/o las faneras.

[0029] Preferiblemente, dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre 0,1 y 500 ppm, y preferiblemente en una concentración comprendida entre 1 y 150 ppm.

[0030] Todavía más preferiblemente, la composición según la invención contiene además al menos otro principio activo. Se puede citar, de forma no limitante, los siguientes ingredientes: hidrolizados peptídicos procedentes de vegetales, otros compuestos peptídicos, filtros solares, agentes antirradicales o incluso agentes antiarrugas. Del mismo modo se puede citar, por ejemplo, la vitamina C y sus derivados, las vitaminas del grupo B, la DHEA (dehidroepiandrosterona), los fitoesteroles, el ácido salicílico y sus derivados, los retinoides, los flavonoides, los aminoazúcares, los azoles, las sales metálicas o incluso los polímeros.

[0031] La composición puede comprender además agentes cicatrizantes, antienvjecimiento, antiarrugas, calmantes, agentes hidratantes, antiinflamatorios, agentes que modulan la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, etc.

[0032] En una forma de realización más concreta, la composición según la invención comprenderá, además del compuesto peptídico de fórmula (I):

- un compuesto (o varios) activador del citocromo c, y/o;
- un compuesto (o varios) activador de las acuaporinas y/o;
- un compuesto (o varios) activador de las sirtuinas y/o;
- un compuesto (o varios) que aumente la adhesión celular y/o;
- un compuesto (o varios) que aumente la producción de proteínas matriciales tipo colágeno, laminina, etc.;
- un compuesto (o varios) modulador de las proteínas hsp;
- un compuesto (o varios) que aumente la energía celular;
- un compuesto (o varios) que mejore la función barrera de la piel;
- un compuesto (o varios) que mejore la sincronización de las células, como por ejemplo los agentes moduladores de las proteínas Clock, Per1 o Bmal;
- un compuesto (o varios) protector de la mitocondria.

[0033] Dichos compuestos de arriba pueden ser naturales, como los hidrolizados peptídicos o no peptídicos de vegetales, o incluso de origen sintético, como los compuestos peptídicos.

[0034] Asimismo, pueden añadirse a la composición aditivos tales como disolventes, diluyentes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, absorbentes de olores, agentes espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, perfumes, antioxidantes, agentes filmógenos, quelantes, secuestrantes y acondicionadores.

[0035] En todos los casos, el experto en la materia cuidará por que dichos adyuvantes así como sus proporciones se seleccionen de modo que no resulten perjudiciales para las propiedades ventajosas investigadas de la composición según la invención. Dichos adyuvantes pueden estar, por ejemplo, comprendidos entre un 0,01 y un 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención sea una emulsión, la fase grasa puede representar de 5 a 80 % en peso, y preferiblemente de 5 a 50 % en peso con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición se seleccionarán de

entre aquellos clásicamente utilizados en el campo considerado. Por ejemplo, pueden utilizarse en una proporción que vaya de 0,3 a 30 % en peso con respecto al peso total de la composición.

5 **[0036]** Un tercer objeto de la invención se refiere al uso cosmético de una composición que comprende dicho compuesto peptídico en un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o retrasar y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento. Los «signos cutáneos del envejecimiento» incluyen, pero no están limitados a, todas las manifestaciones visibles en la piel provocadas por el envejecimiento. Se entiende, en particular, las arrugas, las arrugas profundas y gruesas, las pequeñas arrugas, hendiduras, la distensión de los tejidos cutáneos y subcutáneos, la pérdida de elasticidad cutánea y la atonía, la pérdida de firmeza y tonicidad y la atrofia dérmica. Además, se entiende también por «signos cutáneos del envejecimiento» los poros dilatados, las imperfecciones, la decoloración, las manchas de la vejez, las queratosis, la pérdida de colágeno y otros cambios de la dermis y la epidermis, así como toda modificación del aspecto exterior de la piel y de sus faneras debida al envejecimiento como, por ejemplo, las rugosidades superficiales de la capa córnea, así como toda modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente por un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis.

