(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 573 291**

(51) Int. CI.:

A61K 8/44 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61N 5/06 (2006.01)
A61N 5/067 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2008 E 08826887 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2178496**

(54) Título: **Utilización de luz verde para activar la L-aminoácido oxidasa**

(30) Prioridad:

16.07.2007 FR 0756506
25.10.2007 US 982455 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2016

(73) Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR

(72) Inventor/es:

LABOUREAU, JULIEN y
NGUYEN, QUANG LAN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Utilización de luz verde para activar la L-aminoácido oxidasa

La presente invención se refiere al campo del cuidado de la piel y del cabello y, en particular, a la mejora del equilibrio fisiológico de la piel y del cabello y la prevención y/o el tratamiento de su envejecimiento.

La presente invención se refiere más específicamente a la utilización de una fuente de luz verde para activar la L-aminoácido oxidasa en presencia de al menos un sustrato de esta enzima a fin de estimular el metabolismo energético de las células de la piel, estimular su renovación y así mejorar la apariencia de la piel y del cabello, en particular prevenir y/o tratar los síntomas cutáneos del envejecimiento de la piel y del cabello.

La invención se refiere también a una composición que comprende al menos un sustrato de la enzima y al menos una sustancia particular capaz de emitir luz verde, a un kit que comprende una composición a base de una sustancia que emite luz verde y una composición que comprende al menos un sustrato de dicha enzima y a un procedimiento cosmético que utiliza las composiciones o kits según la invención.

La piel es un órgano externo del cuerpo constantemente sometido a las agresiones del entorno exterior, tales como las radiaciones del sol, los contaminantes atmosféricos...

Estos factores exteriores, y también el declive progresivo de las diferentes funciones del organismo durante el envejecimiento contribuyen a una acumulación de componentes celulares dañados (ácido nucleico, lípidos, proteínas) cuya eliminación y/o reparación deberá ser asegurada por la célula.

La formación de componentes dañados se efectúa principalmente por unas reacciones que implican unas especies reactivas del oxígeno, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo. A ello también contribuyen otras reacciones que implican la fijación sobre las macromoléculas de glúcidos o de aldehídos procedentes de la peroxidación lipídica (Friguet B. Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux, Mécanismes biochimiques).

Conservar una apariencia joven y/o una piel sana conduce a la búsqueda incesante de nuevos compuestos y/o de nuevas composiciones que permiten mantener o mejorar la apariencia de la piel.

Esto es lo que consiguió la solicitante asociando la aplicación de una composición que comprende al menos un sustrato de L-aminoácido oxidasa y la exposición a una luz verde que tiene por efecto activar la enzima L-aminoácido oxidasa.

Se conoce utilizar las radiaciones luminosas para el tratamiento de la piel. Para ello, se pueden citar:

- los láseres que son unas radiaciones electromagnéticas de 532 nm de longitud de onda y que se utilizan en particular para tratar los fenómenos de telangiectasia o de hiperpigmentación relacionadas con la edad (Robert *et al.*, 2003). Varios trabajos han mostrado que los láseres emitidos a la longitud de onda de 1064 nm mejoran la regeneración cutánea. Los láseres aplicados de manera pulsada a 585-595 nm mejoran claramente las arrugas localizadas a nivel de la región peri-orbital.

- la IPL (intense pulsed light): las radiaciones electromagnéticas de ancho espectro comprendido entre 500 y 1200 nm (IPL) se han descrito ampliamente para mejorar los fenómenos de envejecimiento. La utilización de filtros específicos permite aislar unas longitudes de ondas y conservar sólo las radiaciones electromagnéticas adaptadas a los tipos de tratamientos deseados. Se ha mostrado que la emisión simultánea de radiaciones amarrillas rojas e infrarrojas permite regular varias actividades biológicas diferentes y así regular diversas alteraciones relacionadas con el foto-envejecimiento.

- las radiaciones infrarrojas: varios trabajos han mostrado el efecto de una irradiación infrarroja de ancho espectro sobre la biología de la piel. Se ha descrito en particular que la absorción de los infrarrojos por las moléculas de agua del tejido induce un aumento localizado de calor a nivel de la dermis provocando un aumento de síntesis de moléculas matriciales y en particular de colágeno. Más recientemente, se ha mostrado que una irradiación con infrarrojos protege los fibroblastos de la dermis del efecto deletéreo de una irradiación con UV. En estos trabajos, los autores muestran que esta protección pasa por la regulación de una proteína mitocondrial, el citocroma C (Menezes *et al.*, 1998).

- Cada vez más equipos científicos buscan determinar el mecanismo de acción biológico de la LED. Se ha mostrado en particular que la LED, teniendo como diana unos fotorreceptores (cromóforos) activa la cadena de óxidorreducción localizada a nivel de la membrana mitocondrial. Esta estimulación conduciría entonces a nivel de los fibroblastos a la producción de proteínas fibrilares, los colágenos y la elastina, y a la disminución de la expresión de las metaloproteinasas MMPs (Robert *et al.*, 2003). En un reciente estudio, se ha mostrado por Vinck *et al.*, 2005 que la irradiación por una fuente de LED a 570 nm induce un aumento de la proliferación de los fibroblastos.

La solicitante ha descubierto, de manera sorprendente e inesperada, que la aplicación sobre la piel de un sustrato de L-aminoácido oxidasa acompañada de una emisión de luz verde conducía a una actividad incrementada de esta enzima y presentaba unos efectos ventajosos sobre la estimulación y la regulación de la actividad fisiológica de la piel.

La L-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.2) pertenece a la familia de los aminoácidos oxidasas. Las enzimas aminoácidos oxidasas están presentes en los diferentes tipos celulares de la piel.

