

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 639**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/107</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/198</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/54</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2009 PCT/EP2009/064785**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10052312**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09744707 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2364135**

54 Título: **Medicamento o composición dermatológica que contiene un extracto peptídico de aguacate destinado al tratamiento y a la prevención del prurito interno**

30 Prioridad:

**07.11.2008 FR 0857583**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MSIKA, PHILIPPE;  
BAUDOIN, CAROLINE y  
BREDIF, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 626 639 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 o composición dermatológica que contiene un extracto peptídico de aguacate destinado al tratamiento y a la prevención del prurito interno.

La presente invención se refiere a un medicamento o composición dermatológica que contiene un extracto peptídico de aguacate destinado al tratamiento o a la prevención del prurito interno.

El uso de extractos peptídicos de aguacate en el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con una deficiencia del sistema inmunitario ya se ha descrito en la solicitud de patente WO 2005/105123. En efecto, se ha demostrado que los extractos peptídicos de aguacate son capaces de aumentar la producción de péptidos antimicrobianos, en particular la  $\beta$ -defensina-2 humana (hBD-2). Por lo tanto, dichos extractos son particularmente adecuados para el tratamiento o la prevención de las pieles inflamadas, inmaduras o de las pieles de las personas inmunodeprimidas. También se ha demostrado que dichos extractos peptídicos de aguacate no inducen reacciones inflamatorias, irritaciones o intolerancias.

Además de esta acción sobre las pieles inflamadas, inmaduras o las pieles de las personas inmunodeprimidas, los inventores han descubierto ahora, de manera sorprendente, que una composición que comprende un extracto peptídico de aguacate permite tratar o prevenir el prurito interno.

El prurito es un signo funcional y se define como "una sensación que provoca la necesidad de rascarse". Puede ser localizado, difuso o generalizado. Es particular de la piel y de las semi-mucosas. El rascado hace desaparecer el prurito por completo, pero temporalmente. El rascado repetitivo, intenso, puede dar lugar a unas lesiones cutáneas. En el sentido de la presente invención, se designa por el término "prurito" el prurito patológico que es molesto para el paciente, incluso a veces incapacitante. Puede ser lo suficientemente desagradable para que el paciente prefiera el dolor a la comezón: esto puede explicar las lesiones inducidas por el rascado.

La sensación cutánea comúnmente designada como comezón se puede considerar como una respuesta uniforme a una amplia variedad de estímulos físicos y químicos que pueden ser de naturaleza endógena o exógena. Estos estímulos actúan sobre los receptores de las terminaciones nerviosas libres situadas en la unión dermis-epidermis y alrededor de los folículos del pelo. El principal agente responsable de la comezón es la histamina, molécula química liberada en particular por los mastocitos. La histamina, cuando es liberada, se une a los receptores nerviosos de la piel y provoca el prurito. La sensación es transmitida por las mismas fibras nerviosas que las que transmiten las sensaciones de dolor al cerebro.

Al igual que la histamina, la triptasa, proteasa también liberada por el mastocito, también está muy involucrada en la fisiopatología del prurito: la triptasa induce la señal de prurito fijándose al receptor de las proteasas (PAR-2 o Proteinase-Activated Receptor 2; receptor 2 activado por al proteinasa) a nivel de las fibras nerviosas.

El dolor, la temperatura y el tacto son todas unas sensaciones transmitidas por las mismas vías de las fibras nerviosas libres no mielinizadas libres que enervan la piel humana. Una simulación de baja intensidad de estas fibras causará prurito, mientras que una estimulación más intensa dará lugar a una sensación real de dolor. A pesar de que se transmite a través de las mismas fibras sensoriales, los impulsos neurales de comezón tienen una frecuencia muy inferior a los impulsos de dolor; sin embargo, si se produce un rascado como respuesta al estímulo de comezón, la frecuencia de los impulsos neuronales aumenta con la intensidad de rascado y la sensación correspondiente cambia de comezón a dolor.

La comezón puede ser inducida por una amplia variedad de circunstancias, a la vez fisiológicas y patológicas. En particular, cuando está generalizada y asociada a lesiones cutáneas, como ampollas y pápulas, la comezón es a menudo el efecto de una enfermedad dermatológica primaria y, en muchos casos, representa el síntoma fundamental para el diagnóstico. Por otro lado, en ausencia de lesiones cutáneas (en piel sana), la comezón puede proceder en muchos casos de trastornos sistémicos como, por ejemplo, enfermedades neoplásicas, trastornos metabólicos o también de reacciones alérgicas o de una hipersensibilidad a ciertos medicamentos o de un estado de embarazo. Por último, en otros casos, la comezón parece ser el único síntoma crónico dominante, sin posibilidad de ninguna aclaración sobre la etiopatogénesis de esta afección. En estos casos, la comezón normalmente se designa por prurito *sine materia*, es decir, que representa un síntoma de origen desconocido, que no es clasificable en ausencia de alteraciones extracutáneas o cutáneas identificables. Los únicos signos objetivos, aunque secundarios, del trastorno en cuestión se limitan a unas marcas de rascado como excoriaciones lineales y si la situación dura un período de tiempo más largo, de pequeñas pápulas secundarias (es decir unas pápulas debidas al rascado) y unos signos de liquenificación con hiperpigmentación en los casos más crónicos.

La presente invención tiene por objeto 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 caracterizado por que por lo menos el 50% de los péptidos del extracto están constituidos por 10 a 30 aminoácidos, para su utilización en el tratamiento o la prevención del prurito interno en un medicamento o una composición dermatológica que

comprende dicho extracto y un excipiente apropiado.

El término prurito se subdivide en dos tipos de prurito: el prurito localizado (tal como las picaduras de insectos, la dermatitis seborreica, la tiña, las candidiasis) y el prurito difuso.

5

Este prurito difuso se subdivide en dos familias: en presencia de lesiones cutáneas específicas, se habla de dermatosis pruriginosas; en ausencia de lesiones cutáneas específicas (con la excepción de posibles lesiones de rascado), se habla de pruritos internos.

10

La invención se refiere al tratamiento y a la prevención de pruritos internos. Dichos pruritos internos no son el resultado de cualquier dermatosis inflamatoria o de una deficiencia del sistema inmunitario (en particular de la inmunidad innata).

15

Por lo tanto, en el marco de la presente invención, se prevé el tratamiento y la prevención del prurito asociado a diversas formas de comezón cuya etiología no está relacionada con las lesiones dermatológicas, en particular alérgicas (eczema, urticaria, dermatitis atópica, dermatitis irritativa o de contacto, radiodermatitis, toxidermia, reacción alérgica) o infecciosas (parasitosis cutánea, dermatofitosis, ftiriasis del cuerpo y del cuero cabelludo, varicela, VIH, papillonitis). En particular, la expresión "prurito interno" no engloba las dermatitis irritativas.

20

El prurito se selecciona ventajosamente de entre el grupo constituido por el prurito gravídico, el prurito *sine materia*, el prurito neonatal (relacionado con la xerosis) y el prurito de origen medicamentoso. Por lo tanto, la invención tiene por objeto 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, en el que por lo menos el 50% de los péptidos están constituidos por 10 a 30 aminoácidos para su utilización en el tratamiento o la prevención del prurito seleccionado de entre el grupo constituido por el prurito gravídico, el prurito *sine materia*, el prurito neonatal (relacionado con la xerosis) y el prurito de origen medicamentoso.

25

El medicamento o composición dermatológica, que comprende el extracto peptídico de aguacate y por lo menos un excipiente, está destinado al tratamiento y a la prevención de prurito gravídico.

