

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 636**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2010 E 10703307 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2376529**

54 Título: **Péptidos novedosos antienvjecimiento y composición cosmética y/o farmacéutica que los contiene**

30 Prioridad:

09.01.2009 FR 0900066

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

28.07.2016

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;
BOTTO, JEAN-MARIE y
IMBERT, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 578 636 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 antienvjecimiento y composición cosmética y/o farmacéutica que los contiene

- 5 **[0001]** La presente invención se sitúa en los campos de la cosmética y de la dermofarmacia. La presente invención se refiere a compuestos peptídicos de secuencias específicas de fórmula general (I) $R_1-(AA)_n-X_1-Ser-Thr-Pro-X_2-(AA)_p-R_2$ destinados a restaurar el ritmo circadiano y a resincronizar el reloj biológico de las células de la piel, así como para prevenir y corregir los efectos del envejecimiento.
- 10 **[0002]** La función primera de la epidermis es la de constituir una barrera entre el entorno exterior y el medio interior. La capa más externa de la epidermis, el *stratum corneum*, se encarga de garantizar esta función. Está compuesto por queratinocitos en la última fase de su diferenciación, los corneocitos, separados entre sí por medio de un cemento intercelular espeso, flexible e impermeable al mismo tiempo. Esta barrera física que es la piel permite que el cuerpo humano se proteja de numerosos tipos de agresiones. Estas agresiones pueden tener diversos orígenes intrínsecos, tales como el envejecimiento cronológico o incluso modificaciones bioquímicas que tienen lugar tras estados de fatiga, de estrés, de cambios hormonales como tras el embarazo... Otras agresiones tienen un origen extrínseco, tales como la contaminación, el sol, las enfermedades... En respuesta a dichas agresiones, el aspecto de la piel se modifica y por tanto aparecen arrugas y pequeñas arrugas, manchas de hiper o hipopigmentación, sequedades e incluso una deshidratación de la piel, un adelgazamiento de la epidermis, una elastosis, imperfecciones, manchas de vejez... Estas modificaciones se deben a la alteración de las funciones de renovación celular, de cohesión celular, de síntesis de colágeno, de elastina y otras proteínas y conducen finalmente a una disminución de las cualidades de barrera protectora de la piel y a un aspecto poco estético de esta.
- 15 20 **[0003]** La piel, como el resto de órganos, está sometida a la influencia de variaciones periódicas. Es el centro de una organización coherente de ritmos circadianos y nictamerales que modulan diversos ciclos biológicos, muy a menudo de gran amplitud (F. Henry *et al.*, *Rev Med Liege*; 57: 10: 661-665). Estos ritmos cutáneos en el hombre sugieren que por el día la piel favorece diversas funciones protectoras frente al entorno. Por la tarde y noche, favorece su renovación celular y diversos procesos metabólicos de síntesis.
- 25 30 **[0004]** Un individuo saludable, cuyo organismo vive en armonía con su entorno, presenta una sincronización de sus ritmos biológicos. En cambio, pueden aparecer perturbaciones de los ritmos biológicos en un determinado número de afecciones denominadas de desincronización (Reinberg y Touitou, 1996). Una desincronización es un estado en el cual dos variables rítmicas (o más), anteriormente sincronizadas, han dejado de presentar las mismas relaciones de frecuencia y/o de acrofase y muestran relaciones temporales distintas de las relaciones habituales. La desincronización puede ser de origen externo, por lo que depende de las modificaciones del entorno y se encuentra, por ejemplo, tras un vuelo transmeridiano de cinco husos horarios (el fenómeno del *jet-lag*) o en el trabajo nocturno. En cuanto a la desincronización de origen interno, esta no depende de los factores del entorno. Se encuentra en el envejecimiento o en un determinado número de enfermedades como la depresión o determinados tipos de cáncer. Estos problemas de la desincronización pueden corregirse por medio de diversos tratamientos: por ejemplo, la administración de luz fuerte para tratar el trastorno afectivo estacional, o incluso la administración de melatonina (Dijk y col., 1995; Eastman y Miescke, 1990; Palm y col., 1991; Shochat y col., 1998; Touitou y col., 1998). En cosmética es bien sabido que la eficacia de un cuidado puede verse optimizada en función del momento del día en que se administre. Por ejemplo, las cremas de día permiten proteger la piel de las agresiones externas durante el día, mientras que las cremas de noche permiten que la piel repare los daños sufridos durante el día por medio del aumento de la renovación y del metabolismo celulares. Asimismo, se ha demostrado que el envejecimiento está acompañado de una modificación de los ritmos biológicos, con una disminución de la amplitud y una tendencia al avance de fase (Weinert D., *Chronobiol. Int.* 2000; 17:261-83). Además, se ha mostrado que el reloj circadiano se veía alterado por ese mismo envejecimiento. No obstante, en la actualidad no hay tratamiento que permita que la piel «se reinicie» o incluso que reactive su ciclo circadiano, ni que resincronice su reloj biológico. Un tratamiento de este tipo permitiría de este modo ayudar a que la piel se recupere de un desfase horario, de un trabajo nocturno o incluso que combata los signos provocados por el envejecimiento.
- 35 40 45 50 55 **[0005]** De forma sorprendente, el solicitante ha descubierto que los compuestos peptídicos de la siguiente fórmula general $R_1-(AA)_n-X_1-Ser-Thr-Pro-X_2-(AA)_p-R_2$ tenían la propiedad de restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel. No hay ningún documento en la técnica anterior que describa que dichos compuestos peptídicos permitan obtener tales efectos. Además, estos compuestos peptídicos se caracterizan por el hecho de que son agentes activadores de la proteína Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), que está implicada de forma directa o indirecta en la regulación del ciclo circadiano. En consecuencia, la presente invención tiene como objeto unos compuestos peptídicos activadores de Clock, así como su uso en composiciones cosméticas y farmacéuticas a fin de restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel o incluso prevenir o corregir los signos provocados por el envejecimiento.
- 60