Catalizan la transformación de las funciones aminas en funciones cetónicas. La transformación de un aminoácido por estas enzimas da por lo tanto lugar al compuesto cetoácido correspondiente.

La solicitante ha puesto ahora en evidencia que la luz verde tenía la propiedad de aumentar la actividad de la L-aminoácido oxidasa.

Los aminoácidos son unos combustibles que, después de la transformación en el citoplasma de la célula, entran en las mitocondrias para ser degradados.

La alanina, en particular, puede dar directamente lugar al piruvato por desaminación oxidativa catalítica con L-aminoácido oxidasa.

$$\text{L-alanina} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{L-aminoácido oxidasa}} \text{L-piruvato} + NH_3 + H_2O_2$$

En la mitocondria, el piruvato se transforma en ATP, principal fuente energética de la célula.

Entre los compuestos cetoácidos, se cuenta en particular con el piruvato, o también el acetoacetato.

La formación del acetoacetato puede también ser inducida por desaminación oxidativa según el mismo principio que el citado anteriormente a partir del aminobutirato.

$$\alpha\text{ aminobutirato} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{L-aminoácido oxidasa}} \text{acetoacetato} + NH_3 + H_2O_2$$

La invención tiene por lo tanto por objeto la utilización de luz verde para activar la L-aminoácido oxidasa en presencia de al menos uno de sus sustratos.

Tal utilización tiene por efecto aumentar el potencial de fosforilación que activa unas señales que conducen a la expresión de genes y activar el metabolismo de las células de la piel, en particular de los fibroblastos, de los queratinocitos y de los melanocitos, activar y regular la fisiología de estas células en particular disminuyendo la formación y estimulando la eliminación de componentes celulares dañados, y en particular componentes que resultan del estrés oxidativo.

Una consecuencia de este efecto es mejorar la renovación de las células de la dermis y de la epidermis y así la regeneración cutánea.

La utilización según la invención permite por lo tanto dar a la piel y al cabello un aspecto saludable, es decir homogeneizar el tono de la piel, reavivar su brillo, evitar su aspecto amarillo o apagado; prevenir y/o tratar las manchas cutáneas; atenuar las irregularidades visibles y/o táctiles de la superficie de la piel, dándole un relieve más uniforme y alisarla, prevenir y/o tratar las arrugas y patas de gallo; volver a dar más espesor y elasticidad a la piel, en particular para las zonas en las que la piel esté más flácida, por ejemplo en el contorno facial o en el cuello.

La utilización según la invención permite también luchar contra las alteraciones de la piel relacionadas con el envejecimiento, prevenir y/o tratar los síntomas cutáneos del envejecimiento de la piel y los síntomas del envejecimiento del cabello; mejorar la cicatrización.

En particular, la utilización según la invención permite aumentar la síntesis de las macromoléculas matriciales de la dermis (fibrillas de colágeno, GAG, fibras elásticas), y evitar su degradación, evita también la alteración de la homeostasis epidérmica.

Por signos cutáneos del envejecimiento de la piel, se entiende en particular una flacidez de la piel, la aparición de arrugas, de manchas cutáneas, o un amarilleamiento del tono de la piel.

Por signos del envejecimiento del cabello, se entiende en particular la caída del cabello, la disminución de su crecimiento, su encanecimiento, la disminución de su diámetro y de su vigor.

La realización de la invención se lleva a cabo mediante la administración simultánea o espaciada de una composición que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa y de la luz verde sobre la zona en la que dicha composición se ha aplicado.

Los sustratos de la L-aminoácido oxidasa utilizables según la invención son los aminoácidos o una molécula que comprende una función amina, siendo el sustrato de manera tal que comprende un carbono en la posición alfa del grupo ácido y un grupo de amina primaria, más particularmente, se trata de los L-aminoácidos.

Dicho sustrato se selecciona entre la leucina, la serina, la treonina, la glicina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la tirosina, la lisina, la arginina, la cisteína, el aspartato, el glutamato, la citrulina, la ornitina, el ácido diaminopimélico, la penicilamina, el ácido α-aminobutírico.

Preferentemente, la invención se realiza con la alanina, la glicina, el ácido α-aminobutírico, la lisina, la leucina, la serina y la treonina.

Los aminoácidos podrán ser formulados en forma de sales, tales como las sales sódicas o alcalinotérreas (por ejemplo manganeso o calcio).

Según un modo preferido, la invención se realiza con la ayuda de una composición tópica que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa.

Por composición tópica, se entiende una composición destinada a una aplicación local sobre cualquier superficie del cuerpo, incluyendo la piel, las mucosas o semi-mucosas, el cuero cabelludo.

Las composiciones útiles según la invención son en particular unas composiciones cosméticas o dermatológicas.

La composición comprende generalmente un medio fisiológicamente aceptable, es decir compatible con la piel y/o sus faneras. Se trata preferentemente de un medio cosméticamente aceptable, es decir que presenta un olor, un color y un tacto agradables y que no genera molestias (picores, enrojecimientos, tiranteces) inaceptables, susceptibles de disuadir al consumidor del uso de esta composición.

La composición tópica según la invención comprende una cantidad eficaz de sustrato (aminoácido) seleccionada también en función de la solubilidad del aminoácido en la fórmula considerada, esta cantidad de sustrato de la L-aminoácido oxidasa está preferiblemente comprendida entre el 0,001 y el 10%, de manera más preferida aún entre el 0,01 y el 1%.

