

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 580**

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 10704582 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2376530**

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

30 Prioridad:

**09.01.2009 FR 0900069**

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

**06.10.2016**

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 2 585 580 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 refiere a compuestos peptídicos de fórmula general  $R_1 - X_1 - X_2 - \text{Ser} - \text{Pro} - \text{Leu} - \text{Gln} - X_3 - X_4 - R_2$  así como a sus usos en cosmética y/o farmacéutica para prevenir y corregir los efectos del envejecimiento y las agresiones UV de la piel y las faneras.

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. Todos estos cambios no solo afectan a la piel, sino también a las faneras como las uñas y el cabello. Por ejemplo, el cabello se vuelve apagado, o entrecano, o incluso se cae precozmente.

25 **[0003]** Con el fin de remediar estos inconvenientes, se han propuesto numerosas composiciones cosméticas en los últimos años. Estas composiciones incluían el uso, solo o en combinación, de agentes hidratantes, calmantes, antiinflamatorios, antirradicales libres, antiseborreicos, cicatrizantes, blanqueadores, queratolíticos... No obstante, ninguna de dichas composiciones permite en la actualidad prevenir o corregir los efectos del envejecimiento de origen intrínseco o extrínseco de la piel.

30 **[0004]** De forma sorprendente, el solicitante ha descubierto que los compuestos peptídicos de la siguiente fórmula general  $R_1 - X_1 - X_2 - \text{Ser} - \text{Pro} - \text{Leu} - \text{Gln} - X_3 - X_4 - R_2$  tenían un efecto antienvjecimiento sobre la piel por medio de una acción global sobre diversos síntomas característicos de este último. No hay ningún documento en la técnica anterior que describa dichos compuestos peptídicos para obtener un efecto antienvjecimiento. Además, estos compuestos peptídicos se caracterizan por el hecho de que son agentes activadores del gen Clock implicados en la regulación del ciclo circadiano. En consecuencia, la presente invención tiene como objeto unos compuestos peptídicos activadores de Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), así como su uso en composiciones cosméticas y farmacéuticas para prevenir o corregir los signos debidos al envejecimiento y a las agresiones UV de la piel y las faneras.

40 **[0005]** 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).

45 **[0006]** 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.

50 **[0007]** Hasta ahora, en la técnica anterior, se han propuesto numerosas aplicaciones en lo que respecta al uso de nucleótidos y/o de 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. También se conoce el documento WO9957137 que describe composiciones que constan de una proteína BMAL 1 aislada y una proteína CLOCK aislada, y que asimismo constan de la proteína PER aislada y finalmente la proteína TIM aislada, y se refiere también a los análisis dependientes de BMAL 1/CLOCK con el fin de identificar moduladores de la expresión del gen *period* y además a los métodos que permiten diagnosticar los problemas relacionados con una anomalía del ritmo circadiano. No obstante, ningún documento de la técnica anterior describe el uso de péptidos específicos activadores de Clock para prevenir o corregir los signos del envejecimiento o incluso las consecuencias de las agresiones UV.

60 **[0008]** La presente invención tiene como primer objeto un compuesto peptídico de fórmula (I) siguiente:



**[0009]** En la cual,

$X_1$  representa una cisteína, una metionina o es igual a cero,

$X_2$  representa una serina, una treonina o es igual a cero,

5  $X_3$  representa una alanina, una glicina, una isoleucina, una leucina, una prolina, una valina o es igual a cero,

$X_4$  representa una asparagina, una glutamina o es igual a cero.

10 **[0010]**  $R_1$  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,

15  $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o 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 4 a 8 residuos de aminoácidos.

20 **[0011]** La presente invención tiene como segundo objeto una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende los compuestos peptídicos de fórmula general (I).

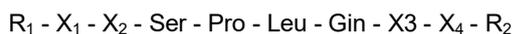
**[0012]** La presente invención tiene como tercer objeto un compuesto peptídico de fórmula general (I) como principio activo activador de Clock.

25 **[0013]** La presente invención tiene como cuarto objeto el uso de una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende los compuestos peptídicos de fórmula general (I) para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento.

30 **[0014]** La presente invención tiene como quinto objeto una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende los compuestos peptídicos de fórmula general (1) para proteger la piel frente a las agresiones debidas a los rayos UV.

