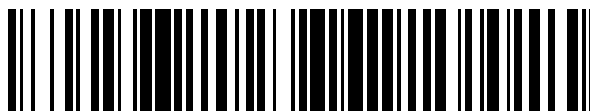


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 908**

51 Int. Cl.:

A61K 38/05 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2014** **PCT/EP2014/057224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014** **WO14167039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2014** **E 14716809 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2983691**

54 Título: **Asociación sinérgica de la alanina-glutamina, el ácido hialurónico y un extracto de avena y su utilización en una composición destinada a la cicatrización y la reparación de las lesiones cutáneas**

30 Prioridad:

10.04.2013 FR 1353231

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2018

73 Titular/es:

PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne, FR

72 Inventor/es:

CASTEX-RIZZI, NATHALIE;
DUPLAN, HÉLÈNE;
DECHELETTE, CORINNE y
BONZOM, LAETITIA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 661 908 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

Asociación sinérgica de la alanina-glutamina, el ácido hialurónico y un extracto de avena y su utilización en una composición destinada a la cicatrización y la reparación de las lesiones cutáneas.

La presente invención se refiere a una asociación sinérgica que comprende el dipéptido L-alanil-L-glutamina, el ácido hialurónico o una de sus sales y un extracto de avena, destinada ventajosamente a la cicatrización y la reparación de las lesiones cutáneas.

La cicatrización es un conjunto de fenómenos locales de defensa, que aparecen después de una agresión: herida, quemadura, acto dermatológico, intervención quirúrgica. Numerosos productos activos procedentes de la sangre y del tejido se liberan durante estos fenómenos: enzimas, diversas proteínas, histamina, etc. La cicatrización comprende varias etapas, la primera de las cuales es la coagulación de la sangre que detiene el sangrado. Los glóbulos blancos que proceden de la sangre eliminan las células muertas. Y después, unas células supervivientes proliferan y dan origen a un nuevo tejido, cuyo aspecto depende de la localización de la lesión.

La cicatrización depende de varios factores, en particular nutricionales, metabólicos, endocrinos o medicamentosos; se observan retrasos de cicatrización en los sujetos desnutridos o de edad avanzada, o en caso de ingesta prolongada de corticoides. De hecho, con la edad el proceso de mejora de la cicatrización y de recuperación de las lesiones cutáneas se vuelve menos eficaz, el proceso es más lento.

Existe todavía una necesidad de proponer nuevas composiciones para una reparación rápida y estética de las lesiones cutáneas.

Las propiedades farmacológicas del dipéptido L-alanil-L-glutamina administrado por vía oral descritas en la bibliografía son numerosas.

Entre otros, el dipéptido L-alanil-L-glutamina se utiliza *per os* como suplemento en los deportistas para facilitar la recuperación después del esfuerzo y después de una intervención quirúrgica para reducir el tiempo de hospitalización.

Este dipéptido también se recomienda en nutrición parenteral como complemento de una solución estándar de aminoácidos o de otras mezclas utilizadas en nutrición parenteral en los pacientes de reanimación que necesitan una aportación de glutamina.

En la presente invención, los inventores han demostrado de manera sorprendente que el dipéptido L-alanil-L-glutamina utilizado por vía tópica tiene una actividad biológica sobre la piel, en base a sus propiedades regenerativas: acción sobre la migración de los queratinocitos.

Además, los inventores también han demostrado que esta actividad se amplifica en gran medida cuando este dipéptido está asociado a un extracto de avena y al ácido hialurónico.

En particular, los inventores han demostrado la existencia de una sinergia entre los tres componentes, que son: extracto de avena y más específicamente el extracto de plántulas de avena, el ácido hialurónico o una de las sales y la L-alanil-L-glutamina en la migración de los queratinocitos. Esta actividad es particularmente interesante en la regeneración tisular y la cicatrización de las lesiones cutáneas.

De hecho, la migración de las células epiteliales es una etapa importante del desarrollo y del proceso de reparación tisular, tales como la embriogénesis y la cicatrización.