[0006] Desde hace tiempo se sabe que el reloj circadiano está controlado por medio de un bucle negativo de regulación que implica un conjunto de genes, principalmente los genes Per-1 (Period), Clock y BMAL-1 (Brain and Muscle ARNT-like Protein). Hasta ahora, en la técnica anterior, se han propuesto numerosas aplicaciones en lo que respecta al uso de los nucleótidos y/o de las proteínas procedentes de los genes Clock, Per-1 o BMAL-1. Se puede citar, por ejemplo, la patente US 6 291 429, que describe el uso del producto del gen Clock para la resincronización del ciclo del sueño o de procesos fisiológicos o endocrinos, la resincronización del cuerpo después de un desfase horario... Los documentos de patente WO 99/57237 y EP1864997 dan a conocer proteínas procedentes de los genes Clock, Per-1 et BMAL-1 para la regulación de los ritmos biológicos. No obstante, ningún documento de la técnica anterior describe el uso de péptidos específicos activadores de Clock para restaurar el reloj biológico interno de la piel.

[0007] La presente invención tiene como primer objeto unos compuestos peptídicos de fórmula (I) siguiente



en la cual,

X_1 representa una treonina, una serina o es igual a cero,

X_2 representa una isoleucina, una leucina, una valina, una alanina, una glicina o es igual a cero,

AA representa un aminoácido cualquiera salvo prolina, o uno de sus derivados, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,

R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo,

R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre una cadena alquilo de C_1 a C_{20} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

estando constituida dicha secuencia de fórmula general (I) por 3 a 13 residuos de aminoácidos,

caracterizado por que se corresponde con una de las fórmulas siguientes:

(SEQ ID n.º1) Tyr - Val - Ser - Thr - Pro - Tyr - Asn - NH_2

(SEQ ID n.º2) Val - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

(SEQ ID n.º3) Ser - Thr - Pro - NH_2

(SEQ ID n.º4) Leu - His - Ser - Thr - Pro - NH_2

(SEQ ID n.º5) Arg - His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

(SEQ ID n.º6) His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2 ,

y permite restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel.

[0008] La presente invención tiene como segundo objeto una composición cosmética que comprende compuestos peptídicos de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID n.º 1-6.