10 **[0037]** En una primera forma de realización de la invención, dicha composición cosmética permite modular la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF) y/o retrasar la senescencia en las células de la piel. Por «modular la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF)» se entiende el aumento o incluso la disminución de la cantidad de proteínas TRF presentes en las células, o bien por aumento/disminución de la síntesis proteica de estas (por modulación directa o indirecta de la expresión génica), o por medio de otros procesos biológicos como la estabilización/desestabilización de las transcripciones de ARN mensajero. Preferiblemente, las proteínas TRF se representan por medio de las proteínas TRF2 y/o POT1.

20 **[0038]** En una segunda forma de realización preferible de la invención, la composición cosmética se utiliza para prevenir la aparición de rupturas de doble cadena en el ADN de las células de la piel cuando se produzcan daños. En efecto, cuando se produzcan daños a las células de la piel, particularmente daños provocados por las radiaciones UV o incluso el estrés oxidativo, el ADN de dichas células es susceptible de sufrir daños que se manifiestan por las rupturas de doble cadena. Los compuestos peptídicos según la invención han demostrado su acción protectora del ADN frente a dicho tipo de daños.

25 **[0039]** Otro uso del péptido según la invención consiste en prevenir y/o tratar los signos cutáneos del fotoenvejecimiento de la piel. Por «fotoenvejecimiento» se entiende el envejecimiento prematuro de la piel causado por la exposición prolongada y acumulada al sol.

30 **[0040]** El péptido según la invención puede utilizarse del mismo modo para proteger la piel de las agresiones externas. Por «agresiones externas» se entienden las agresiones que puede producir el medio ambiente. A modo de ejemplo, se pueden citar agresiones como la contaminación, las radiaciones UV, las agresiones que provocan estrés oxidativo, o incluso los productos irritantes como los tensioactivos, los conservantes o los perfumes, las agresiones mecánicas como las abrasiones, el afeitado o la depilación. No obstante, preferiblemente, las agresiones externas están constituidas principalmente por las radiaciones UV, y en particular las UVB y las agresiones que inducen el estrés oxidativo.

35 **[0041]** Por último, un último objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético caracterizado por la aplicación por la mañana y noche sobre la piel de una composición que comprende una cantidad eficaz de compuesto peptídico como se ha definido anteriormente, para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento. En otra forma de realización de la presente invención, se trata de establecer un procedimiento de tratamiento cosmético de la piel por medio de una composición según la invención, para limitar la degradación de los telómeros sin modificar la cantidad y/o la actividad de la telomerasa. En efecto, el péptido según la invención permite estabilizar y/o limitar la degradación de los telómeros sin que por ello se intervenga en la actividad y/o la cantidad de telomerasa, lo cual es importante puesto que de ese modo no habrá riesgo alguno de inmortalización de las células.

40 **[0042]** Los ejemplos siguientes describen y demuestran la eficacia de compuestos peptídicos como los descritos según la invención, pero no deben interpretarse como una limitación de la presente invención.

Ejemplo 1: estudio del efecto del péptido SEQ ID n.º 2 sobre los fibroblastos envejecidos por senescencia replicativa

45 **[0043]** Se ponen fibroblastos humanos en cultivo en un medio específico y se mantienen en cultivo en un tratamiento prolongado (durante más de 17 pasos) con una aplicación diaria del péptido SEQ ID n.º 2 a una concentración de 1 % o de 3 %. Se lleva a cabo una prueba de detección por inmunofluorescencia de la vimentina sobre las células en los pasos de cultivo 6 y 17. A continuación, las células se lavan con PBS, se fijan con formaldehído a 3,7 % durante 10 minutos, se permeabilizan por medio de 0,2 % de Triton X-100 durante 10 minutos (Fisher Chemical) y se incuban con un 1 % de BSA (Euromedex) durante 15 minutos. Se añade más

adelante un anticuerpo antivimentina (Tebu Santa Cruz) y se incuba con una disolución de 1/200° durante 2 h a temperatura ambiente. Tras el lavado con PBS, un anticuerpo antirratón Donkey IgG, conjugado con un marcador Alexa Fluor® 488 se añaden a una disolución de 1/1000° y se dejan incubar durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se montan con Fluoromount G (Electron Microscopy Science) y se examinan por medio de un microscopio (Nikon Eclipse 80i, aumento 40x).