30

De diez a veinte por ciento de los embarazos se complican por prurito gravídico. Este prurito gravídico de la mujer embarazada es un prurito difuso sin lesiones cutáneas específicas de una dermatosis inflamatoria o alérgica.

35

A título de ejemplo de prurito gravídico, se puede citar más particularmente la colestasis gravídica. Esta "colestasis del tercer trimestre" es la principal causa de ictericia durante el embarazo. Los estrógenos y la progesterona parecen jugar un papel esencial en este prurito. La colestasis gravídica se manifiesta por un prurito aislado e intenso que provoca lesiones por rascado e insomnio. También puede estar presente una ictericia.

40

El extracto peptídico de aguacate según la invención también es activo en el tratamiento de prurigo gravídico, que sería secundario a la colestasis gravídica y cuyas manifestaciones son una erupción de las pequeñas pápulas pruriginosas.

45

Según una variante ventajosa de la invención, el extracto peptídico de aguacate está destinado al tratamiento y a la prevención del prurito *sine materia*.

50

El grupo de prurito *sine materia* comprende las manifestaciones de comezón que aparecen sin ninguna relación con lesiones orgánicas o con enfermedades sistémicas o de piel (se le llama entonces prurito psicógeno) en las zonas genitales externas (como el prurito vulvar y escrotal) y en la zona perianal (designado científicamente *pruritus ani*), así como el prurito de piel envejecida (es decir, el prurito senil).

El prurito psicógeno (comezones de origen psicológico) es un prurito relativamente frecuente.

55

Se entiende a título de prurito psicógeno:

- la parasitofobia en la que el paciente, mayor de 40 años, creyendo estar infestado por parásitos, procede a extirpaciones repetidas y mutilantes en la piel;
- la patomimia que representa todas las lesiones causadas o agravadas por las diversas maniobras del paciente cuyas principales son las excoriaciones debidas a las uñas.

60

El prurito senil es una afección generalizada muy extendida entre las personas de 65 años o más. Se le reconoce una componente psicógena. El prurito senil se agrava por una desecación de la piel y una sequedad cutánea. Una piel deshidratada, generalmente combinada con la exposición a las condiciones ambientales de baja humedad y de temperatura, induce un fino agrietamiento y descamación de la piel en las personas de edad avanzada, con comezón persistente y difusa como consecuencia.

65

Según una variante ventajosa de la invención, el extracto peptídico de aguacate está destinado al tratamiento y a la prevención del prurito neonatal, relacionado con la xerosis del recién nacido.

5 La estructura de la piel del recién nacido a término es idéntica a la del lactante. Sin embargo, la piel del recién nacido a término presenta una particularidad que es la descamación denominada fisiológica. Esta afecta al 65% de los recién nacidos a término y representa la más importante de las modificaciones cutáneas neonatales. Traduce la existencia de xerosis cutánea importante. Es más marcada en las manos, los tobillos y los pies, pero puede estar más extendida. Esta descamación desaparece espontáneamente durante las dos primeras semanas de vida.

10 Los inventores han constatado con interés que el extracto peptídico de aguacate según la invención permite prevenir o tratar esta xerosis del recién nacido a término, en particular luchar rápidamente (antes de la desaparición natural de esta descamación) contra la descamación observada. El extracto peptídico de aguacate según la invención también permite una hidratación y/o una relipidación de la piel de los recién nacidos y por lo tanto permite acelerar la desaparición de la descamación observada.

15 Según una variante ventajosa de la invención, el extracto peptídico de aguacate está destinado al tratamiento y a la prevención del prurito de origen medicamentoso.

20 El prurito medicamentoso se debe a la ingesta continua o intermitente de ciertos medicamentos (barbitúricos, antibióticos, aspirina, sulfamida, etc.).

25 Entre las moléculas que susceptibles de provocar la aparición de prurito, se citará el ácido acetilsalicílico, los animalarios (cloroquina), los antirretrovirales (anti-proteasas), los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, el interferón, los opiáceos (heroína), las fenotiazinas, los retinoides, la tolbutamida y finalmente las vitaminas del grupo B. La aplicación en la piel de sustancias irritantes de uso cosmético (por ejemplo, exfoliantes) o profesional (por ejemplo, lana de vidrio) también puede causar prurito, ya se asocie dicho prurito o no a unas lesiones cutáneas.

30 Durante los pruritos intensos y crónicos puede aparecer asimismo una liquenificación de la piel que corresponde a una forma particular de engrosamiento cutáneo. Cuando las lesiones de liquenificación adquieren un aspecto nodular, se habla de prurigo. Además, estas lesiones de liquenificación son a su vez pruriginosas y contribuyen por ello al mantenimiento del prurito. El extracto peptídico de aguacate según la invención también es adecuado para prevenir o tratar dicha liquenificación.

35 De una manera completamente interesante, los inventores han constatado que, además de su efecto en la prevención o el tratamiento del prurito, el extracto peptídico de aguacate también tiene una actividad relipidante o hidratante, que reforzará su acción sobre el prurito, en particular el prurito senil o el prurito del recién nacido.

40 El medicamento o la composición dermatológica que comprenden el extracto peptídico según la invención es especialmente adecuado para el tratamiento de los pruritos internos, que pueden estar asociados a una sequedad cutánea o a una descamación, en la mujer embarazada, en el recién nacido a término y en los ancianos. Ventajosamente, el medicamento o la composición dermatológica está indicado para la mujer embarazada o para el recién nacido a término.

45 En el marco de la presente invención, se entiende por 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.

50 El extracto peptídico de aguacate se puede obtener directamente a partir de cualquier parte del aguacate o del aguacatero, tal como el fruto, la piel, el hueso, la hoja o las raíces del aguacatero. También es posible obtener un extracto peptídico de aguacate a partir de los subproductos de la industria de transformación del aguacate, entre los cuales se pueden citar de manera no exhaustiva: la pulpa fresca de aguacate, la pulpa congelada, deshidratada, las tortas de aguacate procedentes de los procesos de extracción de aceite (extracción mecánica y/o por solventes 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 en bruto (guacamole), los residuos sólidos procedentes de las unidades de producción de estos purés. El extracto se obtiene de manera ventajosa a partir del fruto fresco del aguacatero. Los frutos se podrán seleccionar 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*, de manera más ventajosa de entre las variedades *Hass*, *Fuerte* y *Reed*. Preferentemente, se considerarán las variedades *Hass*, *Fuerte*, *Ettinger* y *Bacon*, y más ventajosamente las variedades *Hass* y *Fuerte*.

El fruto del aguacatero está constituido principalmente por agua, por pulpa, por aceite y por hueso. Las proporciones de estos constituyentes son, al igual que cualquier materia natural y vegetal, muy variables. Sin embargo, se admiten generalmente los datos de composición media siguientes, expresados en porcentajes de fruto fresco, presentados en la tabla 1 siguiente:

5

Tabla 1

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

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

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

15

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

20 En 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 riqueza relativa del fruto en fibras, dificulta la accesibilidad a estas proteínas a través de las vías clásicas, química o bioquímica. Además, el carácter tan poco hidrosoluble de estas macromoléculas naturales invita a preparar unas fracciones hidrolizadas de estas proteínas (péptidos), que presentan una gran solubilidad en agua y una mejor biodisponibilidad. De esta forma, su potencial alergizante también se puede eliminar. La invención tendrá asimismo como objeto, la preparación de un extracto peptídico de aguacate, a través de una vía de síntesis controlada y no desnaturizante de las proteínas hidrolizadas

25

El extracto peptídico de aguacate es ventajosamente un extracto acuoso deslipidado. Dicho extracto acuoso deslipidado sufre ventajosamente una hidrólisis enzimática. Las proteínas de aguacate han sido hidrolizadas ventajosamente por unas proteasas. Según una variante ventajosa de la invención, los azúcares presentes en el extracto acuoso desliipidado también están hidrolizados (en presencia de glucanasas por ejemplo).