Según la zona del cuerpo objetivo y la intensidad de aplicación deseada, el experto en la materia podrá seleccionar entre diferentes formas de composición:

- una composición destinada a permanecer aplicada sobre la piel incluso después de la exposición a la luz verde, esta composición puede ser una dispersión de tipo loción o gel, una emulsión de consistencia líquida o semi-líquida de tipo leche, obtenida por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H), o una suspensión o emulsión de consistencia blanda, semi-sólida o sólida de tipo crema o gel, o también unas emulsiones múltiples (E/H/E o H/E/H), una microemulsión, una dispersión vesicular de tipo iónico y/o no iónico, o una dispersión cera/fase acuosa;

- una composición que permanece en contacto con la piel sólo durante el tiempo de la exposición a la luz verde, tal como una máscara, en forma de crema que el usuario puede aplicar específicamente sobre las zonas a tratar y después se retira, un parche empapado de un sustrato; en esta forma de administración, las máscaras o parches deben ser suficientemente transparentes para dejar pasar la luz verde.

En el ámbito de la presente invención, cualquier fuente de luz de color verde que emite a una longitud de onda tal que activa la L-aminoácido oxidasa, puede estar comprendida entre 500 y 580 nm, preferentemente entre 500 y 560 nm.

Se pueden citar en particular:

- los láseres (por Light Amplification by the Stimulated emission of Radiation), se trata de una fuente luminosa de muy alta intensidad y monocromática.

A diferencia de la luz blanca (fotones de diversas longitudes de onda emitidas de manera anárquica en diferentes instantes y en direcciones diferentes), la radiación luminosa emitida por un láser es una luz constituida de fotones emitidos al mismo tiempo y en la misma dirección.

Tres elementos caracterizan los láseres; la longitud de onda (λ); el modo de emisión: continuo (potencia suministrada constante), pulsada (energía suministrada por pulsos cuya frecuencia y potencia son modulables), y

ultra-pulsada (los pulsos tienen una duración y una potencia fija, pero la potencia es considerable y la duración extremadamente breve); y la potencia: de algunas mW a decenas de miles de vatios.

- la IPL: Intense pulse light.

La diferencia fundamental entre láser e IPL reside en el hecho de que IPL puede proporcionar centenares, incluso miles, de colores al mismo tiempo, mientras que el láser proporciona sólo una única longitud de onda. Estas máquinas permiten seleccionar la longitud de onda adaptada al problema a tratar, sólo cambiando el filtro. Se denominan también "non coherent light source".

Se trata de emisión de pulsos de luz de alta intensidad global.

Esta tecnología puede proporcionar un amplio espectro de longitudes de onda que son absorbidas por múltiples cromóforos. Se pueden tratar grandes superficies al mismo tiempo.

- los LED: Light emitting diode (Fotomodulación (LED, Light Emitting Diode, véase "The newest Medical breakthrough for skin renewal and Shrinking pores (2004)").

El LED: El LED emite generalmente luz de baja intensidad de algunos milivatios y a una longitud de onda de 590 +/- 10 a 20 nm, se clasifican en la categoría de láseres de baja potencia (de 1 a algunas decenas de mW).

La presente invención se puede realizar también con la ayuda de sustancias que emiten luz verde.

Estas sustancias son más particularmente unos metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición UV, por ejemplo la vitamina B2 que se degrada en lumiflavina que fluoresce en el verde, la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipiridamol, los pigmentos fosforescentes verdes, los minerales. Se seleccionan en particular entre la lumiflavina, la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipiridamol, los pigmentos fosforescentes verdes y los minerales.

Estas fuentes de luz verde se utilizan en cantidad o intensidad suficiente para asegurar un flujo de emisión de luz de 1 hasta algunas decenas de mV.

El experto en la materia adaptará la duración de exposición a la luz verde según las características de la fuente luminosa y el efecto buscado, a título puramente indicativo, las zonas cutáneas a tratar podrán recibir una potencia luminosa de al menos 500 a 1500 mJ/cm^2, y preferiblemente comprendida entre 500 y 90000 mJ/cm^2.

La fuente de luz verde podrá también ser una sustancia fosforescente o fluorescente verde.

Por "pigmentos fosforescentes verdes" se entienden los pigmentos fosforescentes clásicos listados a continuación pero también cualquier sustancia cosméticamente aceptable que emite una luz verde fosforescente de una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 500 y 580 nm.

La presencia de pigmentos fosforescentes proporciona una fuente continua de luz verde a la composición, la fosforescencia se activa por la exposición a los UV clásicamente presentes en la luz de día y su efecto dura varias horas.

Diferentes compuestos son conocidos por tener la propiedad de fosforar en el verde que comprende sin limitación:

- el sulfuro de zinc (dopado con cobre y/o manganeso),

- al aluminato de estroncio,

- calcito fosforescente.

Unos óxidos cerámicos dopados con elementos de tierra rara tales como el itrio dopado Al, el galio, el terbio dopado Sr o el disprosio ($Y_3(Al,Ga)SO_2$, Y_2SiO_5, $SrGa_2S_4$:Eu).

- boro-silicatos de zinc (vidrio) dopados con cobre o elementos de tierras raras,

- los óxidos de tierra rara.

En complemento o en sustitución, se pueden utilizar unas fuentes de luz fosforescentes, unas fuentes de luz fluorescentes en el verde.

Las fuentes de luz verde fluorescente preferidas son los minerales fluorescentes.

A título de ejemplo y sin carácter limitativo, se pueden citar: la andalucita y la quiastolita (silicato de aluminio); ambligonita (fosforato básico de aluminio y litio); fenaquita (silicato de berilio); variscita (fosfato de aluminio acuoso); serpentina (silicato de magnesio básico); amazonita (silicato de aluminio potásico); amatista (dióxido de silicona); crisoberilo (óxido de berilio aluminio); turquesa (fosfato de aluminio básico que contiene cobre); turmalina incolora, amarilla o rosa (borosilicato); ámbar (succinita/resinas); ópalo (dióxido de silicona acuosa); cerusita (carbonato de plomo); fucsita (silicato de aluminio potásico); diópsido (silicato de magnesio cálcico); ulexita (borato de calcio sódico acuoso); aragonita (carbonato de calcio); y willemita (silicato de zinc).