Resultados/conclusiones:

[0044] Se observa que los fibroblastos envejecidos tratados con péptido SEQ ID n.º 2 expresan menos vimentina que los fibroblastos envejecidos no tratados. No obstante, el aumento y acumulación de la vimentina se asocia a las modificaciones del citoesqueleto que acompañan al fenómeno del envejecimiento. Por tanto, se puede concluir que el tratamiento con el compuesto peptídico SEQ ID n.º 2 según la invención ha permitido limitar el aumento y acumulación de la vimentina provocados por el envejecimiento de los fibroblastos.

Ejemplo 2: estudio del efecto del péptido SEQ ID n.º 4 sobre un modelo de biopsias senescentes *in vitro* con metilglioxal

[0045] Las biopsias de piel humana se hacen senescentes artificialmente *in vitro* gracias a un tratamiento con metilglioxal (MGO). Para ello, se ponen a incubar sacabocados de 6 mm de biopsias de piel humana en la interfaz aire/líquido en un medio de cultivo específico. A continuación se tratan con 5 mM o 10 mM de MGO (Sigma) depositado en la superficie de las biopsias y en el medio de cultivo. Las biopsias se tratan más adelante con:

- condición 1: 20 µL de PBS IX, o bien
- condición 2: 20 µL de péptido SEQ ID n.º 4 a un 1 %, o bien
- condición 3: 20 µL de péptido SEQ ID n.º 4 a un 3 %.

[0046] Las biopsias se fijan y se incluyen en parafina, y a continuación se cortan en secciones de 4 µm con un micrótopo. Se realiza un inmunomarcado de hematoxilina/eosina (H&E) sobre las secciones cortadas anteriormente y se estudia su morfología y estructura por observación microscópica (con un microscopio Nikon Eclipse E600, objetivo 40x).

Resultados/conclusiones:

[0047] En la condición control 1, es decir sin añadir un péptido, se observa que el MGO ha provocado daños importantes en las biopsias de piel, más concretamente en la estructura de estas. Los daños provocados dependen de la dosis, puesto que se observan mayores daños con la cantidad de 10 µM de MGO.

[0048] Cuando las biopsias se tratan con un compuesto peptídico SEQ ID n.º 4, se observa que los daños producidos a las estructuras de dichas biopsias son mucho menos importantes que en las condiciones control. Se observa que el efecto protector del péptido depende de la dosis puesto que se observan incluso menos daños con la dosis de 3 % que con la dosis de 1 %.

[0049] Así, se puede concluir que el péptido SEQ ID n.º 4 tiene un efecto protector de las estructuras celulares cuando estas se someten a estrés que produce daños importantes y una senescencia precoz.

Ejemplo 3: estudio de la expresión de la proteína TRF2 por siRNA en los fibroblastos humanos tratados con el péptido SEQ ID n.º 2

[0050] Para medir la eficacia de un compuesto peptídico según la invención, en la sobreexpresión de TRF2 en una población de fibroblastos humanos, el gen que codifica TRF2 se ha «apagado» por el uso de la técnica de siRNA.

Protocolo:

[0051] Las células fibroblastos se ponen en cultivo en una placa de 6 pocillos hasta una confluencia de un 60 %. El medio de cultivo se renueva añadiendo el péptido SEQ ID n.º 2 a 1 % en las condiciones descritas a continuación. A continuación, 100 µL de una mezcla hecha previamente que contiene al final el siRNA de TRF2 a 10 nM y el agente transfectante se añaden cuidadosamente gota a gota, pocillo por pocillo. La placa de cultivo celular se incuba a 37 °C y a 5 % en CO₂ durante 72 h. El medio de cultivo se renueva cada 2 días. Se establecen cuatro condiciones:

- condición 1: control sin siRNA y sin el activo

- condición 2: células transfectadas con siRNA, sin el activo
- condición 3: células no transfectadas pero tratadas con el activo
- condición 4: células transfectadas con siRNA y tratadas con el activo

5 **[0052]** La cuantificación de la expresión de TRF2 se observa por medio de la técnica clásica de inmunotransferencia (Western Blot) realizada con un anticuerpo anti-TRF2 y siguiendo un protocolo clásico. Para analizar la compensación proporcionada por el péptido en los fibroblastos que han sido transfectados con el siRNA, la comparación se realizará con respecto a los fibroblastos no tratados y cuyo gen no haya sido apagado por el siRNA.

