

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 742**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 36/54 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2005 PCT/FR2005/001076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2005 WO05105123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2005 E 05767512 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 1744775**

54 Título: **Medicamento que comprende un extracto peptídico de aguacate destinado al tratamiento y a la prevención de las enfermedades relacionadas con una deficiencia del sistema inmunitario**

30 Prioridad:

30.04.2004 FR 0404640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2017

73 Titular/es:

**LABORATOIRES EXPANSCIENCE (100.0%)
10, Avenue de l'Arche
92400 Courbevoie, FR**

72 Inventor/es:

**PICCIRILLI, ANTOINE;
PICCARDI, NATHALIE;
MSIKA, PHILIPPE;
PAUL, FRANÇOIS y
BREDIF, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 600 742 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

Medicamento que comprende un extracto peptídico de aguacate destinado al tratamiento y a la prevención de las enfermedades relacionadas con una deficiencia del sistema inmunitario.

La presente invención se refiere a un medicamento que comprende un extracto peptídico de aguacate, destinado ventajosamente al tratamiento y/o a la prevención de enfermedades relacionadas con una deficiencia del sistema inmunitario, y más particularmente con una alteración de la inmunidad innata.

Todas las especies animales se enfrentan diariamente a un gran número de microorganismos, tales como bacterias, hongos, parásitos o virus, que pueden afectar a su salud o incluso a su supervivencia. Dos sistemas de defensa se oponen a estos microorganismos: un sistema llamado inmunidad innata, que es común a todos los animales, incluyendo el ser humano, y un sistema denominado adaptativo o específico, que es adquirido gracias a las células y a los mediadores de la inmunidad después del contacto con el agresor potencial.

Una diferencia entre las respuestas inmunitarias innatas o adaptativas se sitúa a nivel de los mecanismos de reconocimiento de los microorganismos implicados. En la inmunidad innata, la especificidad de los receptores está genéticamente determinada a partir del nacimiento y no es variable. Estos receptores se expresan en células tales como algunas células epiteliales y endoteliales, las células dendríticas, los monocitos y los macrófagos. Todas las estructuras reconocidas por los receptores de la inmunidad innata son comunes a numerosos microorganismos. Contrariamente a la respuesta inmunitaria adaptativa, los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata (fagocitosis, péptidos antimicrobianos, etc.) se activan desde el inicio de la infección y controlan de manera casi inmediata la proliferación de los patógenos que invaden el huésped. Después, la respuesta inmunitaria adaptativa toma el relevo.

Los péptidos antimicrobianos se han encontrado al mismo tiempo en el reino vegetal y animal, y se han descubierto en el ser humano más de 500 péptidos antimicrobianos diferentes de los insectos. Los péptidos antimicrobianos son unas moléculas de pequeño tamaño (de 10 a 50 aminoácidos) capaces de destruir una gran variedad de microorganismos (bacterias Gram+ y/o Gram-, hongos, virus, células transformadas), permeabilizando su membrana celular. Además, algunos de estos péptidos antimicrobianos a través de propiedades quimioatrayentes son capaces de reclutar unas células que participan en la inmunidad adaptativa, tales como las células dendríticas o también los linfocitos T. Numerosos péptidos antimicrobianos se han puesto en evidencia en la vernix caseosa y en el fluido amniótico, así como en la piel de los recién nacidos, sugiriendo su función clave en la defensa antimicrobiana durante el parto, pero también a partir del comienzo de la vida mientras que la inmunidad adquirida está todavía inmadura.

La mayoría de los organismos sintetizan varios tipos de péptidos antimicrobianos a nivel de sus diferentes epitelios, con el fin de definir un amplio espectro de actividad. En los mamíferos, se han descrito dos grandes clases de péptidos antimicrobianos, cuya producción es inducida durante un contacto con un microorganismo: las catelicidinas y las defensinas.

La catelicidina humana (LL-37) se ha aislado por primera vez a partir de células de médula ósea. La LL-37 está expresada en particular en la piel humana, a nivel de las uñas, así como a nivel de la membrana sinovial sana e inflamatoria, en particular en pacientes que padecen artrosis. La LL-37 posee un amplio espectro de actividad, y parece actuar en sinergia con otros péptidos antimicrobianos, en particular las defensinas. La LL-37 posee también unas propiedades quimioatrayentes, lo cual le confiere la capacidad de poder reclutar unas células de la inmunidad adaptativa.

Las defensinas están a su vez divididas en dos familias, α y β , en base a su estructura secundaria. Las α -defensinas (6 conocidas hoy en día) están principalmente localizadas en los gránulos de almacenamiento de las células especializadas tales como los neutrófilos, o las células de Paneth intestinales, mientras que las β -defensinas son características de los tejidos epiteliales. Además de su papel en la inmunidad innata, las defensinas son también conocidas por sus propiedades mitogénicas, lo cual sugiere su implicación potencial en los procesos de cicatrización.

En el ser humano, se han identificado 4 β -defensinas hoy en día (existirían más de 20 genes que codifican para unos péptidos antimicrobianos en nuestro genoma). La β -defensina 1 (hBD-1) humana está generalmente producida de manera constitutiva y se expresa en cantidad importante en los riñones y en una menor proporción a nivel del páncreas, de las glándulas salivares, del epitelio de las vías respiratorias, en el sistema uro-genital de la mujer, en la membrana sinovial sana, así como en la placenta. La hBD-1 se expresa también en la piel. Las otras formas de β -defensinas, hBD-2, 3 y 4, son inducibles. La hBD-3 se induce a nivel de las membranas sinoviales inflamatorias como, por ejemplo, en las patologías artrósicas. La expresión de hBD-2 se ha documentado, hasta la fecha, en la piel, el tracto uro-genital, las glándulas sudoríparas, y a nivel de la unidad pilo-sebácea.

A nivel de la piel, otros péptidos o proteínas, tales como la adrenomedulina, la cistatina, el inhibidor específico de la elastasa/SKALP/elafina, tendrían unas actividades antimicrobianas. Más recientemente, la dermicidina (amplio

espectro de actividad) se ha caracterizado como un péptido antimicrobiano específico de la piel que sería producido a nivel de las glándulas sudoríparas de ecrina, y cuya secreción simultánea con el sudor constituiría una parte importante del sistema de defensa innato contra las infecciones locales y sistémicas. La hBD-2 se ha caracterizado por primera vez en las escamas de psoriasis. La expresión de la hBD-2 y -3, así como de LL-37, aumenta a nivel de las lesiones de psoriasis, lo cual explicaría la mayor resistencia a las infecciones de los pacientes que padecen esta patología. A la inversa, en la dermatitis atópica (lesiones crónicas y lesiones por brotes), la expresión de LL-37 y de hBD-2 disminuye bajo la influencia de la interleucina-4 (IL-4) y de la interleucina-13 (IL-13), mediadores de la atopía. Esta deficiencia podría explicar la susceptibilidad incrementada en las infecciones de los pacientes que padecen dermatitis atópica. En el acné, la expresión de las β -defensinas (hBD-1 y -2) aumenta por reacción a la proliferación de *P. acnes*. Además, se supone que los acnéicos sufrirían un desequilibrio inicial de péptidos antimicrobianos, responsable de la proliferación bacteriana, bacterias que, en contrapartida, estimularían las defensas inmunitarias innatas.