30

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

35

- obtener una torta de aguacate, de forma ventajosa del fruto del aguacate, mediante secado y después extracción del aceite (lípidos); y a continuación

40

- criotrituración y deslipidación completa de dicha torta y después decantación, centrifugación y recuperación de la torta; y después

40

- 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;
- decoloración, en presencia de carbón activado por ejemplo, seguida por una filtración simple (10 µm), y después por una ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD) y; finalmente,
- llegado el caso, microfiltración esterilizante final (0,2 µm), 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. De esta manera, tras el corte del fruto en finas láminas, se puede realizar su secado 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. En general, la temperatura en esta etapa de secado se mantendrá de manera ventajosa, independientemente de la técnica utilizada, inferior o igual a 80°C. En el marco del presente procedimiento, por razones de facilidad de realización y por razones de costes, se prefiere el secado en secaderos ventilados, en capa fina y bajo corriente de aire caliente, a una temperatura comprendida entre 70°C y 75°C. La duración de la operación puede variar de 5 a 72 horas.

Los lípidos del fruto secado se extraen a continuación ya sea por vía mecánica en una prensa de tornillo continuo, o también por vía química, con la ayuda de un solvente 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 CO<sub>2</sub> supercrítico. Entre los intereses principales del procedimiento, el aceite coproducido constituye evidentemente directamente valorizable. Por esta razón, se prefiere la extracción de los lípidos por vía mecánica.

El fruto seco y desaceitado, o también denominado torta, puede sufrir entonces las etapas siguientes:

- criotrituración,
- deslipidación completa, en particular mediante un solvente alimentario no tóxico tal como el etanol y/o la acetona,
- decantación, y después lavado de la torta con agua,
- centrifugación y recuperación de la torta,
- 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 del residuo,
- concentración por nanofiltración,
- decoloración en presencia de carbón activado,
- filtración simple (10 µm) y después ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD),
- adición de conservante, microfiltración esterilizante final (0,2 µm) y acondicionamiento.

El extracto acuoso final puede contener 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 en peso de 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 comprendido generalmente 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 presentan en la tabla 3 siguiente:

Tabla 3

Nitrógeno α-aminado (procedimiento denominado "o-ftalaldehído" o "ninhidrina") (en porcentaje en peso de materia seca)	4-10
Proteínas (en porcentaje en peso de materia seca) (Nx6,25) <sup>1</sup>	10-30
pH (dilución 1/4)	4,5-7,0

Absorbancia (dilución 1/4)	420 nm	0,1-0,6
	550 nm	0,02-0,1

<sup>1</sup> N 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 con precisión el coeficiente de las proteínas dosificadas, se utiliza por convención un coeficiente de 6,25.

La siguiente tabla 4 presenta la composición media de aminoácidos del extracto peptídico obtenido mediante el procedimiento según la invención, en el que los valores están expresados en porcentaje en peso con respecto al peso total de los aminoácidos dosificados. Los valores para el ácido aspártico y el ácido glutámico también incluyen los contenidos de asparagina y de 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
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 ser eventualmente liofilizado con el fin de obtener un polvo sólido (extracto seco), pero totalmente hidrosoluble con respecto a las proteínas originales del aguacate.

El 50% por lo menos de los péptidos del extracto están constituidos por 10 a 30 motivos de aminoácidos. El tamaño de estos péptidos es por lo tanto mucho más pequeño en comparación con las proteínas nativas del aguacate. Estos péptidos tienen por lo tanto a este respecto una biodisponibilidad mucho mejor, en particular cutánea.

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

El medicamento o composición dermatológica según la invención puede comprender además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los agentes anti-irritantes y/o calmantes y/o cicatrizantes y/o anti-envejecimiento y/o hidratantes.

Los agentes anti-irritantes y/o calmantes y/o cicatrizantes y/o anti-envejecimiento y/o hidratantes que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente la glicina, los azúcares y/o péptidos vegetales incluyendo el lupino, el lupeol (FR 2 822 821, FR 2 857 596), las oxazolininas (WO 03/055463), las oxazolidinonas (WO 2004/050052), el ácido lipoico, el alfa bisabolol, los derivados de regaliz, la enoxolona, la ectoína, furanos del aguacate (en particular, el Avocadofurane®: furanos de aguacate, que se pueden obtener mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 01/21605), los extractos de *Centella asiatica*, en particular el ácido madecásico o el ácido asiático, la cafeína, el retinol, el retinal, el ácido retinoico, el óxido de zinc, el magnesio, el silicio, el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio, el ácido hialurónico, el ácido azelaico y sus sales o ésteres, el ácido salicílico y sus derivados, el alfa-hidroxiácido (AHA), los ésteres de AHA, el ácido pirrolidona carboxílico y derivados, las ceramidas, el colesterol, el escualano, los fosfolípidos, el beta caroteno, la vitamina A, la vitamina E, la vitamina

5 C, la vitamina B3 (niacinamida, nicotinamida), la vitamina B5 (pantenol), la vitamina B6, el peróxido de benzoilo, la urea, la coenzima Q10, la glucosamina y sus sales, la N-acetil glucosamina, las aguas termales o de manantial (agua de Avène, agua de Roche Posay, agua de Saint-Gervais, agua de Uriage, agua de Gamarde), los péptidos de soja y el arabinogalactano (en particular el arabinogalactano puede estar asociado al lupeol o a péptidos de soja).

10 Las oxazolininas que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente oxazolininas seleccionadas de entre el grupo constituido por la 2-undecil-4-hidroxiometil-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-hidroxiometil-4-metil-2-heptadecil-1,3-oxazolina, la (E)-4-hidroxiometil-4-metil-2-heptadec-8-enil-1,3-oxazolina y la 2-undecil-4-etil-4-hidroxiometil-1,3-oxazolina. De manera aún más ventajosa, dicha oxazolina es la 2-undecil-4,4-dimetil-1,3-oxazolina, denominada OX-100 o Cyclocéramide®.

15 Además de estos agentes activos, el extracto peptídico de aguacate según la invención, solo o en asociación con los agentes activos citados anteriormente, se puede utilizar en asociación con los agentes activos protectores solares, tales como unos filtros o pantallas solares UVB y/o UVA; tales como las pantallas o filtros minerales y/u orgánicos conocidos por el experto en la materia, quien adaptarán su elección y sus concentraciones en función del grado de protección buscado.

20 A título de ejemplo de agentes activos protectores solares, se pueden citar en particular el óxido de titanio, el óxido de zinc, el metileno bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (nombre comercial: TINOSORB M) y el bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (nombre comercial: TINOSORB S).

25 Además de estos agentes activos, el extracto peptídico de aguacate según la invención, solo o en asociación con los agentes activos citados anteriormente, se puede utilizar en asociación con los azúcares de aguacate, unos agentes de reestructuración de la barrera cutánea, unos compuestos antifúngicos, unos conservantes antisépticos y unos compuestos que contienen insaponificables de aceites vegetales, los péptidos de lupino, el aceite de aguacate, el butil avocadato, las cicloceramidas, la genisteína, los concentrados de colza, los concentrados de maíz.