35 **[0015]** Por último, la presente invención tiene como sexto objeto una composición cosmética o dermofarmacéutica aplicada tópicamente sobre la piel o las faneras a tratar antes de dormir de modo que se respete el ritmo circadiano de la piel para obtener un efecto rejuvenecedor en la piel.

**[0016]** El primer objeto de la invención se refiere a un compuesto peptídico de fórmula general (I) siguiente:



40

**[0017]** En la cual,

$X_1$  representa una cisteína, una metionina o es igual a cero,

$X_2$  representa una serina, una treonina o es igual a cero,

45

$X_3$  representa una alanina, una glicina, una isoleucina, una leucina, una prolina, una valina o es igual a cero,

$X_4$  representa una asparagina, una glutamina o es igual a cero.

50 **[0018]**  $R_1$  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,

55  $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o 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 4 a 8 residuos de aminoácidos.

60 **[0019]** Para mejorar la resistencia a la degradación, puede ser necesario utilizar una forma protegida del péptido según la invención. La forma de protección debe evidentemente ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con un uso en el campo de los cosméticos o de la farmacia. De forma preferida, el compuesto peptídico posee al menos un grupo funcional protegido por un grupo protector, siendo dicho grupo protector o bien una acetilación del extremo amino terminal o una amidación o esterificación del extremo carboxi terminal, o bien

las dos. Preferiblemente, se utiliza una protección basada en la amidación de la función hidroxilo del extremo carboxi terminal por medio de un grupo NYY en el que Y representa una cadena alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, o la esterificación por medio de un grupo alquilo.

5 **[0020]** Preferiblemente, el compuesto peptídico presenta una de las secuencias siguientes:

(SEQ ID n.º1) Ser - Pro - Leu - Gln - NH<sub>2</sub>

(SEQ ID n.º2) Thr - Ser - Pro - Leu - Gln

(SEQ ID n.º3) Ser - Ser - Pro - Leu - Gln -Leu - NH<sub>2</sub>

10 (SEQ ID n.º4) Ser - Ser - Pro - Leu - Gln - Ala - Asn - NH<sub>2</sub>

**[0021]** En una forma de realización concreta, la secuencia del compuesto peptídico es la secuencia SEQ ID n.º1, es decir Ser - Pro - Leu - Gln - NH<sub>2</sub>.

15 **[0022]** La invención se refiere además 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 4. Por «secuencia peptídica idéntica en al menos un X %», se entiende la designación de 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 con algoritmos de homologías locales como los utilizados por los programas informáticos BLAST P o T BLAST N disponibles en el sitio NCBI.

25 **[0023]** El término «homólogo» puede designar además un péptido que difiere de la secuencia de un péptido de secuencia SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 4 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 hacen entre Ala, Val, Leu y 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.

30 **[0024]** El término «péptido» designa un encadenamiento de dos o varios aminoácidos ligados entre sí por medio de enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados.

35 **[0025]** Por «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 esté total o parcialmente constituida por la secuencia del péptido anteriormente descrito.

40 **[0026]** 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.

**[0027]** El péptido según la invención puede ser de origen natural o sintético. Preferiblemente según la invención, el péptido se obtiene por síntesis química.

45 **[0028]** 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.

**[0029]** El compuesto peptídico según la invención puede utilizarse como medicamento.

50 **[0030]** El segundo objeto de la presente invención se refiere a composiciones cosméticas que comprenden dicho compuesto peptídico de fórmula general (I). De forma preferida, las composiciones según la invención se presentan en una forma adaptada para su aplicación por vía tópica que comprende 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.

60 **[0031]** 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.

**[0032]** 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 incluso en forma de cuidados para las uñas como los esmaltes de uñas.

**[0033]** 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 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 dérmicas, o incluso un agente que estimule el metabolismo energético.

**[0034]** Asimismo, pueden añadirse a la composición aditivos tales como agentes espesantes, emulsionantes, humectantes, emolientes, perfumes, antioxidantes, agentes filmógenos, quelantes, secuestrantes, 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, por ejemplo, corresponderse con un 0,01 a 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.

**[0036]** Un tercer objeto de la presente invención se refiere al uso del compuesto peptídico del modo definido anteriormente como principio activo activador de Clock. Por compuesto peptídico «activador de Clock» se entiende todo péptido o derivado biológicamente activo 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.

**[0037]** Un cuarto objeto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende dicho compuesto peptídico 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, así como toda modificación interna de la piel que no se traduce sistemáticamente en un aspecto exterior modificado como, por ejemplo, el adelgazamiento de la dermis o cualquier otra degradación interna de la piel.