La inflamación parece, por lo tanto, ser un factor preponderante en la inducción de los péptidos antimicrobianos. Así, se ha demostrado también que la interleucina-1, el TNF- α (Tumor Necrosis alfa) y la irradiación ultravioleta estimulan la producción de hBD-2. La expresión de hBD-2 está también relacionada con el estado de diferenciación de los queratinocitos. Así, la estimulación de la producción de los péptidos antimicrobianos, en particular de la familia de las defensinas, y más particularmente de hBD-2, permitiría promover y/o restablecer la inmunidad innata, en particular a nivel de los ojos y de los epitelios (epidermis, mucosas vaginal, intestinal, nasal y auricular, vías respiratorias).

La cavidad bucal está constantemente expuesta a una gran variedad de microbios (bacterias, virus, hongos). Entre otros, está bien establecido que unas bacterias tales como *actinobacillus actinomycetemcomitans*, *porphyromonas gingivalis* son unos factores claves que participan en el desarrollo de las enfermedades periodontales (gingivitis y parodontitis). El epitelio gingival constituye el primer escudo contra los diferentes patógenos presentes en la esfera bucal. Con este fin, los queratinocitos gingivales producen un amplio panel de péptidos antimicrobianos, hBD-1, -2, -3, LL37. Estos péptidos son también producidos a nivel de la mucosa bucal, así como por las glándulas salivales.

Más particularmente, la estimulación de los péptidos antimicrobianos permitiría promover y/o restablecer la inmunidad innata a nivel de la piel sana o patológica de los recién nacidos y de los niños, cuya inmunidad es generalmente deficiente, y a nivel de la piel de los adultos o de las personas mayores con buena salud o enfermas (inmunodeprimidas). Esta estimulación permitiría así completar ventajosamente el sistema de defensa pasivo de la piel que constituye el estrato córneo (corneocitos + cemento interceular) y preparar la respuesta inmunitaria adaptativa en los recién nacidos, los niños, los adultos y las personas mayores, con buena salud o enfermas. Paralelamente, esta estimulación permitiría promover la cicatrización.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que una composición que comprende un extracto peptídico de aguacate permite el aumento de la producción de péptidos antimicrobianos, ventajosamente de la hBD-2.

Así, la presente invención tiene por objeto un medicamento que comprende un extracto peptídico de aguacate, que comprende del 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico, y un excipiente apropiado.

En el marco de la presente invención, se entiende mediante los términos "nitrógeno alfa-aminado", el contenido en nitrógeno de los péptidos en forma de grupos alfa-aminados libres. La medición del contenido en nitrógeno alfa-aminado de los péptidos permite evaluar el grado de hidrólisis de las proteínas así como la masa molar media de los péptidos.

El extracto peptídico de aguacate puede así ser directamente obtenido a partir de cualquier parte del aguacate o del árbol de aguacate, tal como el fruto, la piel, el hueso, la hoja o las raíces del árbol de aguacate. Es posible asimismo obtener un extracto peptídico de aguacate a partir de co-productos de la industria de transformación del aguacate, entre las cuales se puede citar de manera no exhaustiva: la pulpa fresca de aguacate, la pulpa congelada, deshidratada, las pastas de aguacate procedentes de procesos de extracción de aceite (extracción mecánica y/o por disolvente del fruto previamente deshidratado), las materias sólidas desaceitadas procedentes de los procedimientos de extracción de aceite por vía húmeda (procedimiento denominado de centrifugación), las materias sólidas desaceitadas procedentes de los procedimientos de extracción de aceite de aguacate por vía enzimática, los purés de aguacate brutos (guacamole), los desechos sólidos procedentes de las unidades de producción de estos purés. El extracto se obtiene ventajosamente a partir del fruto fresco del árbol de aguacate. Los frutos podrán ser seleccionados de entre las variedades *Hass*, *Fuerte*, *Ettinger*, *Bacon*, *Nabal*, *Anaheim*, *Lula*, *Reed*, *Zutano*, *Queen*, *Criola Selva*, *Mexicana Canta*, *Region Dschang*, *Hall*, *Booth*, *Peterson*, *Collinson Red*, más ventajosamente, las variedades *Hass*, *Fuerte* y *Reed*. Preferentemente, se seleccionarán las variedades *Hass*, *Fuerte*, *Ettinger* y *Bacon*, y más ventajosamente las variedades *Hass* y *Fuerte*.

El fruto del árbol de aguacate está principalmente constituido por agua, por pulpa, por aceite y por hueso. Las proporciones de estos constituyentes son, al igual que cualquier materia natural y vegetal, extremadamente

variables. Sin embargo, se admiten generalmente los datos de composición medios siguientes, expresados en porcentaje de fruto fresco, dados en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Agua	70-85%
Proteínas	1,5-4,5%
Lípidos	12-23%
Azúcares	1,5-5%
Fibras	1,1-1,6%

Con respecto a la pulpa, las proteínas del aguacate representan del 1,5 al 2,5% (J. P. Gaillard, l'Avocatier, Edición G.P. Maisonneuve et Larose, 1987, páginas 266-67). La distribución de aminoácidos, expresada en porcentaje en peso con respecto al peso total de los aminoácidos, se da en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2

Alanina	5-7
Arginina	3-5
Ácido aspártico	8-12
Cistina-Cisteína	< 1
Ácido glutámico	11-13
Glicina	4-6
Histidina	4-6
Isoleucina	4-7
Leucina	8-11
Lisina	4-7
Metionina	1-3
Fenilalanina	4-6
Prolina	4-7
Serina	4-6
Treonina	4-6
Tirosina	3-6
Valina	4-7

Los principales aminoácidos son el ácido glutámico, el ácido aspártico y la leucina.

Por comparación con las plantas oleoproteaginosas clásicas tales como la soja, el girasol o la colza, el aguacate es claramente más pobre en proteínas. Por otro lado, la relativa riqueza del fruto en fibras hace muy difícil la accesibilidad a estas proteínas por las vías clásicas, química o bioquímica. Además, el carácter muy poco hidrosoluble de estas macromoléculas naturales invita a preparar unas fracciones hidrolizadas de estas proteínas (péptidos), que presentan una alta solubilidad en agua, y una mejor biodisponibilidad. Por consiguiente, su potencial alergénico puede también ser eliminado. La invención tendrá por lo tanto también como objetivo la preparación de un extracto peptídico de aguacate, por una vía de síntesis cuidada y no desnaturalizante de las proteínas hidrolizadas.

Más particularmente, el extracto peptídico de aguacate es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- obtención de una pasta de aguacate, ventajosamente del fruto del aguacate, por secado y después extracción del aceite (lípidos); después
- criotrituración y deslipidación completa de dicha pasta y después decantación, centrifugación y recuperación de la pasta; después
- primera hidrólisis en presencia de glucanasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación de la fracción soluble;
- segunda hidrólisis en presencia de una o varias proteasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación del residuo, después
- concentración de la fase peptídica por nanofiltración;
- decoloración, en presencia de carbón activo por ejemplo, seguida de una filtración simple (10 µm) y después de una ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD); y por último

- llegado el caso, microfiltración esterilizante final (0,2 μ m), adición de conservante y acondicionamiento.

Según una variante ventajosa de la invención, la primera etapa del procedimiento consiste en secar el fruto y después en desaceitarlo. Así, después del loncheado del fruto en finas láminas, su secado se puede realizar mediante el conjunto de las técnicas conocidas por el experto en la materia, entre las cuales se puede citar el secado con aire caliente, la liofilización o también el secado osmótico. De manera general, la temperatura durante esta etapa de secado será ventajosamente mantenida, sea cual sea la técnica empleada, inferior o igual a 80°C. En el marco del presente procedimiento, por razones de facilidad de elaboración y por razones de coste, se prefiere el secado en secadoras ventiladas, en capa delgada y bajo corriente de aire caliente, a una temperatura comprendida entre 70 y 75°C. La duración de la operación puede variar de 5 a 72 horas.