30 Los azúcares de aguacate son ventajosamente la D-mannoheptulosa y/o el perseitol. Los azúcares de aguacate corresponden más ventajosamente al extracto hidrosoluble de azúcares de aguacate descrito en la solicitud WO 2005/115421.

35 Los agentes de reestructuración de la barrera cutánea, que permiten estimular la síntesis de los lípidos clave de la epidermis, y que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos concentrados de girasol, incluso más ventajosamente unos concentrados de girasol linoléicos, tales como el agente activo comercializado por 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).

40 Los compuestos antifúngicos que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente el econazol y el ketoconazol.

45 Los conservantes antisépticos que se pueden utilizar 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.

50 Los compuestos que contienen insaponificables de aceites vegetales que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por los lípidos furánicos de aguacate, los insaponificables de aguacate, los insaponificables de soja, los insaponificables de aguacate y de soja, los concentrados de aceite de lupino, los concentrados de aceite de girasol y sus mezclas.

55 Los lípidos furánicos de aguacate que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos 2-alkil furanos naturales, en particular el agente activo Avocadofurane® comercializado por Laboratoires Expanscience, que se pueden obtener mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 01/21605.

60 Los insaponificables de aguacate y de soja que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente una mezcla de insaponificables de aguacate furánica y de insaponificables de soja, en una proporción respectiva de aproximadamente 1/3-2/3. Los insaponificables de aguacate y de soja son incluso más ventajosamente el producto Piasclédine®, comercializado por Laboratoires Expanscience.

65 Los concentrados de aceite de lupino que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación

con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos concentrados obtenidos por destilación molecular de aceite de lupino, ventajosamente de aceite de lupino blanco dulce, tales como los descritos en la Solicitud Internacional WO 98/47479. Contienen ventajosamente aproximadamente 60% en peso de insaponificables.

5 Los concentrados de aceite de girasol que se pueden utilizar en el marco de la presente invención en asociación con el extracto peptídico de aguacate son ventajosamente unos concentrados de girasol linoléicos, tales como el agente activo comercializado por Laboratoires Expanscience, Soline® (véase la solicitud internacional WO 01/21150).

10 El medicamento o composición dermatológica puede ser formulada en forma de diferentes preparaciones adaptadas a una administración tópica. Preferentemente las diferentes preparaciones incluyen las cremas, las leches, las lociones, las aguas, los aceites, los parches, los aerosoles o cualquier otro producto para aplicación externa.

15 Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas óptimas de los compuestos y composiciones se pueden determinar según los criterios generalmente tenidos en cuenta en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico, en particular dermatológico, adaptado a un paciente como por ejemplo la edad o peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados y el tipo de piel. El paciente es ventajosamente una mujer embarazada, un recién nacido a término o una persona de edad avanzada, más ventajosamente una mujer embarazada o un recién nacido a término.

20 Según el tipo de administración deseada, el medicamento y/o los compuestos activos pueden comprender además por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular dermatológicamente aceptable. Preferentemente, se utiliza un excipiente adaptado para una aplicación por vía tópica externa. El medicamento o composición dermatológica puede comprender además por lo menos un adyuvante farmacéutico 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.

25 A la vista de los pacientes previstos, en particular mujer embarazada y recién nacido a término, el medicamento o la composición dermatológica no comprenderá ningún excipiente con efectos notorios, tales como alérgenos, jabones que contienen yodo, alcohol bencílico, vectores de penetración (glicol) y compuestos cancerígenos mutágenos y reprotóxicos de clase 1, 2 o 3. Además, los perfumes contenidos eventualmente en la formulación serán ventajosamente unos perfumes neutros.

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

#### **Ejemplo 1: preparación de un extracto peptídico de aguacate**

35 Se cortan 50 kg de aguacates frescos, de la variedad Hass, en láminas de 2 a 5 mm de espesor, incluyendo el hueso, con la ayuda de una cortadora de disco. La herramienta de secado es un horno termorregulado con corriente de aire caliente. Los aguacates cortados se distribuyen en un espesor de 4 a 5 cm sobre unas rejillas escalonadas. La temperatura de secado se fijó a 80°C, su duración fue de 48 horas. Una vez secados, los frutos se sometieron a presión en frío. Esta operación se llevó a cabo en una prensa pequeña de laboratorio Komet®.

40 Los 4 kg de frutos deslipidados (torta) se trituraron en frío y después se extrajeron a reflujo, en presencia de 25 litros de etanol. El polvo agotado en lípidos se recuperó entonces por filtración sobre Büchner y se secó en el horno a 50°C, durante 5 horas.

45 La torta se lavó entonces con agua desmineralizada (10 litros) y después se separó por centrifugación. La fracción sólida se recogió en una solución acuosa, se acidificó con HCl (pH 5), y luego se puso en presencia de 2% de celulosa con respecto a la materia seca. La duración de la hidrólisis se fijó en 6 horas.

50 La mezcla se centrifugó después a 2000 g en presencia de adyuvante (2,5% p/v). El residuo recuperado se sometió entonces a una segunda hidrólisis a pH 8,0, en presencia de 0,5% de proteasa, a una temperatura de 55°C durante 2 horas. La hidrólisis se reguló a pH constante mediante la adición continua de sosa 2M. La proteasa finalmente se desnaturalizó por calentamiento durante 10 minutos a 85°C.

55 La mezcla obtenida se centrifugó y el sobrenadante se filtró al pasarlo a través de una membrana de 7,5 µm. Luego se ultrafiltró sobre membranas que presentan un límite de corte de 10 kD.

60 El extracto peptídico bruto obtenido al 20% de materia secase decoloró en presencia de 1% de carbón activado, y luego se filtró de nuevo a través de una membrana de 7,5 µm. El extracto decolorado se microfiltró entonces (0,2 µm) ajustado en título a la altura del 5% de materia seca, y después se suplementó con conservante y, finalmente, se acondicionó después de una filtración esterilizante (0,2 µm).

65

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

Tabla 5

5

Aspecto	Solución de color ligeramente anaranjado
<b>Criterios analíticos</b>	
Materia seca	5%
pH (dilución ¼)	4,5
Absorbancia a 420 nm (dilución ¼)	0,152
Absorbancia a 550 nm (dilución ¼)	0,035
<b>Composición de la materia seca</b>	
Nitrógeno alfa-aminado	6,7%
Proteínas	No detectadas
Conservante	0,4%

La siguiente tabla 6 presenta la distribución de las masas moleculares en el extracto peptídico de aguacate obtenido mediante este procedimiento:

10 Tabla 6

Pico HPLC	Masa molar (g/mol)	Número de aminoácidos medio	% 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.

15 Se constata que el 27% por lo menos de los péptidos del extracto están constituidos por lo menos por 9 motivos 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. Por lo tanto, estos péptidos tienen una biodisponibilidad mucho mejor, en particular cutánea.

20 **Ejemplo 2: extracto peptídico de aguacate: actividades sobre el prurito**

El prurito se define como una sensación cutánea desagradable que provoca el deseo de rascarse. El "mensaje" del prurito es transmitido por las terminaciones libres de las fibras C.

25 El mastocito parece desempeñar un papel fundamental en los pruritos de origen cutáneo. En efecto, muchas sustancias pruriginosas causan su desgranulación. Durante su desgranulación, el mastocito excreta diversos productos, entre los cuales:

- 30 - la histamina cuya liberación provoca la activación de los receptores H1 a nivel de las fibras nerviosas y, por tanto la inducción de la señal de prurito,
- las proteasas, en particular la triptasa, que inducen la señal de prurito fijándose al receptor de las proteasas (PAR-2 o Proteinase-Activated Receptor 2; receptor 2 activado por la proteinasa) a nivel de las fibras nerviosas.