Los mecanismos de iniciación, de coordinación y de detención de los movimientos de las células no están completamente aclarados, sin embargo el papel primordial de la migración celular está bien establecido. Se han caracterizado varios agentes susceptibles de estimular este proceso celular, tales como ciertas proteínas matriciales o citoplásmicas (SANTORO MM., GAUDINO G., Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. EXP. CELL. RES. 304(1): 274-286, 2005) (WERNER S., GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. PHYSIOL. REV. 83(3): 835-870, 2003) (STEFFENSEN B., AKKINEN L., LARIAVA H. Proteolytic events of wound healing-coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. CRIT. REV. ORAL BIOL. MED. 12(5): 373-398, 2001).

Cuando tiene lugar la cicatrización cutánea y en las afecciones inflamatorias crónicas dermatológicas, los queratinocitos se "activan" para iniciar el proceso de migración. Las células ven entonces su fenotipo influenciado por las interacciones con la matriz extracelular por un lado y por las interacciones células-células por otro lado (MCMILLAN J.R., AKIYAMA M., SHIMIZU H. Epidermal basement membrane zone component: ultrastructural distribution and molecular interactions. J DERM SC. 31:169-177, 2003). Los queratinocitos de la capa basal de

los bordes de una herida migran sobre la herida y la recubren. De hecho, los queratinocitos se activan en contacto con la fibronectina, con el colágeno dérmico intersticial (tipo 1), con el colágeno IV y con la laminina 5 de la lámina basal. También están regulados por ciertos factores de crecimiento polipeptídicos como el TGF β , TGF α y EGF. Además, las citoquinas (IL1, TNF α) y quimiocinas (RANTES y IL8) también contribuyen a aumentar la velocidad de reepitelización de una herida, a consecuencia de la activación queratinocitaria (SZABO I., WETZEL M.A., ROGERS T.J. Cell-Density-Regulated Chemotactic Responsiveness of Keratinocytes In Vitro. J INVEST DERMATOL 117:1083-1090, 2001).

Descripción de la figura adjunta

La figura única adjunta ilustra el efecto del extracto de plántulas de avena/de ácido hialurónico y de L-alanil-L-glutamina y de sus combinaciones en la migración de los queratinocitos.

El objeto de la presente invención es una asociación que comprende L-alanil-L-glutamina, ácido hialurónico o una de sus sales y un extracto de avena.

El término "L-alanina" se refiere al ácido (S)-2-aminopropanoico, también llamado ácido α -aminopropiónico. La L-alanina es un aminoácido neutro con propiedades ligeramente apolares e hidrofóbas.

El término "L-glutamina" se refiere al ácido 2-aminoglutarámico. La L-glutamina es un aminoácido semiesencial, polar no cargado e hidrófilo.

En un modo de realización particular de la invención, la asociación comprende un ácido hialurónico, o una de sus sales, de alto peso molecular. Preferentemente, el peso molecular estará comprendido entre 50000 y 750000 Da, y preferentemente entre 250000 y 450000 Da.

La sal del ácido hialurónico será preferentemente el hialuronato de sodio.

Según un modo de realización de la invención, la sal hialuronato tendrá un peso molecular comprendido entre 50000 y 750000 Da, y preferentemente entre 250000 y 450000 Da.

En un modo de realización de la invención, el extracto de avena se obtiene a partir de plántulas de avena, y preferentemente tal como se describe en el documento WO 2010/054879.

En el sentido de la presente invención se entiende por "plántulas de avena" la avena antes de la formación de la espiga, es decir, en el estado después de la germinación (aproximadamente 2 semanas a 2 meses después de la germinación) durante el estado de crecimiento del tallo hasta la formación de la espiga, no incluida. Se denomina "crecimiento del tallo" la fase de crecimiento que corresponde a la elongación del tallo y al crecimiento de la espiga en formación, antes de la floración. Unos metabolitos secundarios se describen en la solicitud de patente WO 2010/054879 como componentes de un extracto de plántula de avena: los flavonoides y las saponinas de tipo avenacósido. Dicho extracto se caracteriza por la presencia de 2 a 15% de flavonoides y de 0,2 a 2% de avenacósidos A y B.