Los lípidos del fruto secado se extraen después bien por vía mecánica en una prensa de tornillo continuo o también por vía química, con la ayuda de un disolvente, tal como el hexano, en un extractor de tipo Soxhlet o en un extractor continuo de banda, de tipo De Smet®, en particular según el procedimiento descrito en la solicitud FR 2 843 027, o también mediante un procedimiento que utiliza el CO₂ supercrítico. Entre los intereses principales del procedimiento, el aceite coproducido constituye evidentemente un producto directamente valorizable. Es por eso que se prefiere la extracción de los lípidos por vía mecánica.

El fruto seco y desaceitado, también denominado pasta, puede sufrir después las etapas siguientes:

- criotrituración
- deslipidación completa, en particular por un disolvente alimenticio no tóxico tal como el etanol y/o la acetona
- decantación, y después lavado de la pasta con agua,
- centrifugación y recuperación de la pasta,
- primera hidrólisis en presencia de una o varias glucanasas,
- centrifugación y eliminación de la fracción soluble,
- segunda hidrólisis en presencia de una o varias proteasas,
- centrifugación y eliminación de residuo,
- concentración por nanofiltración,
- decoloración en presencia de carbón activo,
- filtración simple (10 μ m), y después ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD),
- adición de conservante, microfiltración esterilizante final (0,2 μ m) y acondicionamiento.

El extracto acuoso final puede contener en peso del 1 al 60% de materia seca, o también del 3 al 20% de materia seca, preferentemente del 5 al 6% de materia seca. Con respecto al peso de la materia seca, el contenido másico en nitrógeno alfa-aminado podrá estar comprendido entre el 2 y el 10%, preferentemente entre el 5 y el 7%. El pH de una solución acuosa al 1,2% en peso de extracto seco estará generalmente comprendido entre 3 y 6, más ventajosamente entre 4 y 5. Los datos analíticos medios de una solución acuosa al 1,2% en peso de extracto seco, obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente, se dan en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Nitrógeno α -aminado (llamado método de "o-ftalaldehído" o "ninhidrina") (en porcentaje másico en la materia seca)		4-10
Proteínas (en porcentaje másico en la materia seca) ($N \times 6,25$) ¹		10-30
pH (1/4 de dilución)		4,5-7,0
Absorbancia (1/4 de dilución)	420 nm	0,1-0,6
	550 nm	0,02-0,1

¹N x 6,25 corresponde a la dosificación del nitrógeno total (N) de una muestra multiplicada por un coeficiente específico para la proteína dosificada. Cuando no se conoce precisamente el coeficiente de las proteínas dosificadas, se utiliza por convención el coeficiente 6,25.

La tabla 4 siguiente da la composición media en aminoácidos del extracto peptídico obtenido mediante el procedimiento según la invención, en el que los valores son expresados en porcentaje en peso con respecto al peso total de los aminoácidos dosificados. Los valores para el ácido aspártico y el ácido glutámico incluyen también los contenidos en asparagina y en glutamina, respectivamente.

Tabla 4

Aminoácido	Valor mínimo	Valor máximo
Alanina	6,4	7,8
Arginina	4,7	5,7
Ácido aspártico	10,3	12,7

Aminoácido	Valor mínimo	Valor máximo
Cistina-Cisteína	2,9	3,5
Ácido glutámico	13,0	15,8
Glicina	5,3	6,5
Histidina	2,2	2,6
Isoleucina	4,8	5,8
Leucina	7,6	9,4
Lisina	3,0	3,8
Metionina	1,2	1,6
Fenilalanina	4,7	5,7
Prolina	4,1	5,2
Serina	5,5	6,7
Treonina	4,6	5,6
Tirosina	3,6	4,4
Valina	5,8	7,2
Triptófano no dosificado		

El extracto obtenido podrá eventualmente ser liofilizado con el objetivo de obtener un polvo sólido (extracto seco), pero totalmente hidrosoluble con respecto a las proteínas originales del aguacate.

- 5 Según una variante ventajosa de la invención, el 50% por lo menos de los péptidos del extracto están constituidos por 10 a 30 unidades de aminoácidos. El tamaño de estos péptidos es, por lo tanto, mucho más pequeño en comparación con el de las proteínas nativas del aguacate. Estos péptidos presentan por lo tanto una biodisponibilidad mucho mejor, en particular cutánea.
- 10 El medicamento según la invención es particularmente apropiado para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades relacionadas con una modificación de la inmunidad innata y/o adquirida, por aumento de la producción de péptidos antimicrobianos, de la familia de la catelicidinas y/o de las beta-defensinas, ventajosamente de la hBD-2. En el sentido de la presente invención, el término "modificación" puede significar aumento o disminución.
- 15 El medicamento según la invención es también particularmente apropiado para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades relacionadas con una modificación de la inmunidad innata y/o adquirida por estimulación de los péptidos antimicrobianos like, tales como un inhibidor específico de la elastasa, particularmente la elafina (SKALP).
- 20 El medicamento según la invención permite ventajosamente estimular y/o completar la inmunidad innata y/o la inmunidad adquirida.
- De manera general, en el marco de la presente invención, dichas enfermedades pueden estar relacionadas con la presencia de microorganismos, en particular de bacterias Gram+ y/o Gram-, de hongos o de virus.
- 25 Más particularmente, dichas enfermedades pueden ser unas infecciones de los sistemas ocular y auditivo, de los epitelios no queratinizados (mucosa vaginal, intestinal, gingival, nasal, pulmonar, tracto respiratorio, anal y uretral, pulmonar) y queratinizados, tal como la piel. Dichas enfermedades pueden también ser unas infecciones de los folículos o anexos cutáneos (cabello, uñas, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas). Así, dichas enfermedades pueden ser unas patologías tales como la foliculitis, el furúnculo, el absceso, el impétigo o el panadizo.
- 30 Dichas enfermedades pueden ser unas patologías del cuero cabelludo, tales como la caspa, y más ampliamente unas afecciones relacionadas con una hiperseborrea.
- 35 Dichas enfermedades pueden también ser unas dermatosis inflamatorias, tales como la dermatitis atópica, el eczema atópico y/o de contacto, la psoriasis, el acné, y las dermatitis irritativas.
- Dichas enfermedades pueden también ser quemaduras, en particular quemaduras de primer o segundo grado.
- 40 Dichas enfermedades pueden también ser unas patologías relacionadas con una deficiencia de la barrera cutánea. Así, el medicamento según la invención se puede utilizar para el tratamiento de las pieles hiperreactivas (sensibles, irritadas, alérgicas), atópicas, secas o envejecidas. Dichas enfermedades pueden también ser unas patologías relacionadas con pieles debilitadas por una agresión medioambiental, en particular debido al frío, a la contaminación, al estrés, al tabaco, o a exposiciones solares.
- 45 En el marco de la presente invención, el medicamento es también apropiado para la protección de las pieles inmaduras, patológicas, de los recién nacidos y de los niños. En efecto, permite reforzar las defensas naturales de la epidermis del niño cuya inmunidad es generalmente deficiente.

En el marco de la presente invención, el medicamento es también apropiado para la protección de las pieles patológicas de los adultos o de las personas mayores, en particular de los individuos inmunodeprimidos.