35

La liberación de los mediadores pruriginosos por el mastocito que desemboca en la transmisión de la señal nerviosa de prurito tiene asimismo otras consecuencias que amplificarán el fenómeno:

- 40 - Así, la activación de los receptores PAR-2 por la triptasa a nivel de las fibras nerviosas causa una liberación por estas fibras de neuropéptidos, como la sustancia P y el CGRP (calcitonine gene related peptide o péptido relacionado con el gen de la calcitonina. La sustancia P es a su vez capaz de inducir la desgranulación del mastocito. CGRP y sustancia P también actúan sobre las células endoteliales induciendo así una vasodilatación, extravasación y por lo tanto reclutamiento de células de la inflamación;
- 45 - La histamina también es capaz de estimular la liberación por los nervios sensoriales de neuromediadores, tales como la sustancia P y la neuroquinina A, que pueden provocar la desgranulación del mastocito (y por lo tanto una amplificación de la reacción);
- La triptasa también puede activar e inducir la desgranulación del mastocito que también tiene receptores

PAR-2;

- Asimismo, las células endoteliales pueden responder a una estimulación por triptasa a través del receptor PAR-2;
- Por otra parte, las células endoteliales también pueden responder a una estimulación por histamina;
- Por último, el PAR-2 también es expresado por los queratinocitos epidérmicos en los que está implicado en una reacción inflamatoria a través de la activación del factor de transcripción NFκB.

Los estudios presentados a continuación se llevaron a cabo en mastocitos peritoneales de rata. Estas células tienen las mismas características que los mastocitos cutáneos y por lo tanto constituyen un modelo experimental representativo de la piel humana.

#### I. Efecto del extracto peptídico de aguacate sobre la liberación de triptasa por mastocitos

##### I.1. Material y procedimiento:

Se incubaron unos mastocitos peritoneales de rata ( $2 \cdot 10^5$  células/ml) durante 30 minutos a 37°C en presencia, o no, del extracto peptídico de aguacate (obtenido en el ejemplo 1) al 0,005% (p/v) o de quercetina (Sigma) 50 μM, inhibidor de referencia de la liberación de triptasa. Las células se estimularon entonces durante 15 minutos mediante calcio ionóforo A23187 (Millipore) 0,5 μM. El calcio ionóforo se utiliza como inductor de la liberación de triptasa (induce una entrada y una movilización del calcio intracelular). La reacción se detuvo por centrifugación a 4°C.

La liberación de triptasa se evaluó por dosificación de la triptasa en los residuos celulares y en los sobrenadantes por medio del kit "Mast Cell Degranulation Assay Kit" (Millipore). Esta prueba se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato tosil-gly-pro-lys-pNA por la triptasa.

La ausencia de citotoxicidad del extracto peptídico de aguacate en las condiciones del ensayo se confirmó mediante tinción con azul tripano.

##### I.2. Resultados:

Como se muestra en la tabla 7, el calcio ionóforo A23187 indujo una liberación masiva de triptasa y la quercetina 50 μM inhibió significativamente esta liberación (-47%,  $p < 0,01$ ); estas condiciones validan el ensayo.

Tabla 7: Liberación de triptasa por los mastocitos

	Triptasa (ng/ml)		
	Media	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición
Control no estimulado	2	1	
Control estimulado (Ca ionóforo)	83	5	
Quercetina 50 μM	44	2	-47%**
Extracto peptídico de aguacate 0,005%	58	7	-30%**

\*\* $p < 0,01$ : Ensayo t de Student

El extracto peptídico de aguacate a una concentración de 0,005% (p/v) inhibió significativamente (-30%) la liberación de triptasa por unos mastocitos inducida por el calcio ionóforo.

#### II. Efecto del extracto peptídico de aguacate sobre la liberación de histamina por mastocitos

##### II.1. Material y procedimiento:

Se incubaron unos mastocitos peritoneales de rata (10000 células/250 μl de tampón Tyrode) durante 30 minutos a 37°C en presencia, o no, del extracto peptídico de aguacate, obtenido en el ejemplo 1, al 0,05%, 0,5% y 1% (p/v) o de calcio 10 mM, utilizado como referencia inhibidora de la liberación de histamina.

Las células se estimularon a continuación durante 10 minutos por la sustancia P 10 μM (Neosystem) en presencia 0,3 mM de calcio.

La reacción se detuvo por centrifugación y los sobrenadantes y residuos celulares se recogieron con ácido perclórico 0,8 N con el fin de realizar la dosificación de la histamina mediante el procedimiento

espectrofluorométrico.

Las cantidades de histamina liberada se expresaron como porcentaje de liberación: cantidad en los sobrenadantes/cantidad total.

La ausencia de citotoxicidad del extracto peptídico de aguacate en las condiciones del ensayo fue confirmada por una dosificación de LDH (lactato deshidrogenasa).

*II.2. Resultados:*

Como se muestra en la tabla 8, la liberación de histamina fue estimulada fuertemente por la sustancia P y el calcio 10 mM inhibió significativamente (-78%) esta liberación; estas condiciones validan el ensayo.

Tabla 8: Liberación de histamina por mastocitos

	Histamina (% liberación)		
	Media	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición
Control no estimulado	2	1	
Control estimulado (sustancia P)	74	5	
Calcio 10 $\mu$ M	16	1	-78%**
Extracto peptídico de aguacate 0,05%	58	5	-21%*
Extracto peptídico de aguacate 0,5%	60	4	-19%*
Extracto peptídico de aguacate 1%	35	2	-53%**

\*p<0,05, \*\*p<0,01: ensayo t de Student

El extracto peptídico de aguacate a las concentraciones de 0,05%, 0,5% y 1% (p/v) dio lugar a una inhibición de la liberación de histamina inducida por la sustancia P significativa y dependiente de la dosis (-21%, -19% y -53%, respectivamente).

III. Efecto del extracto peptídico de aguacate sobre la expresión génica del PAR-2 en epidermis reconstruidas

*III.1. Material y procedimiento:*

Se trataron unas epidermis reconstruidas Skinethic de 17 días sistémicamente por el extracto peptídico de aguacate (obtenido en el ejemplo 1) al 0,04% (p/v) o por el ácido retinoico [Sigma] 1  $\mu$ M (referencia positiva) durante 6 horas.

El análisis de la expresión génica se realizó utilizando unos ADN arrays simplificados estándares. Estos minchips se realizaron sobre soporte Nylon, resaltando con puntos unos ADNc específicos de los marcadores de interés. El análisis se llevó a cabo según una tecnología miniaturizada y optimizada apropiada, basada en la utilización de ARN mensajero y de un marcado con 33P.

Al final del cultivo, las epidermis se aclararon con una solución de PBS (phosphate buffered saline o tampón fosfato salino). El ARN total de la epidermis se extrajo a continuación y se purificó con la ayuda del Tri-Reagent [Sigma] según un protocolo estandarizado. La cantidad y la calidad de los ARN se evaluaron después usando un bioanalizador Agilent 2100. El ARNm de cada cultivo se retro-transcribió utilizando oligodT y desoxirribonucleótido trifosfato marcado con 33P. Se realizaron para cada cultivo unas secuencias marcadas "diana" de ADNc múltiples. Estas dianas se hibridaron a continuación, en unas condiciones optimizadas, con los ADNc "sondas" en exceso fijados sobre las membranas. Después del lavado, la cantidad relativa de diana marcada se midió por conteo directo con PhosphorImager.