El método de preparación del extracto de avena puede ser de la siguiente manera:

- secado y trituración de las partes de avena, preferentemente las plántulas de avena;
- extracción en disolvente orgánico seleccionado de entre el grupo constituido por las cetonas, los ésteres, los alcoholes de C1 a C4 y las mezclas en cualquier proporción miscibles de estos disolventes; y
- centrifugación o filtración.

Ventajosamente, el disolvente orgánico del procedimiento de la invención se selecciona de entre el grupo constituido por la acetona, la metiletil cetona, la metilisobutil cetona, el acetato de etilo, un alcohol de C1 a C4 y una mezcla en cualquier proporción miscible de estos disolventes.

El orujo obtenido mediante la etapa de extracción se separa a continuación del extracto mediante centrifugación o filtración y la solución puede ser más o menos concentrada hasta la obtención de un extracto seco.

Según un modo de realización de la invención, se puede añadir un soporte en la etapa de secado en unas proporciones en masa con respecto a la materia seca extraída que pueden variar de 1 a 75%. El soporte puede ser un azúcar como la maltodextrina, la lactosa, sílice o cualquier otro soporte cosmetológicamente aceptable.

En otro modo de realización de la invención, la solución se concentra de manera que se obtenga un mosto que comprende de 60 a 80% de materia seca, y preferentemente 70% de materia seca.

En un modo de realización particular, la asociación según la invención se caracteriza por que la relación en masa ácido hialurónico/extracto de avena/L-alanil-L-glutamina está comprendida entre 2/1/3 y 2/1/5 respectivamente.

5 En otro modo de realización, la relación de ácido hialurónico, del extracto de plántulas de avena y de L-alanil-L-glutamina es una relación en peso de 2/1/4 respectivamente.

En otro modo de realización preferido, la composición según la invención comprende una relación ácido hialurónico/extracto de plántulas de avena/L-alanil-L-glutamina de 2/1/4, respectivamente.

10 Otro objeto de la presente invención se refiere a una nueva composición dermatológica o cosmética destinada a acelerar la reparación cutánea con el fin de restablecer la integridad y la calidad de la piel.

15 La composición según la invención comprende como principio activo dermatológico o cosmético la asociación de ácido hialurónico, de extracto de avena y de L-alanil-L-glutamina mencionada anteriormente y comprende además por lo menos un excipiente dermatológicamente o cosméticamente aceptable.

En un modo de realización preferido de la invención, la composición está destinada a una aplicación tópica.

20 Los excipientes dermatológicamente (farmacéuticamente) o cosméticamente compatibles pueden ser cualquier excipiente entre los conocidos por el experto en la materia con vistas a obtener una composición para la aplicación tópica en forma de una leche, de una crema, de un bálsamo, de un aceite, de una loción, de un gel, de un gel espumoso, de una pomada, de un aerosol, etc.

25 En un modo de realización preferido, la composición estará en forma de una crema, de una pomada.

En un modo de realización, la composición según la invención comprende por lo menos otro principio activo.

30 Por "principio activo" según la invención, se entiende cualquier sustancia que tiene propiedades dermatológicas o cosméticas.

Este otro principio activo podrá en particular ser seleccionado de entre el grupo que comprende agentes cicatrizantes, calmantes, antiprurito, antienvjecimiento, antiarrugas, antirradicales, anti-UV, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético, agentes hidratantes, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, anestésicos.

35 Preferentemente, se utilizarán agentes de cicatrización y/o calmantes.

40 Por último, otro objeto de la presente invención prevé la utilización de las composiciones a base de la asociación de ácido hialurónico, de extracto de avena y de L-alanil-L-glutamina para el tratamiento y la cicatrización de las lesiones cutáneas.

45 La presente invención se refiere además a una asociación de ácido hialurónico, de extracto de plántulas de avena y de L-alanil-L-glutamina según la invención para la preparación de una composición destinada a favorecer la migración queratinocitaria.