El medicamento según la invención es también apropiado para favorecer la cicatrización, en los procesos de cicatrización normales o patológicos, tales como las úlceras y las escaras.

En el marco de la presente invención, el medicamento está también destinado a tratar y/o prevenir las enfermedades periodontales, las patologías articulares inflamatorias tal como la artrosis, las infecciones de las mucosas, en particular de las mucosas vaginal, intestinal, respiratoria, nasal u auricular, o las infecciones del sistema ocular.

Según una variante ventajosa de la invención, el medicamento comprende del 0,01 al 20% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, con respecto al peso total de dicho medicamento, aún más ventajosamente del 0,1 al 15% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, aún más ventajosamente del 0,5 al 10% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, más ventajosamente aún del 0,7 al 8% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, y más ventajosamente aún 1 a 5% en peso seco de extracto peptídico de aguacate.

Según una variante ventajosa de la invención, el medicamento comprende además D-manoheptulosa y/o perseitol (azúcares en C7) o uno de sus derivados químicos, ventajosamente en una cantidad del 0,001 al 30% en peso seco, con respecto al peso total del medicamento, más ventajosamente del 0,01 al 20% en peso seco, más ventajosamente aún del 0,1 al 10% en peso seco, más ventajosamente aún del 0,5 al 5% en peso seco

Se observa entonces ventajosamente un efecto de sinergia.

La fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es ventajosamente o bien un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate o de otra planta. De otra manera, la D-manoheptulosa y el perseitol están disponibles comercialmente (origen sintético). Según una variante ventajosa de la invención, la fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate que comprende por lo menos un 50% en peso, con respecto al peso total de la materia seca del extracto, de azúcares en C7.

El extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate es susceptible de ser obtenido por un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- obtención de una pasta de aguacate, ventajosamente del fruto de aguacate, por secado del aguacate y después extracción de los lípidos (aceite); después
- criotrituración y deslipidación completa de dicha pasta, después decantación y centrifugación con el fin de recuperar una fracción soluble rica en azúcares en C7 (eliminación de la pasta);
- desmineralización sobre resina iónica de dicha fracción soluble, obtenida en la etapa anterior; después
- ultrafiltración a 10000 daltons;
- llegado el caso, concentración por evaporación al vacío, adición de conservante, esterilización por microfiltración (0,2 µm) y acondicionamiento.

Según una variante ventajosa de la invención, la obtención de la pasta de aguacate y la extracción de los lípidos son ventajosamente efectuadas de manera idéntica para el extracto peptídico de aguacate y los azúcares de aguacate.

El fruto seco y desaceitado, o también denominado pasta, puede sufrir después las etapas siguientes:

- criotrituración
- deslipidación completa, ventajosamente con etanol y/o acetona,
- decantación y después lavado de la pasta con agua,
- centrifugación y recuperación de la fracción soluble (eliminación de la pasta),
- desmineralización por paso sobre resinas intercambiadoras de iones,
- ultrafiltración con un umbral de corte de 10 kD,
- concentración al vacío, adición de conservante y acondicionamiento.

De manera general, el extracto acuoso final puede contener del 0,1 al 10% en peso de materia seca, ventajosamente del 1 al 7% en peso de materia seca, aún más ventajosamente del 3 al 5% en peso de materia seca. El contenido en azúcares en C7, es decir en D-manoheptulosa y en perseitol, en la materia seca, es ventajosamente superior al 50% en peso, aún más ventajosamente está comprendido entre el 65 y el 90%, en peso, con respecto al peso total de la materia seca.

La composición relativa en azúcares del extracto hidrosoluble de aguacate, en peso con respecto al peso total de la materia seca del extracto, responde ventajosamente a los criterios siguientes (composición relativa determinada por

HPLC):

- D-manoheptulosa del 5 al 80%
- Perseitol del 5 al 80%
- Sacarosa inferior al 10%
- Glucosa inferior al 10%
- Fructosa inferior al 10%

5 El extracto hidrosoluble de azúcar de aguacate comprende ventajosamente, con respecto al peso total de la materia seca, del 1 al 99% en peso de manoheptulosa, más ventajosamente del 5 al 80% en peso de manoheptulosa, aún más ventajosamente del 10 al 80% en peso de manoheptulosa. El extracto hidrosoluble de azúcar de aguacate comprende ventajosamente, con respecto al peso total de la materia seca, del 20 al 80% en peso de perseitol, más ventajosamente del 25 al 70% en peso de perseitol.

10 Preferentemente, la composición relativa de azúcares del extracto hidrosoluble, en peso con respecto al peso total de la materia seca del extracto, responde a los criterios siguientes (composición relativa determinada por HPLC):

- D-manoheptulosa del 25 al 60%
- Perseitol del 25 al 60%
- Sacarosa inferior al 10%
- Glucosa inferior al 10%
- Fructosa inferior al 10%

15 El extracto obtenido podrá eventualmente ser liofilizado con el objetivo de obtener un polvo sólido (extracto seco), totalmente hidrosoluble.

20 Según una variante ventajosa de la invención, el medicamento según la invención comprende además un extracto peptídico de altramuz, ventajosamente en una cantidad másica, con respecto al peso total del medicamento, del 0,001 al 30% en peso seco, aún más ventajosamente del 0,01 al 10% en peso seco. El extracto peptídico de altramuz, añadido en la composición según la invención, comprende por lo menos el 70%, ventajosamente por lo menos el 80%, en peso de péptidos, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico. Se observa entonces ventajosamente un efecto de sinergia.

25 En particular, el extracto peptídico de altramuz es susceptible de ser obtenido por un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- preparación de una pasta de altramuz triturado o de una harina de altramuz micronizada;
- después deslipidación por extracción con un disolvente,
- extracción de las fracciones proteicas y osídicas solubles, o precipitación de las proteínas al punto isoeléctrico;
- eventualmente separación de la fracción proteica;
- hidrólisis enzimática de la fracción proteica, y recuperación, eventualmente después de la filtración, del extracto peptídico.

40 El procedimiento de preparación de un extracto peptídico está descrito en la patente FR 2 792 202, depositada por los laboratorios Expanscience.

45 El medicamento según la invención puede comprender además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los emolientes, los activos hidratantes, los activadores de la síntesis de queratina, los queratorreguladores, los queratolíticos, los agentes que reestructuran la barrera cutánea (activadores de la síntesis de los lípidos cutáneos, agonistas PPAR o Peroxysome Proliferator Activated Receptor), los activadores de la diferenciación de los queratinocitos (retinoides, Calcidone®, el calcio), los antibióticos, los agentes antibacterianos, los compuestos antifúngicos, los agentes antivirales, los seborreguladores, tales como los inhibidores de 5-
50 alfarreductasa, en particular el activo 5-alfa-Avocuta® comercializado por los laboratorios Expanscience, los inmunomoduladores, tales como el tacrolimo, el pimecrolimo, las oxazolininas, los conservantes, los agentes anti-irritantes, los agentes espesantes, unos filtros y protectores solares, los agentes antioxidantes, los factores de crecimiento, los agentes cicatrizantes o las moléculas eutróficas, los medicamentos y los agentes antiinflamatorios, y los compuestos que contienen insaponificables de aceites vegetales.

55 Los activadores de la síntesis de queratina que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente los retinoides, los péptidos de altramuz (comercializados por la compañía Silab), unas proteínas claves del estrato córneo o granulosa (queratinas).