El análisis de las membranas se realizó utilizando un programa adecuado. Los datos tratados demuestran la expresión diferencial de los diferentes genes después del tratamiento mediante el extracto peptídico de aguacate en comparación con el control correspondiente.

*III.2. Resultados:*

Como se muestra en la tabla 9, la expresión génica del PAR-2 en epidermis reconstruidas se inhibió (-29%) mediante el ácido retinoico, control del ensayo.

Tabla 9: Expresión génica de PAR-2 en epidermis reconstruidas

	PAR-2 (expresión relativa)		
	Media	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición
Epidermis controles	4,2	0,1	
Ácido retinoico 1 µM	3	0,3	-29%
Extracto peptídico de aguacate 0,04%	2	0	-52%*

5 El extracto peptídico de aguacate, a la concentración de 0,04% (p/v), indujo una inhibición de la expresión génica del PAR-2 (-52%).

IV. Conclusión

10 Se ha podido demostrar que el extracto peptídico de aguacate es capaz de modular la liberación de histamina y de triptasa mediante unos mastocitos. Por lo tanto, el extracto peptídico de aguacate tiene un efecto inhibitor sobre la desgranulación del mastocito en el origen de la inducción y el mantenimiento de la reacción de prurito.

15 Por otra parte, se ha mostrado un efecto inhibitor del extracto peptídico de aguacate sobre la expresión epidérmica del receptor PAR-2 (Proteinase Activated Receptor 2).

El extracto peptídico puede prevenir por lo tanto los efectos de la activación del PAR-2 en el desarrollo del prurito; más particularmente, el extracto peptídico de aguacate puede modular los efectos de la triptasa sobre sus diversas dianas celulares puesto que la triptasa es un agonista endógeno del PAR-2.

20 **Ejemplo 3: extracto peptídico de aguacate: actividades hidratante y relipidante**

La hidratación natural de la piel se debe principalmente a su contenido en glicosaminoglicanos y en particular al ácido hialurónico.

25 Los glicosaminoglicanos (GAG) diferentes del ácido hialurónico son unas moléculas compuestas por una parte peptídica y una parte osídica. Están muy involucrados en la retención de agua en la dermis y contribuyen así al mantenimiento de una tasa de hidratación conveniente.

30 El ácido hialurónico (AH) se compone exclusivamente de moléculas osídicas. Es en particular un factor importante en el engrosamiento de la epidermis: forma con el agua, al cual se fija fuertemente, una red viscoelástica densa y contribuye así a la densidad, a la cohesión, a la hidratación y a la elasticidad de la piel. Con la edad, hay una disminución del contenido de AH de la epidermis.

35 La síntesis de GAG sulfatados y del AH se estudió en queratinocitos en cultivo después de un tratamiento mediante el extracto peptídico de aguacate, según el ejemplo 1, con el fin de evaluar la actividad hidratante de este último.

40 Una de las principales funciones de la piel es la de barrera de protección contra las agresiones del entorno y contra las pérdidas de agua.

45 La barrera permeable de la piel se sitúa en la capa externa de la epidermis: el estrato córneo. Los corneocitos (queratinocitos en un estado avanzado de diferenciación), células constitutivas del estrato córneo, están recubiertos en una matriz extracelular enriquecida con lípidos. Es esta matriz enriquecida con lípidos la que se encuentra en el origen de la función de barrera permeable.

Los lípidos del estrato córneo están constituidos principalmente por ceramidas (50% de la masa total de los lípidos), por colesterol (25%) y por ácidos grasos libres (10%).

50 El contenido de estos tres lípidos clave del estrato córneo es reducido en el caso de xerosis, esta disminución se podría producir por un descenso en la actividad de las enzimas que limitan las vías de síntesis de estos lípidos.

55 El efecto del extracto peptídico de aguacate sobre la neosíntesis de los lípidos epidérmicos se evaluó en un modelo de epidermis reconstruida, con análisis separado de los fosfolípidos (membranas celulares) y de los lípidos neutros (incluyendo los lípidos "especiales" de la epidermis).

I. Efecto sobre la síntesis de los glicosaminoglicanos y del ácido hialurónico por queratinocitos (actividad hidratante)

*I.1. Material y procedimiento:*

5 Se precultivaron unos queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en medio SFM [Invitrogen] bajo en calcio (0,09 mM) suplementado con EGF 0,25 ng/ml [Invitrogen], extracto pituitario 25 mg/ml [Invitrogen] y gentamicina 25 µg/ml [Sigma].

10 Los queratinocitos se trataron entonces durante 72 horas con el extracto peptídico de aguacate, según el ejemplo 1, al 0,05% MS y 0,005% MS) o por las referencias: ácido retinoico 0,1 µM [Sigma] o calcio 1,5 mM de [Prolabo]. Se prepararon dos series idénticas con el fin de dosificación por un lado la liberación/producción de ácido hialurónico y por otra parte la incorporación de sulfuro en la fracción GAG. El lote correspondiente a la dosificación de los GAG se suplementó con 35S-sulfato [Amersham] después de 48 horas de cultivo (marcado durante las 24 últimas horas).

Al final del tratamiento, en el lote correspondiente a la dosificación de los GAG, se contó la radiactividad incorporada y así, se analizó la variación de la síntesis de los GAG con respecto al control.

20 En el lote correspondiente a la dosificación del ácido hialurónico, al final del tratamiento, se extrajeron los sobrenadantes de cultivo y se dosificó el ácido hialurónico con la ayuda de un ensayo ELISA modificado específico [Biogenic].

25 Las comparaciones intergrupos se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

*I.2. Resultados:*

*I.2.1. Efecto sobre la síntesis de los GAG:*

30 El calcio, utilizado como una referencia (efecto pro-diferenciante) estimula la incorporación de 35S-sulfato en la fracción GAG; este resultado valida la prueba.

35 El tratamiento con ácido retinoico no modifica significativamente la síntesis de los GAG por los queratinocitos.

El extracto peptídico de aguacate provoca un aumento significativo en la síntesis de los GAG (+30%, tabla 10).

Tabla 10 - Síntesis de los GAG por los queratinocitos

	Incorporación de 35S-sulfato (cpm)	Porcentaje
Células control	11163	
Calcio	17753	+59%**
Ácido retinoico	13217	+18%
Extracto peptídico de aguacate 0,005% MS	14973	+34%*
Extracto peptídico de aguacate 0,05% MS	14833	+33%

40 \*p<0,05, \*\*p<0,01 - prueba de Dunnett.

*I.2.2. Efecto sobre la síntesis/liberación de ácido hialurónico:*

45 El ácido retinoico, referencia de la prueba, aumenta significativamente la cantidad de ácido hialurónico presente en los sobrenadantes de cultivo de los queratinocitos. Sin efecto sobre la síntesis de los GAG, el ácido retinoico estimula específicamente la producción de ácido hialurónico.

50 El extracto peptídico de aguacate al 0,005% aumentó significativamente la producción de ácido hialurónico (+30%) (tabla 11).

TABLA 11 - Síntesis/liberación de ácido hialurónico por queratinocitos

	AH ng/ml	Porcentaje
Células control	4684	
Ácido retinoico	11503	+146%**
Extracto peptídico de aguacate 0,005% MS	6138	+31%*
Extracto peptídico de aguacate 0,05% MS	4924	+5%

\*p<0,05, \*\*p<0,01: prueba de Dunnett.