10

Resultados/conclusiones:

15 **[0053]** Entre las condiciones 1 y 3, se observa que la adición del péptido ha conllevado un aumento de la expresión de la proteína TRF2 de un 17 % con respecto al control. Entre las condiciones 1 y 2, se observa claramente el efecto del siRNA en la expresión de la proteína TRF2: en efecto, esta se ha reducido en un 26 %. En cambio, la adición del activo a las células transfectadas con el siRNA permite restaurar la expresión de TRF2, y la disminución a consecuencia de la presencia de siRNA no es superior a un 18 % con respecto a la condición control.

20 **[0054]** En conclusión, el activo según la invención ha permitido compensar la disminución de la expresión de la proteína TRF2 (disminución inducida por el siRNA específico) en los fibroblastos tratados.

Ejemplo 4: composición de una crema antienvjecimiento para el rostro

25 **[0055]**

<i>Nombres comerciales</i>	<i>Denominación INCI</i>	<i>% en peso</i>
Fase A		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
ISP Bonjour Refined shea butter	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Si-tecDM350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzima Q 10	Ubiquinone	0,10
Fase B		
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Optiphen	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	1
Fase C		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	c.s.p.
Butylene Glycol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Allantoin	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
Fase D		
TEA	Triethanolamine	0,18
Fase E		
Péptido SEQ ID n.º5		3 mg/kg
<i>Nombres comerciales</i>	<i>Denominación INCI</i>	<i>% en peso</i>
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,50
Collaxyl	Water (and) Butylene Glycol (and) Hexapeptide-9	3,00

<i>Nombres comerciales</i>	<i>Denominación INCI</i>	<i>% en peso</i>
Fase F		
Perfume	Parfum (Fragrance)	c.s.p.
Colorante		c.s.p.

5 **[0056]** 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 C. A alrededor de 45°C, el carbomer se neutraliza por medio de la adición de la fase D. A alrededor de 30 °C, la fase E se añade a continuación bajo una agitación ligera y se continúa con el enfriamiento hasta 25 °C. La fase F se añade entonces si así se desea.

SEQUENCE LISTING

[0057]

<110> ISP Investments Inc

10 <120> PEPTIDOS NOVEDOSOS MODULADORES DE LA PROTEINA TRF2 Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN ESTOS

<130> Bv PCT 11-153

<150> FR1101348

<151> 2011-05-02

<160> 6

15 <170> PatentIn version 3.5

<210>1

<211>9

<212>PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221>MOD_RES

<222>(9)..(9)

25

<223> AMIDATION

<400> 1

Asn Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Asn
1 5

<210>2

<211>5

30

<212>PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

35

<221>MOD_RES

ES 2 571 383 T3

<222>(5)..(5)
<223> AMIDATION

<400>2

Lys Lys Gln Lys Trp
1 5

5 <210>3
<211>11
<212>PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> synthetic peptide

<400>3

Gly Gly Leu Lys Lys Gln Lys Trp Asn Leu Tyr
1 5 10

<210>4
<211>7
15 <212>PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

<220>
20 <221>MOD_RES
<222>(7)..(7)
<223> AMIDATION

<400>4

Ala Met Lys Lys Gln Lys Trp
1 5

25 <210>5
<211>9
<212>PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> Synthetic peptide

<400>5

Ala Leu Ser Lys Lys Gln Lys Trp Gln
1 5

<210>6
<211>7
35 <212>PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic peptide

ES 2 571 383 T3

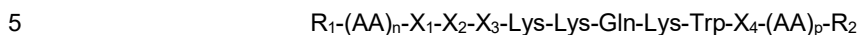
<220>
<221>MOD_RES
<222>(7)..(7)
<223> AMIDATION