- Los antibióticos que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente el ácido fucídico, la penicilina, las tetraciclinas, la pristinamicina, la eritromicina, la clindamicina, la mupirocina, la minociclina, la doxiciclina. Los agentes antivirales que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate, son ventajosamente el aciclovir y el valaciclovir. Los agentes anti-irritantes que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente la glicina, los azúcares y/o péptidos de altramuz, la Cicloceramida[®].
- Los agentes espesantes que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate, son ventajosamente el alfa bisabolol, los derivados de regaliz. Los queratorreguladores que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente los alfa-hidróxido ácidos y sus derivados. Un queratolítico que puede ser utilizado en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate es en particular el ácido salicílico y sus derivados. Los agentes antioxidantes que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente las vitaminas (C, E), los oligoelementos (cobre, zinc, selenio). Los factores de crecimiento que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente la becaplermina y la TGF-beta (Transforming Growth Factor beta).
- Los agentes cicatrizantes que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente la vitamina A, el panthenol, el Avocadofurane[®], el óxido de zinc, el magnesio, el silicio, el ácido madecásico o asiático.
- Los medicamentos que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención, en asociación con el extracto peptídico de aguacate, son ventajosamente los medicamentos apropiados para una administración por vía tópica u oral, para la prevención y/o el tratamiento de la atopia (corticoides, emolientes), del acné (antibióticos, peróxido de benzoilo, retinoides, ácido azelaico, vitamina PP, zinc, ciclinas), del eczema (inmunomoduladores, emolientes, aceite de salmón, de borraja, los prebióticos) o de psoriasis (corticoides, calcipotriol, calcitriol, tazaroteno, aceite de cade, acitretina, terapia de PUVA).
- Los agentes antiinflamatorios que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos agentes antiinflamatorios esteroideos (AIS), tales como los corticoides, o no esteroideos (AINS). Los agentes que reestructuran la barrera cutánea, que permiten estimular la síntesis de los lípidos claves de la epidermis, y que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate, son ventajosamente unos concentrados de girasol, también más ventajosamente unos concentrados de girasol linoleicos, tales como el activo comercializado por los Laboratoires Expanscience, Soline[®] (véase la solicitud internacional WO 01/21150), unos insaponificables de aceite vegetal, tal como el Avocadofurane[®] (véase la solicitud internacional WO 01/21150), unos agonistas PPAR (rosiglitazona, pioglitazona). Los agentes reestructurantes están ventajosamente presentes en una proporción que va del 0,001 al 30% en peso, con respecto al peso total del medicamento. Los compuestos antifúngicos que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente el econazol y el ketoconazol.
- Los conservantes antisépticos que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son por ejemplo el triclosán, la clorhexidina, los amonios cuaternarios.
- Los inmunomoduladores que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente el tacrolimo, el pimecrolimo y las oxazolininas.
- Las oxazolininas que pueden ser utilizadas en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unas oxazolininas seleccionadas de entre el grupo constituido por la 2-undecil-4-hidroxi-metil-4-metil-1,3-oxazolina, la 2-undecil-4,4-dimetil-1,3-oxazolina, la (E)-4,4-dimetil-2-heptadec-8-enil-1,3-oxazolina, la 4-hidroxi-metil-4-metil-2-heptadecil-1,3-oxazolina, la (E)-4-hidroxi-metil-4-metil-2-heptadec-8-enil-1,3-oxazolina, la 2-undecil-4-etil-4-hidroxi-metil-1,3-oxazolina. De manera aún más ventajosa, dicha oxazolina es la 2-undecil-4,4-dimetil-1,3-oxazolina, denominada OX-100 o Cicloceramida[®].
- Los compuestos que contienen unos insaponificables de aceites vegetales que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate, se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por los lípidos furánicos de aguacates, los insaponificables de aguacate y de soja, los concentrados de aceite de altramuz, los concentrados de aceite de girasol y sus mezclas.
- Los lípidos furánicos de aguacate que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos 2-alquilfuranos naturales, en particular el activo Avocadofurane[®] comercializado por los Laboratoires Expanscience,

que pueden ser obtenidos mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 01/21605.

Los insaponificables de aguacate y de soja que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente una mezcla de insaponificables de aguacate furánico y de insaponificables de soja, en una relación respectiva de aproximadamente 1/3-2/3. Los insaponificables de aguacate y de soja son aún más ventajosamente el producto Piasclédine®, comercializado por los Laboratoires Expanscience.

Los concentrados de aceite de altramuz que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos concentrados obtenidos por destilación molecular de aceite de altramuz, ventajosamente de aceite de altramuz blanco suave, tales como los descritos en la solicitud internacional WO 98/47479. Contienen ventajosamente alrededor del 60% en peso de insaponificables.

Los concentrados de aceite de girasol que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención en asociación, ventajosamente con un efecto de sinergia, con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos concentrados de girasol linoleicos, tales como el activo comercializado por los Laboratoires Expanscience, Soline® (véase la solicitud internacional WO 01/21150).

El medicamento según la invención está destinado al tratamiento y/o a la prevención de enfermedades que pueden afectar al ser humano y/o a los animales, en particular a los mamíferos. El medicamento según la invención puede estar formulado en forma de diferentes preparaciones adecuadas para una administración tópica, para una administración oral, rectal, vaginal, nasal, auricular o bronquial, para una administración parenteral. Preferentemente, las diferentes preparaciones son adecuadas para la administración tópica e incluyen las cremas, las pomadas, las lociones, los aceites, los parches, los aerosoles o cualquier otro producto para aplicación externa. Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas óptimas de los compuestos y composiciones según la invención pueden ser determinados según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico, en particular dermatológico o veterinario, adecuado para un paciente o para un animal, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente o del animal, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados o el tipo de piel. En función del tipo de administración deseada, el medicamento y/o los compuestos activos según la invención pueden comprender además por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular dermatológicamente aceptable. Preferentemente se utiliza un excipiente adecuado para una administración por vía tópica externa. El medicamento según la presente invención puede comprender además por lo menos un adyuvante farmacéuticamente conocido por el experto en la materia, seleccionado de entre los espesantes, los conservantes, los perfumes, los colorantes, unos filtros químicos o minerales, los agentes hidratantes, las aguas termales, etc.

La presente invención se refiere asimismo a una composición cosmética que comprende un extracto peptídico de aguacate y un excipiente apropiado cosméticamente aceptable. El extracto peptídico de aguacate comprende del 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico.

La composición cosmética según la invención comprende ventajosamente del 0,001 al 30% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, con respecto al peso total de dicha composición, aún más ventajosamente del 0,01% al 10% en peso seco de extracto peptídico de aguacate. Según una variante ventajosa de la invención, el extracto peptídico de aguacate se puede obtener según un procedimiento tal como el descrito anteriormente.

Según una variante ventajosa de la invención, la composición comprende además D-manoheptulosa y/o perseitol (efecto de sinergia), ventajosamente en una cantidad del 0,001 al 30% en peso seco, aún más ventajosamente del 0,01 al 5% en peso seco con respecto al peso total de la composición. La fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es ventajosamente un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate, cuyo contenido en azúcares de C7, es decir en D-manoheptulosa y en perseitol, en la materia seca está ventajosamente comprendido entre el 65 y el 90% en peso, con respecto al peso total de la materia seca. Estos azúcares de tipo heptitol también pueden ser obtenidos a partir de otra fuente vegetal o por síntesis.