Se pueden citar también las redes de polímeros que actúan como prismas y tienen como propiedad, seleccionando el índice de refracción adaptado, emitir luz verde cuando están iluminados por luz blanca.

Se puede también favorecer el acceso de la luz verde a nivel de la piel aplicando unas composiciones coloreadas verdes que tienen como papel filtrar la luz para dejar pasar sólo la luz verde, tales como los óxidos de cromo, la clorofila, la kermalina, la turmalina, unos polvos de piedras preciosas y semi-preciosas verdes (esmeralda...).

Estas sustancias pueden ser utilizadas a concentraciones suficientes para asegurar el paso de una cantidad de luz verde capaz de activar la L-aminoácido oxidasa, por ejemplo, comprendidas entre el 0,01% y el 20%.

La invención tiene también por objeto una composición que comprende al menos un sustrato de L-aminoácido oxidasa y al menos un compuesto seleccionado entre los activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes y las sustancias que filtran la luz para dejar pasar sólo la luz verde, siendo estos compuestos seleccionados entre la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipiridamol, los pigmentos y los minerales.

La invención se refiere también a una composición en forma de un producto de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo, que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa tal como se ha descrito anteriormente, y al menos un compuesto seleccionado entre los activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes y las sustancias que filtran la luz para dejar pasar sólo la luz verde; preferentemente, el activo que emite luz bajo exposición a los UV se selecciona entre la lumiflavina, la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipiridamol, los pigmentos fosforescentes verdes y los minerales.

Las composiciones y procedimientos según la invención permiten resolver los problemas de inocuidad y de formulación potenciales generados por la utilización de enzimas, cuya actividad no debe ser alterada por la formulación.

La invención tiene también por objeto un procedimiento cosmético para mejorar la apariencia de la piel, mejorar el brillo del tono de la piel, atenuar las irregularidades visibles o táctiles de la superficie de la piel, en particular para atenuar las arrugas y patas de gallo y/o las manchas cutáneas y/o alisar la piel y/o iluminar el tono de la piel, que comprende la aplicación tópica de una composición que comprende al menos un sustrato de L-aminoácido oxidasa y la exposición de la zona sobre la cual dicha composición se ha aplicado a una luz verde de longitud de onda comprendida entre 500 y 580 nm.

La invención tiene también por objeto un procedimiento cosmético para luchar contra el envejecimiento del cabello, la disminución de su crecimiento, su encanecimiento, la disminución de su diámetro y de su vigor, que comprende la aplicación tópica de una composición que comprende al menos un sustrato de L-aminoácido oxidasa y la exposición de la zona en la que dicha composición se ha aplicado a una luz verde de longitud de onda comprendida entre 500 y 580 nm.

Para la realización de los procedimientos según la invención, la fuente de luz verde se selecciona entre los láseres, la IPL, los LED, los metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes. El procedimiento según la invención podrá comprender además una etapa de exposición a los UV. Según otro de sus objetos, la presente invención se refiere a un kit que comprende:

a. una composición que comprende al menos un sustrato de una enzima cuya actividad puede ser aumentada por una emisión luminosa verde, la L-aminoácido oxidasa;

b. una fuente de luz verde, siendo la fuente de luz verde una sustancia que emite luz verde formulada en otra composición tópica que la que contiene dicho sustrato de L-aminoácido oxidasa.

La realización del procedimiento puede consistir en realizar las etapas a y b de manera simultánea, separada o espaciada en el tiempo.

En particular, dicho sustrato de L-aminoácido oxidasa se selecciona entre leucina, la serina, la treonina, la glicina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la tirosina, la lisina, la arginina, la cisteína, el aspartato, el glutamato, la citrulina, la ornitina, el ácido diaminopimélico, la penicilamina, el ácido α-aminobutírico.

Dicha composición responde a las características técnicas descritas a continuación.

La fuente de luz verde se selecciona entre los metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm, bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes.

Así, la fuente de luz verde es una sustancia que emite luz verde formulada en otra composición tópica destinada a ser aplicada de manera espaciada (antes o después).

Otro kit puede también ser aplicado con la ayuda de un parche, en particular iontoforético, empapado de al menos un sustrato de L-aminoácido oxidasa y provisto de diodos que emiten una luz verde.

La realización del procedimiento según la invención podrá además comprender una etapa previa o concomitante a las etapas a y/o b de tratamiento de la piel que pretende mejorar la penetración del sustrato, por ejemplo enfriando la piel, por iontoforesis, por un sistema oclusivo.

Se puede también favorecer la penetración del sustrato practicando un peeling químico o mecánico previo sobre la zona a tratar.

Ejemplo 1 - activación de la L-aminoácido oxidasa por luz verde

El ejemplo siguiente mide el efecto estimulador de la luz verde (500 560 nm) sobre la actividad del cromóforo enzimático, la L-amino oxidasa. La exposición de esta enzima a la luz verde estimula la transformación de los aminoácidos en cetoácidos.

Descripción del protocolo

Principio general: el principio de estos trabajos es comparar la actividad de la aminoácido oxidasa con o sin exposición previa bajo una fuente de luz entre 500-560 nm.