[0009] El primer objeto de la invención se refiere a un compuesto peptídico de la fórmula general (I) siguiente:



en la cual,

X_1 representa una treonina, una serina o es igual a cero,

X_2 representa una isoleucina, una leucina, una valina, una alanina, una glicina o es igual a cero,

AA representa un aminoácido cualquiera salvo prolina, o uno de sus derivados, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,

5 R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre un grupo acetilo, un grupo benzilo, un grupo tosililo o un grupo benciloxicarbonilo,

10 R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre una cadena alquilo de C_1 a C_{20} , o un grupo NH_2 , NHY o NYY en el que Y representa una cadena alquilo de C_1 a C_4 ,

estando constituida dicha secuencia de fórmula general (I) por 3 a 13 residuos de aminoácidos,

caracterizado por que se corresponde con una de las fórmulas siguientes:

15 (SEQ ID n.º1) Tyr - Val - Ser - Thr - Pro - Tyr - Asn - NH_2

(SEQ ID n.º2) Val - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

20 (SEQ ID n.º3) Ser - Thr - Pro - NH_2

(SEQ ID n.º4) Leu - His - Ser - Thr - Pro - NH_2

25 (SEQ ID n.º5) Arg - His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

(SEQ ID n.º6) His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2 ,

y permite restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel.

30 **[0010]** El compuesto peptídico según la invención se caracteriza por que es activador de los productos de los genes del ritmo circadiano. Por «genes del ritmo circadiano» se entienden los genes Clock, Per-1 y BMAL-1.

35 **[0011]** En una forma de realización concreta, la secuencia del compuesto peptídico es la secuencia SEQ ID n.º3, es decir Ser - Thr - Pro - NH_2 .

[0012] En otra forma de realización, la secuencia del compuesto peptídico es la secuencia SEQ ID n.º4, es decir Leu - His - Ser - Thr - Pro - NH_2 .

40 **[0013]** El término «péptido» o «compuesto peptídico» designa un encadenamiento de dos o varios aminoácidos ligados entre sí por medio de enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados.

[0014] Por «péptido» o «compuesto peptídico», cabe entender el péptido natural o sintético de la invención del modo descrito anteriormente, que se obtenga por proteólisis o de forma sintética.

45 **[0015]** 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 bien por síntesis enzimática (Kullman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1980, 225, 8234), a partir de aminoácidos constitutivos o sus derivados.

50 **[0016]** El péptido según la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferiblemente según la invención, el péptido se obtiene por síntesis química.

[0017] Por último, el principio activo puede ser un péptido único de secuencia SEQ ID n.º 1-6, o una mezcla de dichos péptidos.

55 **[0018]** El compuesto peptídico según la invención puede utilizarse como medicamento.

60 **[0019]** El segundo objeto de la presente invención se refiere a composiciones cosméticas que comprenden dicho compuesto peptídico de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID n.º 1-6. De forma preferida, las composiciones según la invención se presentan en una forma adaptada para su aplicación por vía tópica, comprendiendo un medio cosmética o dermatológicamente aceptable. Por «cosmética o dermatológicamente aceptable» se entiende aquellos medios que sirven para un uso en contacto con la piel o las faneras humanas, sin riesgo de toxicidad, de incompatibilidad, de inestabilidad, de respuesta alérgica y otros. Preferiblemente, dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre alrededor de 0,0005 y 500 ppm, y preferiblemente en una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm. En las composiciones según la invención, el compuesto peptídico se solubiliza previamente en uno o varios disolventes cosmética o

dermatológicamente aceptables, como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, aceite vegetal o toda mezcla de dichos disolventes.

5 **[0020]** Según incluso otra forma de realización ventajosa, el principio activo según la invención se solubiliza previamente en un vector cosmético o farmacéutico 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 aceptable.

10 **[0021]** Las composiciones destinadas a su aplicación sobre la piel pueden presentarse en forma de solución acuosa o hidroalcohólica, emulsión de agua en aceite o de aceite en agua, microemulsión, gel acuoso o anhidro, sérum, o incluso en forma de dispersión de gotas, parche, crema, pulverizador, ungüento, pomada, loción, coloide, solución, suspensión u otras. Las composiciones también pueden aplicarse sobre las faneras en forma de champú, tinte o rímel para aplicarse con pincel o peine, en concreto sobre las pestañas, cejas o cabello, o
15 incluso en forma de cuidados para las uñas como los esmaltes de uñas.

[0022] En una forma de realización concreta, la composición según la invención contiene además al menos otro principio activo que favorece la acción de dicho principio activo peptídico. Se puede citar, de forma no limitadora, las siguientes clases de ingredientes: otros agentes activos peptídicos, extractos de vegetales, agentes
20 cicatrizantes, antienvjecimiento, 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 el cabello... Preferiblemente, se utilizará un agente antirradicales o antioxidante, o un agente que estimule la síntesis de macromoléculas
25 dérmicas, o incluso un agente que estimule el metabolismo energético.