Según una variante ventajosa de la invención, la composición comprende además un extracto peptídico de altramuz (efecto de sinergia), ventajosamente en una cantidad del 0,001 al 30% en peso seco, con respecto al peso total de la composición. El extracto peptídico de altramuz, añadido a la composición según la invención, comprende por lo menos el 70%, ventajosamente por lo menos el 80%, en peso de péptidos, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico. Se puede obtener según un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

La composición puede comprender además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los agentes que reestructuran la barrera cutánea y los compuestos que contienen insaponificables de aceites vegetales, tales como los definidos anteriormente. En particular, la composición cosmética puede comprender un activo seleccionado de entre el grupo constituido por Soline®, Avocadofurane® y Piasclédine®, comercializados por los Laboratoires Expanscience.

La composición cosmética según la invención comprende ventajosamente del 0,001 al 30% en peso con respecto al peso total de la composición de por lo menos un agente reestructurante de la barrera cutánea.

La composición cosmética según la invención se puede formular en forma de diferentes preparaciones adecuadas para una administración tópica, para una administración oral, rectal o vaginal, para una administración parenteral. Preferentemente, las diferentes preparaciones son adecuadas para la administración tópica e incluyen las cremas, las pomadas, las lociones, los aceites, los parches, los aerosoles o cualquier otro producto para aplicación externa. En función del tipo de administración deseada, la composición y/o los compuestos activos según la invención pueden comprender además por lo menos un excipiente cosméticamente aceptable. La composición cosmética según la presente invención puede comprender además por lo menos un adyuvante cosméticamente conocido por el experto en la materia, seleccionado de entre los espesantes, los conservantes, los perfumes, los colorantes, los filtros químicos o minerales, los agentes hidratantes, las aguas termales, etc.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento cosmético de las pieles y/o de las mucosas sensibles, irritadas, intolerantes, que presentan un trastorno de la barrera cutánea, que presentan unos enrojecimientos cutáneos o que presentan un desequilibrio inmunológico no patológico, caracterizado por que consiste en aplicar sobre la piel y/o las mucosas una composición cosmética según la invención.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento cosmético de las pieles tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere finalmente a una composición nutracéutica que comprende un extracto peptídico de aguacate y, llegado el caso, un excipiente apropiado aceptable. El extracto peptídico de aguacate comprende ventajosamente del 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico.

La composición nutracéutica según la invención comprende ventajosamente del 0,001 al 30% en peso de extracto peptídico de aguacate, con respecto al peso total de dicha composición, aún más ventajosamente del 0,01 al 10% en peso de extracto peptídico de aguacate. Según una variante ventajosa de la invención, el extracto peptídico de aguacate se puede obtener según un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

Según una variante ventajosa de la invención, la composición nutracéutica comprende además D-manoheptulosa y/o perseitol (efecto de sinergia), ventajosamente en una cantidad del 0,001 al 30% en peso seco, con respecto al peso total de la composición. La fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es ventajosamente un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate, cuyo contenido en azúcares de C7, es decir en D-manoheptulosa y en perseitol, en la materia seca está ventajosamente comprendido entre el 65 y el 90% en peso, con respecto al peso total de la materia seca.

Según una variante ventajosa de la invención, la composición nutracéutica comprende además un extracto peptídico de altramuza (efecto de sinergia) ventajosamente en una cantidad del 0,001 al 30% en peso seco, con respecto al peso total de la composición. El extracto peptídico de altramuza, añadido en la composición según la invención comprende por lo menos el 70%, ventajosamente por lo menos el 80%, en peso de péptidos, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico. Se puede obtener según un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

Los ejemplos siguientes permiten ilustrar la invención, no son limitativos.

Ejemplo 1: Preparación de un extracto peptídico de aguacate

Se cortan 50 kg de aguacates frescos, de la variedad Hass, en finas láminas de 2 a 5 mm de grosor, hueso incluido, con la ayuda de un loncheador de disco. La herramienta de secado es una estufa termostregulada de corriente de aire caliente. Los aguacates loncheados son distribuidos en un grosor de 4 a 5 cm sobre unas bandejas escalonadas. La temperatura de secado se fija a 80°C, su duración es de 48 horas. Una vez secados, los frutos se someten a una presión en frío. Esta operación se realiza en una pequeña prensa Komet® de laboratorio.

Los 4 kg de frutos deslipidados (pasta) son entonces triturados en frío y después extraídos a reflujo, en presencia de 25 litros de etanol. El polvo agotado de lípidos se recupera entonces por filtración sobre Büchner y se seca en estufa a 50°C, durante 5 horas.

La pasta se lava entonces con agua desmineralizada (10 litros), y después se separa por centrifugación. La fracción sólida se recoge en una solución acuosa, acidificada por HCl (pH fijado a 5), y después puesta en contacto con el 2% de celulosa con respecto a la materia seca. La duración de hidrólisis se fija a 6 horas.

La mezcla se centrifuga después a 2000 g en presencia de adyuvante (2,5% p/v). El residuo recuperado sufre entonces una segunda hidrólisis a pH 8,0, en presencia del 0,5% de proteasa, a una temperatura de 55°C, durante 2 horas. La hidrólisis se regula a pH constante por adición continua de sosa 2M. La proteasa se desnatura

finalmente por calentamiento durante 10 minutos a 85°C.

La mezcla obtenida se centrifuga y el sobrenadante se filtra por paso a través de una membrana de 7,5 µm. Después, se ultrafiltra sobre unas membranas que presentan un umbral de corte de 10 kD.

El extracto peptídico bruto obtenido con el 20% de materia seca se decolora en presencia del 1% de carbón activo, después se filtra de nuevo a través de una membrana de 7,5 µm. El extracto decolorado se microfiltra entonces (0,2 µm), su valoración de altura se ajusta al 5% de materia seca, y después se complementa con conservante y finalmente se acondiciona tras una filtración esterilizante (0,2 µm).

Las características del extracto peptídico de aguacate hidrosoluble al 5% de materia seca, obtenido por este procedimiento se proporcionan en la tabla 5 siguiente:

Aspecto	Solución ligeramente anaranjada
Criterios analíticos	
Materia seca	5%
pH (dilución 1/4)	4,5
Absorbancia a 420 nm (dilución 1/4)	0,152
Absorbancia a 550 nm (dilución 1/4)	0,035
Composición de la materia seca	
Nitrógeno alfa-aminado	6,7%
Proteínas	No detectadas
Conservante	0,4%

En la tabla 6 siguiente, se da la distribución de las masas moleculares en el extracto peptídico de aguacate obtenido por este procedimiento:

Pico de HPLC	Masa molar (g/mol)	Número promedio de aminoácidos	% Relativo
1	> 3480 (1)	< 29	1%
2	3480 a 1180	29 a 9	26%
3	1180 a 310	9 a 2	45%
4	310 a 130	2 a 1	15%
5	< 130	1	13%

(1) masas < 10000 g/mol

Se constata que el 27% por lo menos de los péptidos del extracto están constituidos por lo menos por 9 unidades de aminoácidos. En consecuencia, el tamaño de los péptidos del extracto es, por lo tanto, extremadamente pequeño en comparación con el de las proteínas nativas del aguacate. Estos péptidos presentan por lo tanto, a este respecto, una biodisponibilidad mucho mayor, en particular cutánea.

Ejemplo 2: Preparación de un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate

Se cortan 50 kg de aguacates frescos, de la variedad Hass, en finas láminas de 2 a 5 mm de grosor, hueso incluido, con la ayuda de un loncheador de disco. La herramienta de secado es una estufa termostregulada de corriente de aire caliente. Los aguacates loncheados son distribuidos sobre un grosor de 4 a 5 cm sobre unas bandejas escalonadas. La temperatura de secado se fija a 80°C, su duración es de 48 horas. Una vez secados, los frutos se someten a una presión en frío. Esta operación se realiza en una pequeña prensa Komet® de laboratorio.