**[0038]** Además, la presente invención se refiere al uso de una composición según dicha invención para la protección de la piel frente a las agresiones debidas a los rayos UV.

**[0039]** Otro objeto de la invención se refiere al uso de una cantidad eficaz de principio activo peptídico según la invención para la preparación de una composición farmacéutica destinada a prevenir o a luchar contra las patologías relacionadas con los procesos de oxidación.

**[0040]** Un último objeto de la presente invención se refiere a la aplicación tópica sobre la piel o las faneras a tratar de una composición que contiene una cantidad eficaz de principio activo peptídico para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento o proteger la piel frente a las agresiones debidas a los rayos UV. La composición se aplica antes de dormir de modo que se respete el ritmo circadiano de la piel para obtener un efecto rejuvenecedor en 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 rejuvenecedor, estimulando la renovación celular y regenerando.

**[0041]** Los siguientes ejemplos describen y demuestran la eficacia de compuestos peptídicos como los descritos según la invención. La formulación cosmética citada es representativa de la invención pero se proporciona únicamente a modo ilustrativo y no debe interpretarse como una limitación de la presente invención.

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

10 **[0042]** Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 1 mediante la evaluación de la expresión de la proteína Clock en inmunoelectrotransferencia en fibroblastos en cultivo y en inmunohistoquímica por marcado de la proteína Clock por inmunomarcado. La técnica de la inmunoelectrotransferencia es un método semicuantitativo que permite apreciar la proporción de proteína Clock en las células dérmicas.

Protocolo

15 a) Estudio en inmunoelectrotransferencia

**[0043]** Se cultivan fibroblastos en cultivos en cajas de 100 mm de diámetro a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> durante 16 h en presencia o no del péptido SEQ ID n.º 1, diluido 1 % (a partir de una solución 10<sup>-4</sup>M). 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 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 horas 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.

b) Estudio en inmunohistoquímica

35 **[0044]** Se cultivan fibroblastos en cultivos en cámaras de 8 pocillos (Labteck) a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> durante 18 h en presencia o no del péptido SEQ ID n.º 1, diluido 1 % (a partir de una solución 10<sup>-4</sup>M). Las células no tratadas se cultivan al mismo tiempo y sirven de control. El día del marcado, las células se enjuagan y se fijan en una mezcla (2 % glutaraldehído - 2 % formaldehído) durante 3 minutos y después se enjuagan. Se aplica el anticuerpo primario (ABcam) diluido 1/250 durante 1 hora y un anticuerpo secundario 1/50 acoplado a un fluorocromo durante 1 hora. Las células se montan entre portaobjetos y cubreobjetos en un medio de montaje adecuado y se observan con microscopio de epifluorescencia.

Resultados:

45 **[0045]** Los resultados obtenidos en inmunoelectrotransferencia muestran que el tratamiento por medio del péptido SEQ ID n.º 1, diluido a 1 % aumenta la cantidad de proteína Clock presente en los fibroblastos en cultivo. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Intensidad (%)	Experimento 1
Control sin tratar	100 %
1 % tratamiento	179 %

50 **[0046]** Estos resultados se confirman por el marcado de la proteína Clock en los fibroblastos. En efecto, se muestra un aumento de la expresión de la proteína Clock en los fibroblastos tratados.

Conclusión:

55 **[0047]** La administración del péptido SEQ ID n.º 1 permite aumentar la cantidad de proteína Clock en las células dérmicas en cultivo.

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

60 **[0048]** Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 1 mediante la evaluación de la expresión de las proteínas Clock y Per-1 en biopsias de piel ex vivo.

Protocolo

5 **[0049]** Los estudios *ex vivo* por inmunomarcado han permitido demostrar la expresión de las proteínas Clock y Per-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 1 diluido a 1 % (a partir de una solución 10<sup>-4</sup>M) se aplica de forma tópica en dichas muestras durante 48 h, 2 veces cada 24 h.

10 **[0050]** Las muestras de piel no tratadas por el péptido SEQ ID n.º 1 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.

**[0051]** 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 **[0052]** 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 **[0053]** Los portaobjetos se montan entonces en un medio adecuado y se observan con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

Resultados:

25 **[0054]** Los resultados obtenidos muestran que las pieles tratadas con el péptido SEQ ID n.º 1 expresan una cantidad de proteína Clock muy superior a la de las pieles sin tratar.