[0023] Asimismo, pueden añadirse a la composición aditivos tales como agentes espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, perfumes, antioxidantes, agentes filmógenos, quelantes, secuestrantes, acondicionadores...
30

[0024] 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, por ejemplo, corresponderse con un 0,01 a un
35 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.

40 **[0025]** Un tercer objeto de la presente invención se refiere al compuesto peptídico de secuencia SEQ ID n.º 1-6 como principio activo activador de Clock. Por péptido «activador de Clock» se entiende todo péptido según la invención capaz de aumentar la actividad de Clock, ya sea por aumento de la síntesis proteica de Clock (por modulación directa o indirecta de la expresión génica de Clock) o por otros procesos biológicos como la estabilización de la proteína Clock o incluso la estabilización de las transcripciones de ARN mensajero.
45

[0026] Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende dicho compuesto peptídico de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID n.º 1-6 según dicha invención para restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel.

50 **[0027]** Una forma de realización concreta de la invención se refiere a una composición de este tipo para activar la renovación celular y estimular el metabolismo celular. Más en concreto, la invención consiste en una composición de este tipo para reducir las disfunciones causadas por el desfase horario y/o el trabajo nocturno. Ventajosamente, la invención se refiere a dicho compuesto peptídico de secuencia SEQ ID n.º 1-6 utilizado en una composición destinada a respetar la cronobiología cutánea, principalmente por medio de una aplicación en
55 cuidado cosmético de noche.

[0028] Otra forma de realización de la invención consiste en una composición que comprende dicho compuesto peptídico de fórmula general (I) de secuencia SEQ ID n.º 1-6 para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento. Los «signos cutáneos del envejecimiento» incluyen, pero no se limitan a, todas las manifestaciones visibles sobre la piel causadas por el envejecimiento. Principalmente se entienden arrugas, pequeñas arrugas, grietas, poros dilatados, imperfecciones, pérdida de firmeza, decoloración, manchas de vejez, queratosis, pérdida de colágeno y otros cambios de la dermis y la epidermis... Por «signos cutáneos del envejecimiento» también se entiende toda 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 las pequeñas
60 arrugas, así como toda modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente en un aspecto exterior
65

modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis o toda degradación interna de la piel tras una exposición a los rayos ultravioleta (UV). Más en concreto, la invención se refiere a la composición tal y como se ha descrito anteriormente utilizada a fin de reducir los signos de fatiga de la piel.

5 **[0029]** Se aplica tópicamente en la piel o las faneras a tratar una composición que contiene una cantidad eficaz de principio activo peptídico para restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células.

10 **[0030]** Asimismo, la composición se aplica antes de dormir de modo que se respete el ritmo circadiano de la piel para obtener un efecto antienvjecimiento sobre la piel. En efecto, durante la noche, la piel favorece funciones de renovación así como procesos metabólicos de síntesis. En consecuencia, la aplicación de la composición que se reivindica, al respetar el ritmo biológico de la piel, permite obtener un efecto antienvjecimiento, estimulando la renovación celular, regenerando y reduciendo de este modo los signos del envjecimiento.

15 **[0031]** Los siguientes ejemplos describen y demuestran la eficacia de compuestos peptídicos como los descritos según la invención. Las formulaciones cosméticas citadas son representativas de la invención pero se proporcionan únicamente a modo ilustrativo y no deben interpretarse como limitaciones de la presente invención.

Ejemplo 1: Demostración del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 2 en la expresión de la proteína Clock en fibroblastos en cultivo

20 **[0032]** Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 2 mediante la evaluación de la expresión de las proteínas Clock en inmunoelectrotransferencia en fibroblastos en cultivo. La técnica de la inmunoelectrotransferencia es un método semicuantitativo que permite apreciar la proporción de proteínas Clock en las células.