Materiales y reactivos

- fuente, con fibra óptica (diámetro interno de 3 mm),

- fotómetro IL-1700 + sonda SED 033 (#6600),

- la L-aminoácido oxidasa: Sigma, ref. A-9253 (lote 064K0773) a 0,39 unidades/mg sólido,

- la D-aminoácido oxidasa: Sigma, ref. A-5222-100UN (lote 115K1101) a 2,3 unidades/mg sólido,

Modo de exposición de las enzimas

La enzima (en forma de polvo deshidratado o solución de enzima) se dispone en un tubo Ependorf cónico. La cantidad se ajusta de manera que el conjunto de las enzimas esté sometido a las exposiciones luminosas (longitud de ondas comprendidas entre 490 y 585 nm) por una fibra óptica de 3 mm de diámetro. La exposición luminosa es continua y la energía proporcionada por la luz es de 0,45 mW/cm^2 (véase la figura 1: esquema de montaje y figura 2: características de la luz utilizada en los ensayos).

Los tubos Ependorf se disponen en una bandeja con hielo durante toda la duración de la exposición a fin de evitar un efecto de la temperatura. La enzima control (no expuesta a la luz entre 500-560 nm) se prepara en el mismo momento, de la misma manera y se protege de la luz por soporte que impide el aporte de luz exterior (papel de aluminio).

Medición de la actividad de la enzima

La actividad de la enzima se mide por quimioluminiscencia.

El sustrato de la enzima (L-leucina y/o D-alanina) se incuba en diferentes tiempos con la aminoácido oxidasa en un medio tamponado específico. La formación del producto de hidrólisis H_2O_2 se sigue por quimioluminiscencia en presencia de peroxidasa e isoluminol según el protocolo de determinación de la actividad de esta enzima (E.C.1.4.3.2) descrito en "The Worthington manual", Enzymes and related biochemicals - Editor: Charles C. Worthington 1988, páginas 35-37). El producto de hidrólisis H_2O_2 que procede de ello se determina por quimioluminiscencia con la mezcla de reacción en presencia de peroxidasa e isoluminol de reacción preparado de la siguiente manera:

Mezcla de reacción de quimioluminiscencia:

Pesar 34,8 mg de isoluminol y solubilizarlos bajo agitación magnética en aproximadamente 50 ml de 100 mM de tampón Borato. Pesar 2 mg de microperoxidasa y solubilizarlos bajo agitación magnética en aproximadamente 5 ml de 100 mM de tampón Borato. Los dos reactivos son entonces mezclados en un frasco con medidor de 200 ml cuyo volumen se ajusta por un tampón Borato (aclarar 3 veces cada vaso de precipitado con tampón). Los 200 ml se colocan en un frasco de 500 ml. Se añaden entonces de nuevo 200 ml de tampón borato. La mezcla de reacción, cuyo volumen final es entonces de 400 ml se homogeneiza por agitación magnética y después se coloca en la oscuridad a temperatura ambiente al menos 24 horas antes del uso.

La lectura de luminiscencia se realiza con la ayuda del luminómetro "Fluoroskan Ascent FL" de Thermo Labsystems.

Resultados: Activación enzimática específica de la L-aminoácido oxidasa

- Influencia de la luz verde sobre la D-aminoácido oxidasa

D-amino oxidasa

Condición	**Control**	**Luz verde**
Luminiscencia	577,5	568,2166667

- Influencia de la luz verde sobre la L-aminoácido oxidasa.

L-aminoácido oxidasa

Condición	**Control**	**Luz verde**
Luminiscencia	342,26667	409,8777778

Conclusión

Una exposición prolongada a la luz verde no modifica la actividad de la D-aminoácido oxidasa de manera significativa. Por el contrario, se observa que una exposición de 60 minutos induce una activación específica de la L-amino oxidasa.

Ejemplo 2 - Cinética de activación de la L-aminoácido oxidasa

Se realizan varias mediciones después de diferentes tiempos de exposición según el protocolo descrito en el ejemplo 1 y se resumen en la tabla siguiente:

Los resultados aparecen en la tabla siguiente y son representados en la figura 3 (la L-aminoácido oxidasa sensibilizada es la expuesta a la luz verde).

Tiempo de análisis	**Control**	**Luz verde**
0	0	0,0
10	191,56667	248,0
20	349,66667	420,8
30	502,6	586,5
40	646,46667	735,2
50	756,26667	844,0
60	876,36667	970,9

Conclusión

La cinética de activación de la L-aminoácido oxidasa se aumenta por una exposición a la luz entre 500-560 nm.

Ejemplo 3 - activación de la L-aminoácido oxidasa según el tiempo de exposición: efecto dosis respuesta.

El ensayo se realiza en las mismas condiciones experimentales que en el ejemplo 1 siguiendo el protocolo del proveedor.

Tiempo de estimulación	Control	Luz verde	Diferencia
0	0	0,0	0
30	409,9	412,8	0,7
60	349,7	420,8	16,9
120	275,4	361,7	23,8

Los resultados aparecen en la tabla siguiente y se representan en la figura 4.

Conclusión

Se constata que cuanto más larga sea la exposición de la enzima, más importante es su actividad. El diagrama siguiente muestra la relación entre la actividad de la enzima expuesta y la de la enzima control.