Los 4 kg de frutos deslipidados (pasta) son entonces triturados en frío y después extraídos a reflujo, en presencia de 25 litros de etanol. El polvo agotado de lípidos se recupera entonces por filtración sobre Büchner y se seca en estufa a 50°C, durante 5 horas.

La pasta se lava entonces con agua desmineralizada (10 litros) y después se separa por centrifugación. La fracción soluble (líquida) se recoge para ser purificada y concentrada según el modo de realización siguiente:

- desmineralización con la ayuda de resinas intercambiadoras de iones: desmineralización de las heptulosas por paso sobre resinas OH⁻, y después sobre resina H⁺.
- Ultrafiltración sobre 10000 Da: la ultrafiltración se realiza con un sistema equipado con 4 membranas de umbral de corte de 10 kDa.
- Concentración al vacío: la concentración del extracto purificado se realiza con la ayuda de un evaporador al vacío hasta la obtención de una materia seca de cerca del 4%.

- Acondicionamiento: la concentración de extracto se ajusta al 5% de materia seca y se añade conservante, después se filtra estérilmente con una membrana de 0,2 µm de umbral de corte y se acondiciona.

La tabla 7 siguiente proporciona la composición del extracto de azúcares de aguacate en C7, al 5% de materia seca, preparado según el procedimiento descrito anteriormente:

Tabla 7

Apariencia	Solución de color amarillo pálido
Criterios analíticos	
Materia seca	5%
Valor de pH (1/4 de dilución)	7,0
Absorbancia a 420 nm (1/4 de dilución)	0,013
Absorbancia a 550 nm (1/4 de dilución)	0,003
Composición (% de materia seca)	
Sacarosa	3,0
Glucosa	7,5
D-manoheptulosa	40,0
Fructosa	10,6
Perseitol	28,8

Ejemplo 3: Inducción de la beta defensina-2 por el extracto peptídico de aguacate

I. Inoculación de las células (D0):

Se inoculan unos queratinocitos humanos normales en placa de 96 pocillos (aproximadamente 20000 células/pocillo), en presencia de un medio específico enriquecido de calcio (concentración final 1,3 mM), tal como se ha descrito anteriormente en la publicación "Human β -Defensin-2- production in Keratinocytes is regulated by Interleukin-1, Bacteria, and the State of Differentiation', Alice Y. Liu *et al.*, The Society for investigative Dermatology, vol. 118, N° 2, Feb. 2002, páginas 275 a 281"

II. Tratamiento de las células (D1):

Después de una incubación de 24h a 37°C, al 5% de CO₂:

- 2 aclarados con 200 µl/pocillo de PBS (tampón fosfato en solución salina)
- estimulación de las células por 200 µl/pocillo (en medio suplementado en Ca⁺⁺)
 - por el extracto peptídico de aguacate a concentraciones del 3, 1 y 0,3%, es decir respectivamente 0,15, 0,05 y 0,015% de materia seca
 - por IL-1 β a una concentración 100 ng/ml (control positivo de inducción de hBD-2)

III. final del tratamiento (D2): ELISA

Después de 24h de incubación, se evalúa la inducción de hBD-2 mediante una técnica ELISA con un anticuerpo específico (*goat polyclonal to human BD2; Abcam; ab9871*).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8 siguiente:

Tabla 8

	Células de control	Control Positivo (IL-1 β)	Extracto peptídico de aguacate (0,3%)	Extracto peptídico de aguacate (1%)	Extracto peptídico de aguacate (3%)
hBD-2 (OD)	0,03	0,103	0,057	0,047	0,05
hBD-2 (OD)	0,036	0,11	0,056	0,056	0,063
hBD-2 (OD)	0,036	0,105	0,062	0,054	0,072
Promedio	0,034	0,106	0,058	0,052	0,062

Se observa que, de manera bastante inesperada, el extracto peptídico de aguacate según la invención permite aumentar la cantidad de hB-2 producida.

Ejemplo 4: Inducción de los ARNm que codifican para hBD-2 y para los péptidos antimicrobianos like (inhibidor específico de elastasa)

Se ha utilizado el método de los "micro array de ADNc" para estudiar los efectos del extracto peptídico de aguacate sobre la expresión de los genes que codifican para unas proteínas estructurales y reguladoras de interés potencial en la fisiología cutánea. Dicho enfoque permite cribar en una sola etapa los efectos de un producto o de un tratamiento sobre la expresión de los genes en un sistema biológico dado y obtener una firma de los efectos de este tratamiento.

Condiciones de cultivo y productos en el ensayo

Los extractos peptídicos de aguacate, a concentraciones del 3, 1 y 0,3%, es decir respectivamente el 0,15, el 0,05 y el 0,015% de materia seca, obtenidos mediante el procedimiento según la invención, se han incubado directamente en el medio de cultivo de epidermis reconstruidas Skinethic®, durante 24h.

Análisis de la expresión diferencial de los genes

La metodología utilizada, recomendada por Clontech (Palo Alto, USA) comprende:

- una etapa de extracción y de purificación de los ARN totales
- una etapa de purificación de los ARN mensajeros según el protocolo AltasPure (Clontech)
- el marcado de las sondas ADN con P³² por transcripción inversa
- la purificación de las sondas marcadas por cromatografía sobre columna de exclusión y verificación de la calidad y de la equivalencia por recuento en centelleo líquido.
- hibridación de las membranas (Custom ATLAS BIOAlternative) con las sondas radiomarcadas (68°C, una noche).

Resultados

Los efectos sobre la síntesis de los ARNm que codifican para los péptidos antimicrobianos (hBD-2) y péptidos antimicrobianos like (inhibidor específico de elastasa/SKALP/elafina) se proporcionan en la tabla 9 siguiente:

Tabla 9

GENES	Extracto peptídico de aguacate, puro activo (0,015%)	Extracto peptídico de aguacate, puro activo (0,05%)	Extracto peptídico de aguacate, puro activo (0,15%)
Beta defensina 2	16,1	69,7	103,9
Inhibidor de Elastasa Especifico	5,5	14,7	13,5

Ejemplo 5: Formulaciones cosméticas a base de extracto peptídico de aguacate

Crema anti-acné nº 1

Agua	CSP 100%
Isononanoato de Isononilo	7,000
Malato di-alquilo de C ₁₂₋₁₃	7,000
Estearato de isocetilo	5,000
Butilenglicol	3,000
Oryza sativa	2,500
Extracto peptídico de aguacate	2,000
Éter de dicaprililo	2,000
Salicilato de silanodiol	2,000
Alcohol araquídico	1,650
Trometamina	1,180
Alcohol cetílico	1,000
Ácido salicílico	1,000
Ascorbil glucósido	1,000
Glicina	1,000
Acetato de tocoferilo	1,000
Alcohol behenílico	0,900
Escualeno	0,790

Citrato de sodio	0,660
Copolímero PPG-12/SMDI	0,500
Araquidil glucósido	0,450
Perfume	0,400
Goma de esclerotio	0,160
Alcohol cetearílico	0,130
Ácido cítrico	0,110
Sepigel 305*	0,100
Sistema conservante	CS