25 Protocolo

30 **[0033]** Se cultivan fibroblastos en cultivos en cajas de 100 mm de diámetro a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO₂ durante 18 h en presencia o no del péptido SEQ ID n.º 2, diluido 1 % (a partir de una solución 10⁻⁴M). Las células se enjuagan y después se separan del soporte con un tampón de extracción (20mM TRIS, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0,2 % Triton X10) en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). Las proteínas extraídas de ese modo se centrifugan a 4 °C a 10 000 rpm durante 10 minutos antes de cuantificarse por medio del kit de cuantificación de proteínas por BCA (Pierce). Los lisados celulares se mezclan con un tampón de desnaturalización y se someten a una electroforesis SDS-PAGE. El gel utilizado es un Nupage 4-12 % (invitrogen). Las proteínas se transfieren finalmente a una membrana de nitrocelulosa (Pal corporation). Las membranas se saturan en PBS 5 % leche, 0,1 % Tween 20, 2 h a temperatura ambiente, y después se incuban a 4 °C toda la noche con un anticuerpo primario anti-Clock a 1/1000 (ABcam) seguido de una incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo Iggy-peroxidasa diluido 1/5000. La revelación se efectúa por medio de un sustrato quimioluminiscente. La evaluación cuantitativa de las proteínas presentes en las células se efectúa gracias al programa informático chemiimager (Alpha innotech Corporation USA). La cantidad de proteínas se expresa en porcentaje de intensidad luminosa en comparación con la condición control que no tiene el tratamiento.

45 Resultados:

[0034] Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento por medio del péptido SEQ ID n.º 2, diluido a 1 % aumenta de forma significativa la proteína Clock en los fibroblastos en cultivo. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Intensidad (%)	Experimento 1
Control sin tratar	100 %
1 % tratamiento	154 %

50 **[0035]** El experimento se ha realizado varias veces y demuestra por medio de la prueba estadística t de Student que el aumento de la expresión de la proteína Clock es significativo (p=0,0445).

55 Conclusión:

[0036] El péptido SEQ ID n.º 2 permite aumentar la expresión de la proteína Clock en las células dérmicas en cultivo.

60 **Ejemplo 2: Demostración del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 3 en la expresión de la proteína Clock, Per-1 y BMAL-1 en biopsias de piel**

[0037] Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 3 mediante la evaluación de la expresión de la proteína Clock, Per-1 y BMAL-1 en biopsias de piel *ex vivo*.

Protocolo

5

[0038] Los estudios *ex vivo* por inmunomarcado han permitido poner de manifiesto la expresión de la proteína Clock, Per-1 y BMAL-1 en muestras de piel. Las muestras de piel humana se ponen en cultivo en la interfaz aire/líquido. El péptido SEQ ID n.º 3 diluido a 1 % (a partir de una solución 10⁻⁴M) se aplica de forma tópica en dichas muestras durante 48 h.

10

[0039] Las muestras de piel no tratadas por el péptido SEQ ID n.º 3 sirven de control. Las muestras de piel se fijan con formaldehído 10 % y se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 3 µm con micrótopo. El inmunomarcado se efectúa tras un desparafinado y un desenmascaramiento de los sitios antigénicos. El inmunomarcado para la proteína Clock se efectúa por medio de un anticuerpo (ABcam) diluido 1/250 y un anticuerpo secundario 1/50 acoplado a un fluorocromo.

15

[0040] El inmunomarcado para la proteína Per-1 se efectúa por medio de un anticuerpo policlonal (Cosmobio) diluido 1/100 y un anticuerpo secundario 1/50 acoplado a un fluorocromo.

20

[0041] El inmunomarcado para la proteína BMAL-1 se efectúa por medio de un anticuerpo policlonal (Aviva Systems Biology) diluido 1/120 y un anticuerpo secundario 1/50 acoplado a un fluorocromo.

[0042] Las láminas se montan entonces en un medio adecuado y se observan con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

25

Resultados:

[0043] Los resultados obtenidos muestran que las pieles tratadas con el péptido SEQ ID n.º 3 expresan cantidades de proteína Clock, Per-1 y BMAL-1 superiores a las pieles sin tratar.

30

[0044] La evaluación semicuantitativa del marcado se efectúa por observación microscópica y se resume en la siguiente tabla.

	Sin tratar	Tratado con péptido SEQ ID n.º3 diluido a 1 %
Marcado proteína Clock	+/-	+
Marcado proteína PER-1	+	+++
Marcado BMAL-1	+	+++

35

Conclusión:

[0045] La administración de péptido SEQ ID n.º 3 permite aumentar la expresión de las proteínas Clock, Per-1 y BMAL-1 en una piel irradiada y tratada.

40

Ejemplo 3: Demostración del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 3 en la expresión de la proteína Clock en biopsias de piel en el envejecimiento

[0046] Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 3 mediante la evaluación de la expresión de la proteína Clock en modelos de piel, envejecidos artificialmente en cultivo. El análisis se ha llevado a cabo tras 62 h y 134 h de cultivo.