Ejemplo 4 - Composiciones

Crema de regeneración epidérmica (emulsión aceite en agua)	
Poliacrildimetiltauramida de amonio (Hostacerin AMPS de Clariant)	1,00%
Ciclohexasiloxano	5,0%
Glicerina	1,70%
Alcohol estearílico	0,30%
Estearato de glicerilo / PEG-100 estearato	0,70%
Dimiristil tartrato / alcohol cetearílico / C12-15 pareth-7 / PPG-25 laureth-25	0,50%
Goma de Xantana	0,20%
L-Alanina	0,5%
Conservantes	0,50%
Agua	csp 100

Crema de regeneración epidérmica (emulsión aceite en agua)	
Poliacrildimetiltauramida de amonio (Hostacerin AMPS de Clariant)	1,00%
Ciclohexasiloxano	5,0%
Glicerina	1,70%
Alcohol estearílico	0,30%
Estearato de glicerilo / PEG-100 estearato	0,70%
Dimiristil tartrato / alcohol cetearílico / C12-15 pareth-7 / PPG-25 laureth-25	0,50%
Goma de Xantana	0,20%
L-Leucina	0,5%
Conservantes	0,50%
Agua	csp 100

Se aplican estas cremas sobre la cara y/o sobre el cuerpo justo antes de una exposición prolongada (30 minutos a 1h30) bajo una radiación de longitud de onda comprendida entre 500 y 560 nm.

Parche iontoforético

Un parche de referencia comercial IontopatchTM (Travanti Pharma, Mendota Heights, MN, USA) se aplica sobre una zona previamente tratada con una de las cremas anteriores.

Después, se conecta a una corriente eléctrica para suministrar una corriente galvánica generada por una diferencia

de potencial de 1V y que comprende dos electrodos, un ánodo en Zn y un cátodo en AgCl y se expone a una fuente de luz verde.

Este tratamiento se realiza a razón de una vez por día durante 30 a 45 minutos.

Máscara verde

Fase oleosa:	
Octil-dodecanol	6%
Aceite de hueso de albaricoque	6%
Triglicéridos	5%
Caolín	3%
Alcohol cetílico	2%
Acetato de vitamina E	0,5%
Aceite de palma hidrogenado	6%
Fracción líquida de manteca de karité	5%
Fase acuosa:	
Goma de Xantana	0,4%
Cocoato de sacarosa/estearato de sorbitán (mezcla vendida por la compañía société ICL bajo la denominación Arlaton 21121	5,5%
Glicerina	3%
Dipiridamol	0,30%
Cobre clorofilina	0,20%
Etanol	5%
L_Alanina	0,5%
Perfume	0,3%
Conservante	cs
Agua	csp100

Se aplica esta máscara sobre las zonas de la piel a tratar, después se coloca el sujeto debajo de una fuente de luz blanca (natural o eléctrica) durante de 45 minutos a 1 hora.

REIVINDICACIONES

1. Utilización no terapéutica de una luz verde de longitud de onda comprendida entre 500 y 580 nm para activar la L-aminoácido oxidasa en presencia de al menos uno de sus sustratos.

2. Utilización no terapéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho sustrato es un aminoácido o una molécula que comprende una función amina, tal que comprende un carbono en alfa del grupo ácido y un grupo de amina primaria.

3. Utilización no terapéutica según la reivindicación 2, caracterizada por que dicho sustrato se selecciona entre la leucina, la serina, la treonina, la glicina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la tirosina, la lisina, la arginina, la cisteína, el aspartato, el glutamato, la citrulina, la ornitina, el ácido diaminopimélico, la penicilamina, el ácido α-aminobutírico.

4. Utilización no terapéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que dicho sustrato está presente a una concentración comprendida entre el 0,001 y el 10%.

5. Utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho sustrato está formulado en una composición tópica.

6. Utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la fuente de luz verde se selecciona entre los láseres, la IPL, los LED, los metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes.

7. Utilización no terapéutica según la reivindicación 6, caracterizada por que dichos metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV se seleccionan entre la vitamina B2, la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipirodamol, los pigmentos y los minerales.

8. Utilización no terapéutica según la reivindicación 6, caracterizada por que dicha fuente de luz verde produce una potencia luminosa comprendida entre 500 y 90000 mJ/cm^2.

9. Utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para activar el metabolismo de las células de la piel, en particular los fibroblastos, los queratinocitos y los melanocitos y/o activar y/o regular la fisiología de estas células.

10. Utilización no terapéutica según la reivindicación 9, para disminuir la formación y/o estimular la eliminación de componentes celulares dañados.

11. Utilización no terapéutica según la reivindicación 9, para estimular la renovación de las células de la epidermis y la regeneración cutánea.

12. Utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para dar a la piel y al cabello un aspecto saludable, en particular unificar el tono de la piel, reavivar su brillo, evitar su aspecto amarillo o apagado; prevenir y/o tratar las manchas cutáneas; atenuar las irregularidades visibles y/o táctiles de la superficie de la piel, darle un relieve más uniforme y alisarla, prevenir y/o tratar las arrugas o patas de gallo; volver a dar más volumen y elasticidad a la piel.

13. Utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para luchar contra las alteraciones de la piel relacionadas con el envejecimiento, prevenir y/o tratar los síntomas cutáneos del envejecimiento de la piel y los síntomas del envejecimiento del cabello.

14. Utilización no terapéutica según la reivindicación 13, para prevenir y/o tratar la flacidez de la piel, la aparición de arrugas, de manchas cutáneas, del amarillamiento del tono de la piel.

15. Utilización no terapéutica según la reivindicación 13, para prevenir y/o tratar la caída del cabello, la ralentización de su crecimiento, su encanecimiento, la disminución de su diámetro y de su vigor.

16. Composición que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa y al menos un compuesto seleccionado entre los activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes y las sustancias que filtran la luz para dejar pasar sólo la luz verde, caracterizada por que los activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes se seleccionan entre la baicalina en medio ácido, la fisetina, el dipiridamol, los pigmentos y los minerales.

17. Composición según la reivindicación 16, caracterizada por que dicho sustrato se selecciona entre la leucina, la serina, la treonina, la glicina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la tirosina, la lisina, la arginina, la cisteína, el

aspartato, el glutamato, la citrulina, la ornitina, el ácido diaminopimélico, la penicilamina y el ácido α-aminobutírico.