* producto comercializado por la compañía Seppic

Crema anti-acné nº 2

5

Agua	CSP 100%
Isononanoato de Isononilo	7,000
Malato de Di-alquilo de C ₁₂₋₁₃	7,000
Estearato de isocetilo	5,000
Butilenglicol	3,000
Oryza sativa	2,500
Extracto peptídico de aguacate	2,000
Azúcares C7 (heptitol)	1,000
Éter de dicaprililo	2,000
Salicilato de silanodiol	2,000
Alcohol araquídico	1,650
Trometamina	1,180
Alcohol cetílico	1,000
Ácido salicílico	1,000
Ascorbil glucósido	1,000
Glicina	1,000
Acetato de tocoferilo	1,000
Alcohol behenílico	0,900
Escualeno	0,790
Citrato de sodio	0,660
Copolímero PPG-12/SMDI	0,500
Araquidil glucósido	0,450
Perfume	0,400
Goma de esclerotio	0,160
Alcohol cetearílico	0,130
Ácido cítrico	0,110
Sepigel 305*	0,100
Sistema conservante	CS

* producto comercializado por la compañía Seppic

Emulsión espumante para limpiar pieles atópicas

10

Agua	CSP 100
Arlatone dúo*	20,00000
Coco glucósido	12,00000
Hidroxipropil guar	2,00000
Extracto peptídico de aguacate	2,000
Palmato de Glicerilo PEG-200 Hidrogenado	1,10000
Cocoato de Glicerilo PEG-7	1,10000
Salicilato de silanodiol	1,00000
Cocamida DEA	1,00000
Caprilol Glicina	0,50000
Sorbato de potasio	0,50000
Policuaternio 10	0,40000
Perfume	0,40000
Ácido cítrico	0,30000
Zinc PCA	0,20000

* producto comercializado por la compañía Quimasso

Emulsión espumante de limpieza para higiene personal

ES 2 600 742 T3

Agua	CSP 100
Arlatone dúo*	20,00000
Coco glucósido	12,00000
Hidroxipropil guar	2,00000
Extracto peptídico de aguacate	3,00000
Azúcares de aguacate	1,00
Péptidos de altramuz	2,00
Palmato de Glicerilo PEG-200 Hidrogenado	1,10000
Cocoato de Glicerilo PEG-7	1,10000
Salicilato de silanodiol	1,00000
Cocamida DEA	1,00000
Caprilol Glicina	0,50000
Sorbato de potasio	0,50000
Policuaternio 10	0,40000
Perfume	0,40000
Ácido cítrico	0,30000
Zinc PCA	0,20000

* producto comercializado por la compañía Quimasso

REIVINDICACIONES

1. Medicamento que comprende un extracto peptídico de aguacate, que comprende del 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico, y un excipiente apropiado.

2. Medicamento según la reivindicación 1, caracterizado por que el extracto peptídico de aguacate es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- obtención de una pasta de aguacate, ventajosamente del fruto del aguacate, por secado y después extracción del aceite; y a continuación
- criotrituración y deslipidación completa de dicha pasta y después decantación, centrifugación y recuperación de la pasta; y después
- primera hidrólisis en presencia de glucanasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación de la fracción soluble;
- segunda hidrólisis en presencia de una o varias proteasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación del residuo, y a continuación
- concentración de la fase peptídica por nanofiltración y, llegado el caso, decoloración en presencia de carbón activo, seguida
- de una filtración simple (10 μ m) y después, de una ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD); y por último
- llegado el caso, adición de conservante, microfiltración esterilizante final (0,2 μ m), y acondicionamiento.

3. Medicamento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el extracto peptídico de aguacate presenta la composición siguiente en aminoácidos, en porcentaje en peso con respecto al peso total de aminoácidos:

Alanina	6,4 - 7,8
Arginina	4,7 - 5,7
Ácido aspártico	10,3 - 12,7
Cistina-Cisteina	2,9 - 3,5
Ácido glutámico	13,0 - 15,8
Glicina	5,3 - 6,5
Histidina	2,2 - 2,6
Isoleucina	4,8 - 5,8
Leucina	7,6 - 9,4
Lisina	3,0 - 3,8
Metionina	1,2 - 1,6
Fenilalanina	4,7 - 5,7
Prolina	4,1 - 5,2
Serina	5,5 - 6,7
Treonina	4,6 - 5,6
Tirosina	3,6 - 4,4
Valina	5,8 - 7,2

4. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el 50% de los péptidos del extracto están constituidos por 10 a 30 aminoácidos.

5. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades relacionadas con una modificación de la inmunidad innata, por aumento de la producción de péptidos antimicrobianos, de la familia de las catelicidinas y/o de las beta-defensina, ventajosamente de la hBD-2.

6. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades relacionadas con una modificación de la inmunidad innata por estimulación de los péptidos antimicrobianos like, tales como un inhibidor específico de la elastasa, particularmente la elafina (SKALP).

7. Medicamento para una utilización según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que dichas enfermedades están relacionadas con la presencia de microorganismos tales como las bacterias Gram+ y/o Gram-, los hongos o los virus.

8. Medicamento para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que dichas enfermedades se seleccionan de entre el grupo constituido por:

- unas infecciones de la piel y de los faneros, seleccionadas en particular de entre el grupo constituido por la foliculitis, el forúnculo, el absceso, el impétigo o el panadizo;
- 5 - unas dermatosis inflamatorias, tales como la dermatitis atópica, el eczema de contacto y/o atópico, la psoriasis, el acné, las dermatitis irritativas;
- unas alergias de las pieles y/o de las mucosas; o
- 10 - las quemaduras.
9. Medicamento para una utilización según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que dichas enfermedades son unas patologías relacionadas con una deficiencia de la barrera cutánea, tales como las pieles hiperreactivas, atópicas, o unas patologías relacionadas con las pieles debilitadas por una agresión del medio ambiente.
- 15 10. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización en la protección de las pieles:
- patológicas inmaduras de los recién nacidos o de los niños; o
- 20 - patológicas de los individuos adultos o mayores.
11. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización para favorecer la cicatrización, en los procesos de cicatrización normales o patológicos, tales como las úlceras y las escaras.
- 25 12. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades periodontales.
- 30 13. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las patologías articulares inflamatorias tal como la artrosis.
14. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las infecciones de las mucosas, en particular de las mucosas vaginal, intestinal, respiratoria, nasal o auricular.
- 35 15. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las infecciones del sistema ocular.
- 40 16. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o para una utilización según la reivindicación 5 o 6, que comprende además D-manoheptulosa y/o perseitol, ventajosamente la fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate.
- 45 17. Composición cosmética o nutracéutica que comprende un extracto peptídico de aguacate, que comprende ventajosamente del 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado, con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico, y un excipiente apropiado recíprocamente cosméticamente aceptable o alimenticio.
- 50 18. Composición cosmética o nutracéutica según la reivindicación 17, caracterizada por que comprende además D-manoheptulosa y/o perseitol, ventajosamente la fuente de D-manoheptulosa y/o de perseitol es un extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate.
- 55 19. Método de tratamiento cosmético de las pieles y/o de las mucosas sensibles, irritadas, secas, mayores, intolerantes, que presentan un trastorno de la barrera cutánea, debilitadas por una agresión medioambiental que presentan unos enrojecimientos cutáneos o que presentan un desequilibrio inmunológico no patológico, caracterizado por que consiste en aplicar sobre la piel y/o las mucosas una composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18.
20. Método de tratamiento cosmético de las pieles sanas inmaduras de los recién nacidos o de los niños o de las pieles sanas de los individuos adultos o mayores, caracterizado por que consiste en aplicar sobre la piel una composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18.