45

Protocolo

[0047] Los estudios *ex vivo* por inmunomarcado han permitido demostrar la expresión de la proteína Clock en muestras de piel envejecidas en cultivo. Las muestras de piel humana se ponen en cultivo en la interfaz aire/líquido durante 62 h y 134 h. El péptido SEQ ID n.º 1 diluido a 1 % (a partir de una solución 10⁻⁴M) se aplica de forma tópica en dichas muestras 2 veces al día durante el tiempo del experimento.

50

[0048] Las muestras de piel no tratadas por el péptido SEQ ID n.º 3 sirven de control. Las muestras de piel se fijan con formaldehído 10 % y se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 3 µm con micrótopo. El inmunomarcado se efectúa tras un desparafinado y un desenmascaramiento de los sitios antigénicos. El inmunomarcado para la proteína Clock se efectúa por medio de un anticuerpo anti-conejo (ABcam) diluido 1/250 y un anticuerpo secundario 1/50 acoplado a un fluorocromo.

55

[0049] Las láminas se montan entonces en un medio adecuado y se observan con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

Resultados:

[0050] Los resultados obtenidos muestran que el marcado de la proteína Clock (esencialmente epidérmico) aumenta tras 62 horas de cultivo con respecto a las láminas control sin tratar. Este aumento se mantiene en el tiempo ya que al cabo de 134 horas el marcado de la proteína Clock aumenta en gran medida con respecto a las pieles control sin tratar. La siguiente tabla da una evaluación visual del marcado.

	Sin tratar	Tratado con péptido SEQ ID n.º 3 diluido a 1 %
Marcado proteína Clock 62 h	+	++
Marcado proteína Clock 134 h	-	++

Conclusión:

[0051] La aplicación del compuesto peptídico SEQ ID n.º 3 permite aumentar la expresión de la proteína Clock en biopsias de piel tratadas y envejecidas artificialmente en cultivo.

Ejemplo 4: Demostración del efecto antienvjecimiento del péptido SEQ ID n.º 3 en fibroblastos en cultivo

[0052] Se ha realizado un estudio del efecto antienvjecimiento del péptido SEQ ID n.º 3 mediante la evaluación de la actividad de la beta-galactosidasa en fibroblastos en cultivo a corto y largo plazo. En efecto, la beta-galactosidasa es conocida por estar presente en las células senescentes, mientras que no se encuentra actividad beta-galactosidasa en células presenescentes, quiescentes o inmortales.

Protocolo

[0053] Fibroblastos en cultivos en Labteck 8 pocillos se mantienen 2 semanas (efecto corto plazo) o 7 semanas (efecto largo plazo) en presencia o no del péptido SEQ ID n.º 3, diluido 1 % (a partir de una solución 10⁻⁴M). El tratamiento se efectúa una vez al día. Las células sin tratar pero mantenidas en cultivo durante 2 o 7 semanas en función de las necesidades del experimento sirven de control. El día del marcado, las células se enjuagan y se fijan en una mezcla (2 % glutaraldehído- 2 % formaldehído) durante 3 minutos. Las células se enjuagan y se aplican 300 µl de (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosidasa), denominada comúnmente X-gal (sustrato de la beta-galactosidasa). La incubación se efectúa 24 h en la incubadora de CO₂, y después las células se enjuagan y la Labteck se monta rápidamente en un medio adecuado. La observación se efectúa con microscopio de transmisión. El principio es simple, cuando las células son senescentes y contienen la beta-galactosidasa, el sustrato X-gal se escinde en un producto azul insoluble.

Resultados:

[0054] La actividad beta-galactosidasa se mide en las células control sin tratar por medio de una coloración de estas en azules. La actividad beta-galactosidasa se reduce en gran medida en las células tratadas por el péptido SEQ ID n.º 3. Este efecto se observa a la vez en las células tratadas a corto plazo (2 semanas de experimento) y también a largo plazo cuando las células se tratan durante 7 semanas consecutivas.

Conclusión:

[0055] La administración del péptido SEQ ID n.º 3 permite poner de manifiesto un efecto antienvjecimiento en fibroblastos en cultivo envejecidos artificialmente durante 2 o 7 semanas.