18. Procedimiento cosmético para mejorar la apariencia de la piel, mejorar el brillo del tono de la piel, atenuar las irregularidades visibles o táctiles de la superficie de la piel, en particular para atenuar las arrugas y patas de gallo y/o las manchas cutáneas y/o alisar la piel y/o iluminar el tono de la piel, que comprende la aplicación tópica de una composición que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa y la exposición de la zona sobre la cual dicha composición se ha aplicado a una luz verde de longitud de onda comprendida entre 500 y 580 nm.

19. Procedimiento cosmético para luchar contra el envejecimiento del cabello, la ralentización de su crecimiento, su encanecimiento, la disminución de su diámetro y de su vigor, que comprende la aplicación tópica de una composición que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa y la exposición de la zona sobre la cual dicha composición se ha aplicado a una luz verde de longitud de onda comprendida entre 500 y 580 nm.

20. Procedimiento según la reivindicación 18 o 19, caracterizado por que la fuente de dicha luz verde se selecciona entre los láseres, la IPL, los LED, los metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes.

21. Kit que comprende:

a. una composición que comprende al menos un sustrato de la L-aminoácido oxidasa;

b. una fuente de luz verde;

siendo la fuente de luz verde una sustancia que emite luz verde formulada en otra composición tópica distinta de la que contiene dicho sustrato de la L-aminoácido oxidasa.

22. Kit según la reivindicación 22, caracterizado por que dicho sustrato se selecciona entre la leucina, la serina, la treonina, la glicina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la tirosina, la lisina, la arginina, la cisteína, el aspartato, el glutamato, la citrulina, la ornitina, el ácido diaminopimélico, la penicilamina, el ácido α-aminobutírico.

23. Kit según la reivindicación 21 o 22, caracterizado por que dicha fuente de luz verde se selecciona entre los metabolitos o activos que emiten luz entre 500 y 580 nm bajo exposición a los UV, las sustancias fosforescentes o fluorescentes verdes.

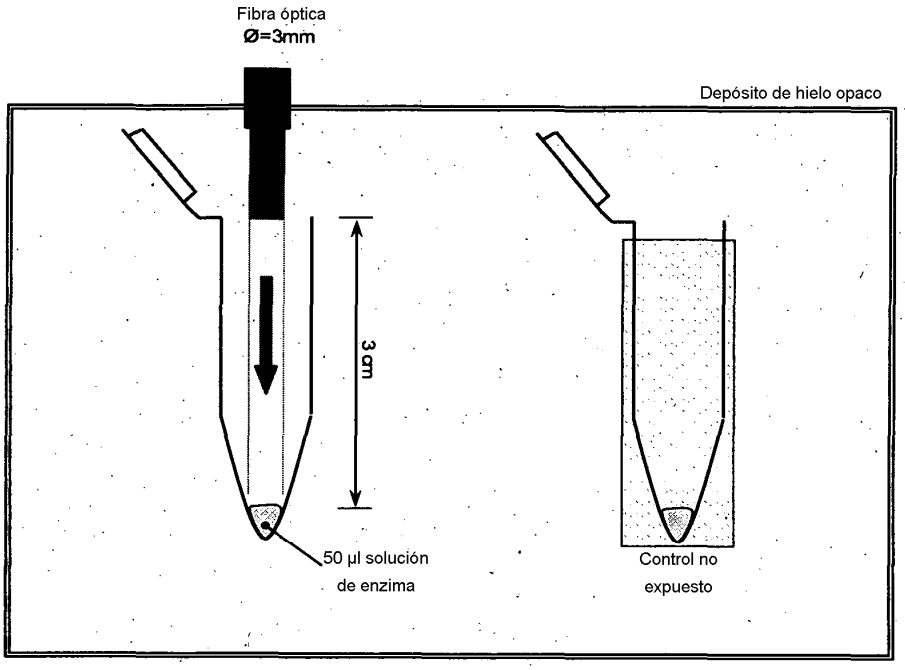
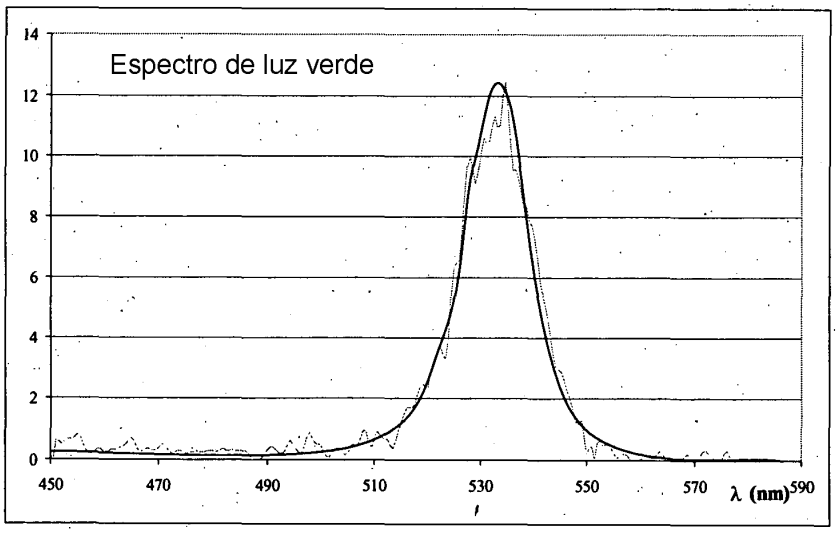


Figura 1 - Esquema de montaje que permite exponer la enzima a la luz entre 500-560 nm



Fuente: Illum 4000 Micro Module / Filtro Oriel (Slit Width = 6 mm)
Intensidad: 0,45 mW/cm^2 (medida a 2,5 de distancia p/r la sonda)
Radiómetro IL1700 (#3761), sonda visible SED033 (#6600).
Lamda máx. a aproximadamente 535 nm.