**[0055]** Del mismo modo, se muestra que las pieles tratadas con el péptido SEQ ID n.º 1 expresan una cantidad de proteína Per-1 superior a la de las pieles no tratadas.

30 **[0056]** 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.º1 diluido a 1 %
Marcado proteína Clock	+/-	++
Marcado proteína PER-1	+	+

Conclusión:

35 **[0057]** El péptido SEQ ID n.º 1 permite aumentar la cantidad de las proteínas Clock y Per-1 en las biopsias de piel.

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

40 **[0058]** Se ha realizado un estudio del efecto activador del péptido SEQ ID n.º 1 mediante la evaluación de la expresión de las proteínas Clock y Per-1 en modelos de piel, envejecidos artificialmente en cultivo. El análisis se ha llevado a cabo tras 62 h y 134 h de cultivo.

Protocolo

45 **[0059]** Los estudios *ex vivo* por inmunomarcado han permitido demostrar la expresión de las proteínas Clock y Per-1 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<sup>-4</sup>M) se aplica de forma tópica en dichas muestras 2 veces al día durante el tiempo del experimento.

50 **[0060]** Las muestras de piel no tratadas por el péptido SEQ ID n.º 1 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.

55 **[0061]** 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.

60 **[0062]** Los portaobjetos se montan entonces en un medio adecuado y se observan con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

Resultados:

[0063] Los resultados obtenidos muestran que el marcado de la proteína Clock (esencialmente epidérmico) aumenta tras 62 h de cultivo con respecto a los portaobjetos control sin tratar. Del mismo modo, la expresión de la proteína Per-1 aumenta tras 62 h de tratamiento. Este marcado se mantiene en el tiempo ya que al cabo de 134 h 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°1 diluido a 1 %
Marcado Clock	62 h	+	++
	134 h	+	++
Marcado Per-1	62 h	+/-	++
	134 h	+/-	+

Conclusión:

[0064] El péptido SEQ ID n.º 1 permite aumentar la cantidad de las proteínas Clock y Per-1 en biopsias de piel tratadas y envejecidas artificialmente en cultivo.

**Ejemplo 4: Demostración del efecto protector del péptido SEQ ID n.º 1 en biopsias de piel en el envejecimiento**

[0065] Paralelamente se ha realizado un estudio del efecto protector del péptido SEQ ID n.º 1 mediante la evaluación en inmunohistología mediante una coloración de cortes de piel de los daños causados por un envejecimiento de 62 h y 134 h.

Protocolo

[0066] Unas muestras de piel humana se ponen en cultivo en la interfaz aire/líquido. El péptido SEQ ID n.º 1 diluido 1 % (a partir de una solución 10<sup>-4</sup>M) se aplica de forma tópica en dichas muestras durante 62 h y 134 h. La aplicación se renueva 2 veces al día durante el tiempo del experimento. Unas muestras de piel no tratadas sirven de control durante el tiempo del experimento. Las muestras de piel se fijan con formaldehído 4 % y se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 3 µm con micrótopo. Se realiza una coloración de los tejidos por medio de hematoxilina (que colorea los núcleos en azul-negro) y eosina que es específica de la coloración de la coloración de los citoplasmas. La estructura morfológica de las biopsias se aprecia después con microscopio de transmisión.

Resultados:

[0067] Los resultados obtenidos muestran que las pieles sin tratar con el péptido SEQ ID n.º 1 se dañan, las células muestran aspecto vacuolado, las células parecen mostrar daños con células cuyos núcleos están muy condensados (signos apoptóticos). En cambio, las pieles tratadas con el péptido SEQ ID n.º 1 tienen una estructura morfológica bien conservada, los desgastes debidos al envejecimiento son menos visibles. Para los dos experimentos 62 y 134 h, el péptido SEQ ID n.º 1 protege las biopsias de piel del envejecimiento.

Conclusión:

[0068] El péptido SEQ ID n.º 1 permite poner de manifiesto un efecto protector sobre la morfología estructural de las biopsias de piel sometidas a un envejecimiento artificial en cultivo.