Ejemplo 5: preparación de una crema antienvjecimiento

[0056]

<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
Cetiol SB 45	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00

ES 2 578 636 T3

Nombres comerciales	Denominación INCI	% en peso
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Abil 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzima Q 10	Ubiquinone	0,10
Fase B		
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Phenopip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,75
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.º2		1 ppm
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,50
Collaxyl	Water (and) Butylene Glycol (and) Hexapeptide-9	3,00
Fase F		
Perfume	Parfum (Fragrance)	c.s.p.
Colorante		c.s.p.

Procedimiento:

- 5 **[0057]** 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 alrededor de 45°C, el carbomer se neutraliza por medio de la adición de la fase D. A continuación se añade la fase E 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

10 **[0058]**

<110> ISP Investments Inc

<120> PÉPTIDOS NOVEDOSOS ANTIENVEJECIMIENTO Y COMPOSICIÓN COSMÉTICA Y/O FARMACÉUTICA QUE LOS CONTIENE

<130> Bv PCT 09-114

15 <150> FR 0900066

<151> 2009-01-09

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 7

ES 2 578 636 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDATION

<400>1

10

Tyr Val Ser Thr Pro Tyr Asn
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> AMIDATION

20

<400> 2

Val Ser Thr Pro Glu
1 5

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

25

<220>
<223> Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> AMIDATION

30

<400> 3

Ser Thr Pro
1

35

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 578 636 T3

<220>
<223> Synthetic peptide

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> AMIDATION

<400> 4

Leu His Ser Thr Pro
1 5

10 <210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDATION

<400> 5

Arg His Ser Thr Pro Glu
1 5

20 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Synthetic peptide

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

<400> 6

His Ser Thr Pro Glu
1 5

REIVINDICACIONES

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



en la cual,

X_1 representa una treonina, una serina o es igual a cero,

X_2 representa una isoleucina, una leucina, una valina, una alanina, una glicina o es igual a cero,

AA representa un aminoácido cualquiera salvo prolina, o uno de sus derivados, y n y p son números enteros comprendidos entre 0 y 4,

R_1 representa la función amina primaria del aminoácido N-terminal, libre o sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre un grupo acetilo, un grupo benzoílo, un grupo tosilo o un grupo benciloxicarbonilo,

R_2 representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, sustituida por un grupo protector que puede seleccionarse de entre una cadena alquilo de C_1 a C_{20} , o 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 3 a 13 residuos de aminoácidos, **caracterizado por que** se corresponde con una de las fórmulas siguientes:

(SEQ ID n.º1) Tyr - Val - Ser - Thr - Pro - Tyr - Asn - NH_2

(SEQ ID n.º2) Val - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

(SEQ ID n.º3) Ser - Thr - Pro - NH_2

(SEQ ID n.º4) Leu - His - Ser - Thr - Pro - NH_2

(SEQ ID n.º5) Arg - His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2

(SEQ ID n.º6) His - Ser - Thr - Pro - Glu - NH_2 ,

y permite restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel.

2. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se emplea como medicamento.
3. Composición cosmética que comprende como principio activo dicho compuesto peptídico según la reivindicación 1.
4. Composición cosmética según la reivindicación 3, **caracterizada por que** se presenta en una forma adaptada para su aplicación por vía tópica, comprendiendo un medio cosméticamente aceptable.
5. Composición cosmética según una de las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizada por que** dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre alrededor de 0,0005 y 500 ppm, y preferiblemente en una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm.
6. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizada por que** dicho principio activo peptídico se solubiliza en uno o varios disolventes, como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, aceite vegetal o toda mezcla de dichos disolventes.
7. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizada por que** contiene además al menos otro principio activo que favorece la acción de dicho principio activo peptídico seleccionado entre un agente antirradicales o antioxidante, o un agente que estimula la síntesis de macromoléculas dérmicas, o incluso un agente que estimula el metabolismo energético.
8. Compuesto peptídico según se define en la reivindicación 1, como principio activo activador de Clock.

- 5
- 10
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 para restaurar el ritmo circadiano y resincronizar el reloj biológico de las células de la piel.
 10. Composición según la reivindicación 9 para activar la renovación celular y estimular el metabolismo celular.
 11. Composición según la reivindicación 9 para reducir las disfunciones causadas por el desfase horario y/o el trabajo nocturno.
 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento, y reducir los signos de fatiga de la piel.
 13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizada por que** se aplica en la piel o en las faneras a tratar antes de dormir de modo que respete el ritmo circadiano de la piel.