5 <400>6

Cys Lys Lys Gln Lys Trp Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico de la fórmula general (I) siguiente:



en la cual,

- 10 X_1 representa una asparagina, una glicina, una treonina, una alanina o ningún aminoácido,
 X_2 representa una isoleucina, una leucina, una metionina, una prolina o ningún aminoácido,
 X_3 representa una treonina, una asparagina, una serina o ningún aminoácido,
15 X_4 representa una serina, una cisteína, una treonina, una asparagina, una glutamina o ningún aminoácido,
AA representa un aminoácido cualquiera, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 2,
20 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, $-NH_2$, en la cual uno de los dos átomos de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} saturada o insaturada de tipo acetilo o por un grupo aromático de tipo benzoilo, tosilo o benciloxycarbonilo,
25 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, $-OH$, en el que el átomo de hidrógeno puede estar sustituido o no sustituido, bien por una cadena alquilo de C_1 a C_{30} o por un grupo NH_2 , NHY o $NY Y$ en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

estando constituida dicha secuencia de fórmula general (I) por 5 a 13 residuos de aminoácidos, **caracterizado por que** se corresponde con una de las fórmulas siguientes:

- 30 (SEQ ID n°1) Asn-Thr-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Thr-Asn- NH_2 ;
(SEQ ID n°2) Lys-Lys-Gln-Lys-Trp- NH_2 ;
(SEQ ID n°3) Gly-Gly-Leu-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Asn-Leu-Tyr;
(SEQ ID n°4) Ala-Met-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp- NH_2 ;
(SEQ ID n°5) Ala-Leu-Ser-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Gln;
35 (SEQ ID n°6) Cys-Lys-Lys-Gln-Lys-Trp-Ser- NH_2 .

2. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se solubiliza en uno o varios disolventes fisiológicamente adaptados seleccionados de entre agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o toda mezcla de dichos disolventes.
40 3. Composición cosmética que comprende como principio activo dicho compuesto peptídico según una de las reivindicaciones 1 o 2 y un medio cosméticamente aceptable.
45 4. Composición según la reivindicación 3, **caracterizada por que** se presenta en una forma adaptada a la aplicación por vía tópica seleccionada entre una crema, emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o emulsión múltiple, solución, suspensión, microemulsión, gel acuoso o anhidro, sérum, dispersión de gotas, parche, pulverizador, ungüento, pomada, loción, coloide, leche, barra o incluso polvo.
50 5. Composición según una de las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizada por que** dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre 0,1 y 500 ppm.
6. Composición según la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre 1 y 150 ppm.
55 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizada por que** contiene además al menos otro principio activo seleccionado entre hidrolizados peptídicos procedentes de vegetales, otros compuestos peptídicos, filtros solares, agentes antirradicales o incluso agentes antiarrugas.
60 8. Uso cosmético de una composición según una de las reivindicaciones 3 a 7 para prevenir y/o retrasar y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento.

9. Uso cosmético según la reivindicación 8 para ajustar la cantidad de proteínas asociadas a los telómeros (TRF) y/o retrasar la senescencia en las células de la piel.
- 5 10. Uso cosmético según la reivindicación 9, **caracterizado por que** las proteínas asociadas a los telómeros están representadas por TRF2 y/o POT1.
11. Uso cosmético según la reivindicación 8 para prevenir la aparición de rupturas de doble cadena en el ADN de las células de la piel cuando se produzcan daños.
- 10 12. Uso cosmético según la reivindicación 8, **caracterizado por que** los signos cutáneos del envejecimiento son las arrugas, las arrugas profundas y gruesas, las pequeñas arrugas, hendiduras, la distensión de los tejidos cutáneos y subcutáneos, la pérdida de elasticidad cutánea y la atonía, la pérdida de firmeza y tonicidad y la atrofia dérmica.
- 15 13. Uso cosmético según la reivindicación 8 para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del fotoenvejecimiento de la piel.
14. Uso cosmético según la reivindicación 8 para proteger la piel de las agresiones externas.
- 20 15. Uso cosmético según la reivindicación 14, **caracterizado por que** las agresiones externas son las radiaciones UV, o incluso el estrés oxidativo.
- 25 16. Procedimiento de tratamiento cosmético **caracterizado por que** se aplica, por la mañana y noche en la piel, una composición que comprende una cantidad eficaz de compuesto peptídico tal y como se define en una de las reivindicaciones 1 o 2, para prevenir y/o tratar los signos cutáneos del envejecimiento.
- 30 17. Procedimiento de tratamiento cosmético **caracterizado por que** se aplica de forma regular una composición que comprende una cantidad eficaz de compuesto peptídico tal y como se define en una de las reivindicaciones 1 o 2 para limitar la degradación de los telómeros sin modificar la cantidad y/o la actividad de la telomerasa.