## II. Efecto sobre la neosíntesis de los lípidos epidérmicos (actividad relipidante)

### 5 II.1. Material:

Se cultivaron unas epidermis reconstruidas el D5 [BIOalternatives] en las siguientes condiciones:

- 10 - Epidermis control (R): medio de diferenciación ]BIOalternatives],
- Epidermis control (T): medio de diferenciación deplecionado,
- 15 - Extracto peptídico de aguacate, según el ejemplo 1, al 0,005% MS y 0,05% MS en el medio de diferenciación deplecionado (aplicación sistémica).

### II.2. Procedimiento:

Las epidermis se colocaron en placas de 12 pocillos en las condiciones descritas anteriormente (medio de diferenciación deplecionado o no, que contiene o no el extracto peptídico de aguacate).

20 Al cabo de 24 horas, el medio de cultivo fue renovado y suplementado con 0,75  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{14}\text{C}$ -acetato [Amersham]. Las epidermis se incubaron a continuación durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  y al 5% de  $\text{CO}_2$ .

25 Al final del tiempo de tratamiento, las epidermis se lavaron con PBS [Invitrogen], se disociaron de sus soportes y se lisaron mediante ácido perclórico 0,5 M sobre hielo.

Los lípidos se extrajeron a continuación mediante una solución de metanol/cloroformo (2:1). La radiactividad incorporada (que corresponde a los lípidos totales) se cuantificó entonces por centelleo líquido. Después de la cromatografía sobre capa fina, los lípidos se analizaron por separado por adquisición directa de la radiactividad de los diferentes puntos y cuantificación utilizando un PhosphorImager de tipo Cyclone [Packard].

### II.3. Resultados:

#### 35 II.3.1. Efecto sobre la síntesis de los lípidos totales:

El medio de diferenciación completa (epidermis R) induce un aumento no significativo de la incorporación de acetato en los lípidos totales. El extracto peptídico de aguacate no afecta a la síntesis de los lípidos totales (tabla 12).

40 Tabla 12 - Síntesis de los lípidos totales en epidermis reconstruidas

	Incorporación de acetato (cpm)	Porcentajes
Epidermis T (medio deplecionado)	32171	
Epidermis R (medio de diferenciación)	41143	+28% (NS)
Extracto peptídico de aguacate 0,005% MS	34705	+11% (NS)
Extracto peptídico de aguacate 0,05% MS	35588	+8% (NS)

NS: no significativo.

#### 45 II.3.2. Análisis de los perfiles de neosíntesis lipídica (tablas 12 y 13):

El medio de diferenciación completo (epidermis R) induce una modificación del perfil de los fosfolípidos, en particular, con un aumento de los fosfolípidos (24% con respecto a las epidermis T), sulfato de colesterol (+13%). La cantidad total de ceramidas/cerebrósidos no cambia, a pesar de que se observa un gran cambio de los perfiles lipídicos obtenidos: aumento de las ceramidas/cerebrósidos más polares (+38%) y disminución de las ceramidas/cerebrósidos menor polares (-16%) (tabla 13). Con respecto a los lípidos neutros, el medio de diferenciación completo induce un aumento del colesterol (+19%), de los ácidos grasos libres (+37%) y una disminución de los ácidos grasos esterificados (-38%) (tabla 14).

Tabla 13 - Perfiles lipídicos en el sistema "fosfolípidos + esfingolípidos" (% del control T)

	Esfingomielina	Fosfolípidos	Sulfato de colesterol	Ceramidas/ cerebrosidos polares	Ceramidas/ cerebrosidos menos polares
Epidermis T (medio deplecionado)	100	100	100	100	100
Epidermis R (medio de diferenciación)	105	124	113	138	84
Extracto peptídico de aguacate 0,005% MS	105	124	101	130	86
Extracto peptídico de aguacate 0,05% MS	91	112	105	128	83

5 El extracto peptídico de aguacate al 0,005% y 0,05% MS induce un aumento de las ceramidas/cerebrosidos más polares (+30% y +28% con respecto a las epidermis T), una disminución de las ceramidas/cerebrosidos menos polares (-14% y -17%) (tabla 13) y al 0,05% de MS un aumento de los ácidos grasos libres (+32%) (tabla 14). Estos efectos son similares a los del medio de diferenciación completo.

10 Tabla 14 - Perfiles lipídicos en el sistema "lípidos neutros + ácidos grasos" (% de T control)

	Colesterol	Ácidos grasos libres	Ácidos grasos esterificados
Epidermis T (medio empobrecido)	100	100	100
Epidermis R (medio de diferenciación)	119	137	62
Extracto peptídico de aguacate 0,005% MS	112	103	93
Extracto peptídico de aguacate 0,05% MS	107	132	90

### III. Conclusión general

15 Se ha podido demostrar un efecto hidratante y relipidante del extracto peptídico de aguacate. En efecto, el extracto peptídico de aguacate estimula la síntesis de los glicosaminoglicanos y del ácido hialurónico, que están involucrados en el mantenimiento de una tasa de hidratación conveniente de la piel. Además, el extracto peptídico de aguacate estimula la neosíntesis de los lípidos epidérmicos, involucrados en la función de barrera de la epidermis.

### 20 Ejemplo 4 - Formulaciones cosméticas que contiene el extracto peptídico de aguacate

#### AGUA LIMPIADORA 1

Materia prima/nombre comercial	%
Agua purificada B4	CSP 100%
goma de biosacárido	de 1 al 5%
Butilenglicol	de 1 al 5%
Saponina purificada	de 0 al 1%
Agua de rosas	de 0 al 1%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Conservantes	de 0 al 1%
Alantoína	de 0 al 1%
Ácido cítrico monohidrato	de 0 al 1%
Trometamina	de 0 al 1%

#### 25 AGUA LIMPIADORA 2

Materia prima/nombre comercial	%
Capriloil glicina	de 0 al 1%
Lejía de sosa	de 0 al 1%
Agua purificada B4	de 20 al 100%
Secuestrante	de 0 al 1%
Butilenglicol	de 1 al 5%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Octanodiol	de 0 al 1%
PEG-32	de 1 al 5%
PEG-7 palmcocoato	de 1 al 5%

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Gluconato de zinc	de 0 al 1%
Ácido cítrico monohidrato	de 0 al 1%
Agua purificada B4	CSP 100%
Perfume	de 0 al 1%
Poloxámero 184	de 1 al 5%
D.S.B. CSP	de 1 al 5%

**EMULSIÓN AGUA-EN-ACEITE**

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Isoparafina líquida	de 5 al 20%
Estearato de isocetilo	de 5 al 20%
Hidroxiestearato Al-Mg	de 5 al 20%
ABIL WE 09	de 1 al 5%
Glicerol	de 1 al 5%
Aceite espeso de vaselina	de 1 al 5%
Óxido de zinc micronizado	de 1 al 5%
Butilenglicol	de 1 al 5%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Isononanoato de isononilo	de 1 al 5%
Cera blanca de abeja	de 1 al 5%
Tartrato de sodio	de 1 al 5%
Cloruro de sodio	de 0 al 5%
Glicina	de 1 al 5%
Octanodiol	de 0 al 1%
Colesterol	de 0 al 1%
Fitoesfingosina	de 0 al 1%
Ácido tartrico	de 0 al 1%
Agua purificada B4	CSP 100%