**Ejemplo 7: preparación de una composición**

[0069]

Crema protección solar:

<b>Nombres comerciales</b>	<b>Denominación INCI</b>	<b>% en peso</b>
FASE A		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	c.s.p.
Pemulen TR1	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,40

ES 2 585 580 T3

FASE A		
Glicerina	Glycerin	3,00
Nipastat Sodium	Sodium Methylparaben (and) Sodium Ethylparaben (and) Sodium Butyl paraben (and) Sodium Propylparaben (and) Sodium Isobutylparaben	0,15
FASE B		
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnamate	7,50
Eusolex 4360	Benzophenone-3	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	2,00
Myritol 318	Caprylic/Capric Triglyceride	4,00
Emulgade SEV	Hydrogenated Palm Glycerides (and) Cetareth-20 (and) Cetareth-12 (and) Cetearyl Alcohol	5,00
Propilparabeno	Propylparaben	0,15
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
FASE C		
TEA	Triethanolamine	0,20
FASE D		
Péptido SEQ ID n.º 2		3 ppm
Perfume	Parfum (Fragrance)	c.s.p.
Colorante		c.s.p.

**[0070]** Los constituyentes de la fase A y de la fase B se calientan por separado entre 70 °C et 75 °C. La fase B se emulsiona en la fase A sometida a agitación. Se añade la fase C a 45 °C mediante un aumento de la agitación. La fase D se añade a continuación cuando la temperatura se sitúa por debajo de los 40 °C. Se prosigue con el enfriamiento hasta los 25 °C bajo agitación viva.

SEQUENCE LISTING

**[0071]**

<110> ISP Investments inc

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

<130> Bv PCT 09-117

<150> FR0900069

<151> 2009-01-09

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

ES 2 585 580 T3

<222> (4)..(4)  
<223> AMIDATION

5 <400> 1

**Ser Pro Leu Gln**  
**1**

10 <210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 2

**Thr Ser Pro Leu Gln**  
**1 5**

20 <210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Synthetic peptide

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> AMIDATION

<400>3

**Ser Ser Pro Leu Gln Leu**  
**1 5**

35 <210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> synthetic peptide

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> AMIDATION

50 <400> 4

**Ser Ser Pro Leu Gln Ala Asn**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

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

5  $R_1-X_1-X_2-Ser-Pro-Leu-Gln-X_3-X_4-R_2$

en la cual,

$X_1$  representa una cisteína, una metionina, o es igual a cero

10  $X_2$  representa una serina, una treonina, o es igual a cero,

$X_3$  representa una alanina, una glicina, una isoleucina, una leucina, una prolina, una valina o es igual a cero,

15  $X_4$  representa una asparagina, una glutamina, o es igual a cero.

$R_1$  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,

20  $R_2$  representa el grupo hidroxilo de la función carboxilo del aminoácido C-terminal, libre o 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 4 a 8 residuos de aminoácidos.

- 25 2. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el péptido de fórmula general (I) posee al menos un grupo funcional protegido por un grupo protector, siendo dicho grupo protector o bien una acetilación del extremo amino terminal o una amidación o esterificación del extremo carboxi terminal, o bien las dos.

- 30 3. Compuesto peptídico según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** se corresponde con una de las siguientes fórmulas:

(SEQ ID n°1) Ser - Pro - Leu - Gln -  $NH_2$

(SEQ ID n°2) Thr - Ser - Pro - Leu - Gln

35 (SEQ ID n°3) Ser - Ser - Pro - Leu - Gln - Leu -  $NH_2$

(SEQ ID n°4) Ser - Ser - Pro - Leu - Gln - Ala - Asn -  $NH_2$

- 40 4. Compuesto peptídico según una de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por que** se utiliza como medicamento.

5. Composición cosmética que comprende como principio activo dicho compuesto peptídico según una de las reivindicaciones 1 a 3.

- 45 6. Composición cosmética según la reivindicación 5, **caracterizada por que** se presenta en una forma adaptada para su aplicación por vía tópica que comprende un medio cosméticamente aceptable.

7. Composición cosmética según una de las reivindicaciones 5 o 6, **caracterizada por que** dicho compuesto peptídico está presente en la composición en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,0005 y 500 ppm, y preferiblemente en una concentración comprendida entre 0,01 y 5 ppm.

- 50 8. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **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.

- 55 9. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, **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.

- 60 10. Compuesto peptídico como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4 como principio activador de Clock.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento.

12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para proteger la piel frente a las agresiones debidas a los rayos UV.
- 5 13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, **caracterizada por que** se aplica de forma tópica en la piel o las faneras a tratar antes de dormir de modo que se respete el ritmo circadiano de la piel para obtener un efecto rejuvenecedor en la piel.