Absorción de una solución agua miliQ (recipiente cuarzo 1 cm trayectoria óptica): ±0,01 mW/cm^2

Figura 2 - Características de la luz utilizada en los ensayos

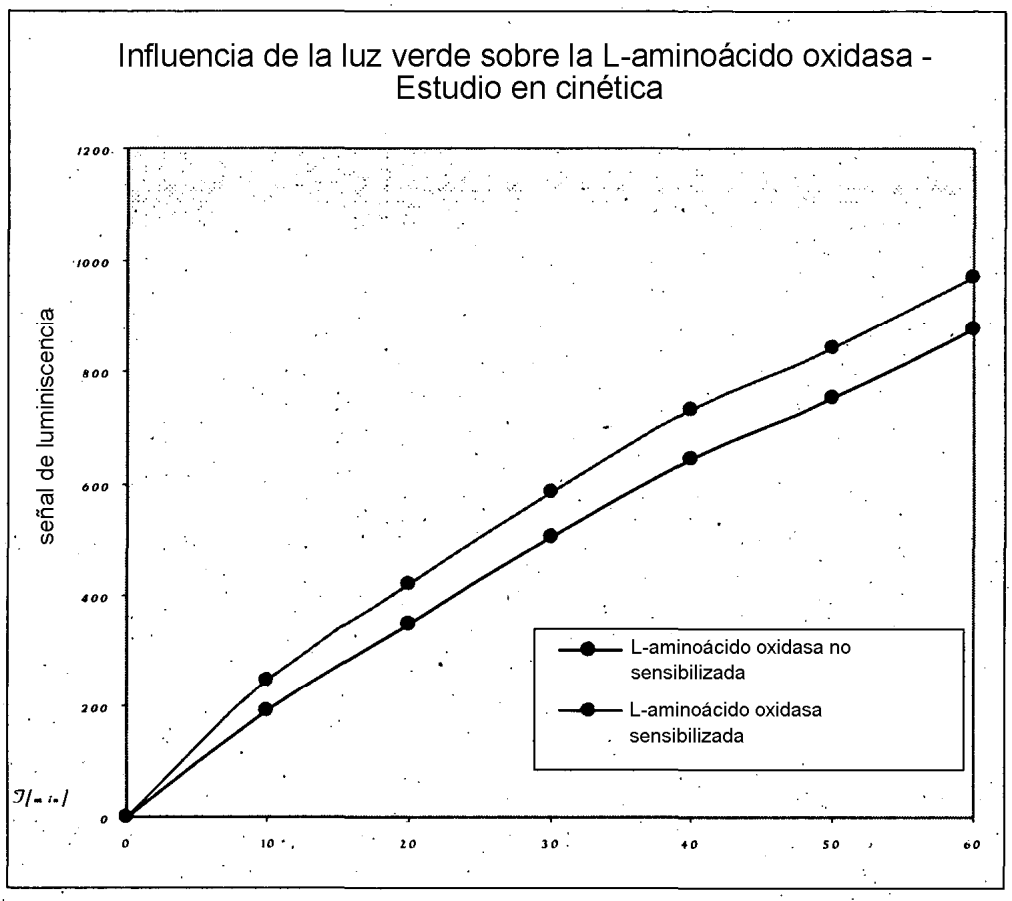


Figura 3 - Resultados del ejemplo 2

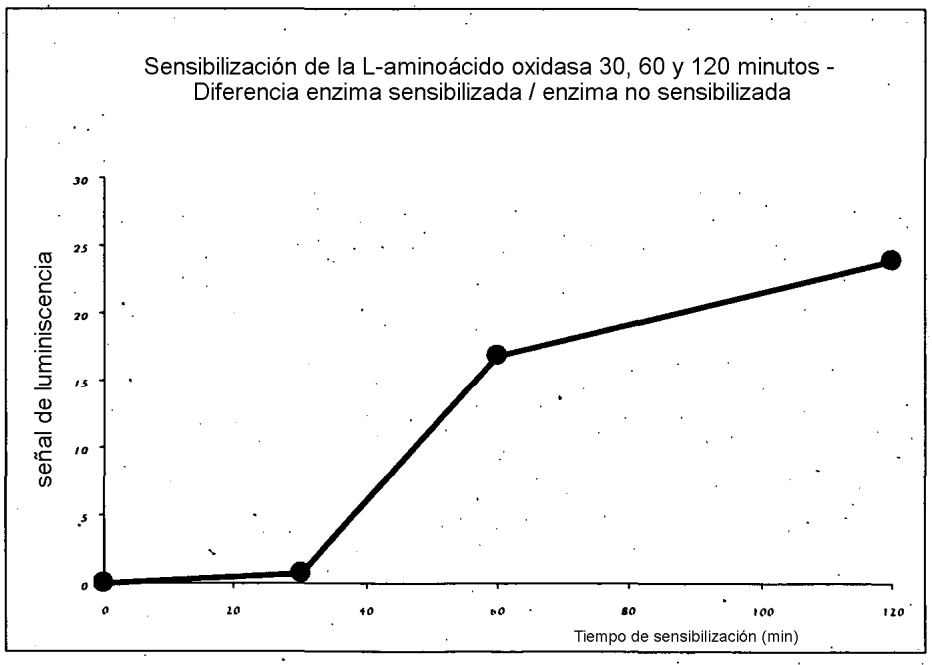


Figura 4 - resultados del ejemplo 3