5 **EMULSIÓN ACEITE-EN-AGUA**

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Polideceno hidrogenado	de 5 al 20%
Lauril glucósido-gliestearato	de 1 al 5%
Carbonato de dicaprililo	de 1 a 5%
Glicerol	de 5 al 20%
Carbopol ETD 2020	de 0 al 1%
Goma xantana	de 0 al 1%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Lejía de sosa	de 0 al 1%
Conservantes	de 0 al 1%
Ácido cítrico monohidrato	de 0 al 1%
Agua purificada B4	CSP 100%

**ACEITE**

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Solubilizante	de 0 al 1%
Aceite de almendra dulce	de 5 al 20%
Caprilato/ caprato de copra	CSP 100%
Aceite refinado de macadamia	de 5 al 20%
Caprilocaprato de glicerol	de 5 al 20%
Alfa bisabolol nat	de 0 al 1%
Alfa tocoferol	de 0 al 1%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Conservante	de 0 al 1%
Éster	de 0 al 1%

**LECHE**

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Aceite de almendra dulce	de 1 al 5%
Aceite de maíz	de 1 al 5%
Ácido esteárico	de 1 al 5%
Alcohol cetílico C16 C18	de 0 al 1%
Antiespumantes 70414	de 0 al 1%
Alcohol láurico 11oe	de 1 al 5%
Monolaurato PEG 300	de 0 al 1%
Monooleato de glicerol	de 0 al 1%
Monoestearato de glicerol	de 1 al 5%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Conservantes	de 0 al 1%
Ácido cítrico monohidrato	de 0 al 1%
Citrato trisódico	de 0 al 1%
Agua purificada	CSP 100%
Perfume	de 0 al 1%
Aceite de cacahuete	de 1 al 5%
Aceite de palma hidrogenado	de 1 al 5%

**ESPUMANTE**

5

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Agua purificada B4	CSP 100%
Lauroamfoacetato	de 5 al 20%
Cocoglucósido	de 5 al 20%
Oronal LCG	de 5 al 20%
Hydriolul KMG 30 (2)	de 5 al 20%
Diestearato PEG 6000	de 1 al 5%
Conservante	de 1 al 5%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Extracto de manzanilla	de 1 al 5%
Ácido cítrico monohidrato	de 0 al 1%
Secuestrante	de 0 al 1%
Cocoproteína de trigo	de 0 al 1%
Perfume Mustiti 11/1	de 0 al 1%
Lejía de sosa	de 0 al 1%

**PULVERIZADOR**

<b>Materia prima/nombre comercial</b>	<b>%</b>
Agua purificada B4	CSP 100%
Trilaureth-4 fosfato	de 1 al 5%
Carbonato de dicaprililo	de 1 al 5%
Butilenglicol	de 1 al 5%
Eritritiléster	de 1 al 5%
Aceite fluido de vaselina	de 1 al 5%
Manteca de karité (líquida)	de 0 al 1%
Jojoba pura	de 0 al 1%
Conservantes	de 0 al 1%
Extracto peptídico de aguacate	de 0 al 5%
Lejía de sosa	de 0 al 1%
Fragancia Mustiti 10.03	de 0 al 1%
Goma xantana	de 0 al 1%
Carbopol 981 NF	de 0 al 1%
Secuestrante	de 0 al 1%
Monohidrato de ácido cítrico	de 0 al 1%

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Extracto peptídico de aguacate, que comprende de 2 al 10% en peso de nitrógeno alfa-aminado con respecto al peso de la materia seca del extracto peptídico, y caracterizado por que por lo menos el 50% de los péptidos del extracto están constituidos por 10 a 30 aminoácidos para su utilización en el tratamiento o la prevención del prurito interno en un medicamento o composición dermatológica que comprende dicho extracto y un excipiente apropiado.
- 10 2. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado por que es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:
- obtener una torta de aguacate, ventajosamente del fruto del aguacate, mediante secado y después extracción del aceite; a continuación
  - 15 - criotrituración y deslipidación completa de dicha torta y después decantación, centrifugación y recuperación de la torta; y después
  - primera hidrólisis en presencia de glucanasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación de la fracción soluble;
  - 20 - segunda hidrólisis en presencia de una o varias proteasas, seguida de una centrifugación y de la eliminación del residuo; a continuación
  - concentración de la fase peptídica por nanofiltración y llegado el caso, decoloración en presencia de carbón activo; seguida por
  - 25 - una filtración simple (10 µm), y después por una ultrafiltración (umbral de corte de 10 kD) y; finalmente,
  - llegado el caso, adición de conservante, microfiltración esterilizante final (0,2 µm) y acondicionamiento.
  - 30
3. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que presenta la siguiente composición de aminoácidos, en porcentaje en peso con respecto al peso total de aminoácidos:
- |    |                    |             |
|----|--------------------|-------------|
| 35 | Alanina            | 6,4 - 7,8   |
|    | Arginina           | 4,7 - 5,7   |
|    | Ácido aspártico    | 10,3 - 12,7 |
|    | Cistina - cisteína | 2,9 - 3,5   |
|    | Ácido glutámico    | 13,0 - 15,8 |
| 40 | 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   |
| 45 | 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   |
| 50 | Tirosina           | 3,6 - 4,4   |
|    | Valina             | 5,8 - 7,2   |
4. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho prurito se selecciona de entre el grupo constituido por el prurito gravídico, el prurito *sine materia*, el prurito del recién nacido y el prurito de origen medicamentoso, en un medicamento o una composición dermatológica que comprende dicho extracto y un excipiente apropiado.
- 55
5. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según la reivindicación 4, caracterizado por que el prurito gravídico se selecciona de entre el grupo constituido por la colestasis gravídica y el prurigo gravídico.
- 60
6. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según la reivindicación 4, caracterizado por que el prurito *sine materia* se selecciona de entre el grupo constituido por el prurito psicógeno y prurito senil.
- 65
7. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que presenta además una actividad hidratante y relipidante.

8. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el medicamento o la composición dermatológica comprende de 0,01% al 20% en peso seco de extracto peptídico de aguacate, con respecto al peso total de dicho medicamento.
- 5 9. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el medicamento o la composición dermatológica comprende por lo menos un agente anti-irritante y/o calmante y/o cicatrizante y/o anti-envejecimiento y/o hidratante.
- 10 10. Extracto peptídico de aguacate para su utilización según la reivindicación 9, caracterizado por que el agente anti-irritante y/o calmante y/o cicatrizante y/o anti-envejecimiento y/o hidratante se selecciona de entre el grupo constituido por la glicina, los azúcares y/o péptidos vegetales, el lupeol, las oxazolininas, las oxazolidinonas, el ácido lipoico, el alfa bisabolol, los derivados de regaliz, la enoxolona, la ectoína, los furanos de aguacate, los extractos de *Centella asiatica*, la cafeína, el retinol, el retinal, el ácido retinoico, el óxido de zinc, el magnesio, el silicio, el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio, el ácido hialurónico, el ácido azelaico y sus sales o ésteres, el ácido salicílico y sus derivados, el alfa-hidroxiácido (AHA), los ésteres de AHA, el ácido pirrolidona carboxílico y derivados, las ceramidas, el colesterol, el escualano, los fosfolípidos, el beta caroteno, la vitamina A, la vitamina E, la vitamina C, la vitamina B3, la vitamina B5, la vitamina B6, el peróxido de benzoilo, la urea, la coenzima Q10, la glucosamina y sus sales, la N-acetil glucosamina, las aguas termales o de manantial, los péptidos de soja y el arabinogalactano.
- 15