La composición según la invención está destinada al cuidado de las pieles dañadas:

- a consecuencia de actos/tratamientos invasivos: actos quirúrgicos (exéresis, rasurados) con o sin sutura, crioterapia, láser ablativo, descamaciones medias o fuertes, mesoterapia, legrado.
- en situaciones postraumáticas durante cortes o quemaduras superficiales.
- después de actos superficiales (no invasivos) que necesitan un producto cicatrizante que acelere la recuperación cutánea, que se pueda utilizar a largo plazo (hasta la reparación completa de la piel).
- a consecuencia de una alteración exterior ligera: arañazos superficiales, quemaduras de sol.

60 El tratamiento de las lesiones de la piel y de las mucosas según la invención podrá comprender en particular el tratamiento de los cortes, de las suturas, de los arañazos, de los rasguños, de las rozaduras, de las cicatrices después de cirugía o después de intervenciones de dermatología estética, de las quemaduras superficiales, de las quemaduras de sol.

65 La presente invención se refiere además a la utilización de una composición cosmética según la invención destinada a mejorar la cicatrización y la reparación cutánea.

La invención se comprenderá mejor con la lectura de los resultados siguientes que la ilustran sin limitar su

alcance.

Evaluación farmacológica de la migración de los queratinocitos

- 5 El objetivo de esta prueba era evaluar el efecto del ácido hialurónico, del extracto de plántulas de avena, de la L-alanil-L-glutamina y de sus asociaciones en la migración de los queratinocitos con la ayuda del kit de migración celular Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies).

Material biológico

- 10 Se ha utilizado la línea de queratinocitos humanos HaCaT, inmortalizados espontáneamente, citada frecuentemente como modelo de referencia en la bibliografía.

Protocolo de migración celular

- 15 El protocolo utilizado para el estudio de la migración celular se basa en la utilización de un kit de 96 pocillos, Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies - TEBU), que permite la miniaturización y la cuantificación de este proceso celular.

- 20 El principio de este ensayo consiste en estudiar la migración celular hacia el centro del pocillo de la placa de 96 pocillos. Consiste en colocar un tapón en los pocillos, con el fin de crear una zona de detección de 2 mm de diámetro. Retirar después los tapones una vez que las células se han adherido correctamente a la superficie que los rodea y permitir así que las células migren hacia la zona de detección. Las placas sin tapones y con los activos se incuban a 37°C durante 24 horas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 0% de SVF (suero de ternera fetal). Se analiza la cantidad de células situadas en la zona en la que estaba el tapón con el fin de evaluar la migración de las células. Una máscara permite visualizar y contabilizar únicamente las células situadas en esta zona. Para cada condición, se realiza la media de 6 a 8 pozos.

- 30 Se han incubado las células en medio sin SVF. Los productos examinados fueron:

- EGF: 33 ng/ml,
- extracto de plántulas de avena: 10 o 30 µg/ml,

Preparación del extracto:

- 35 Extraer 10 g de plántulas trituradas con 100 ml de disolvente de extracción acetona/agua (80/20) (v/v).

Filtrar y enjuagar el orujo con el disolvente de extracción.

- 40 Evaporar la acetona y recuperar la fase acuosa.

Filtrar. Concentrar por secado hasta la obtención de un extracto seco.

- 45
 - hialuronato de sodio (peso molecular 250-450 kDa): 20 o 60 µg/ml,
 - L-alanil-L-glutamina: 40 o 90 µg/ml.

Análisis de los resultados

Los resultados se expresan:

- 50
 - En intensidad de fluorescencia (IF), proporcional a la cantidad de las células que han migrado.
 - En porcentaje de actividad con respecto al control 0% de SVF.

$$\frac{\text{IF tratada}}{\text{IF control 0\% SVF}} \times 100$$

Análisis estadísticos

- Se han realizado unos análisis estadísticos mediante la prueba de Dunnett sobre los valores sin procesar de migración. Esta prueba proporciona entonces los valores de "valor p" que caracterizan la significatividad de los resultados obtenidos para las diferentes condiciones. El grado de significación se ha fijado en:

- 60
 - p < 0,05 (* significativo)
 - p < 0,01 (** muy significativo)
 - p < 0,001 (***) altamente significativo)
 - p > 0,05 (no significativo).

Resultados

Los resultados a diferentes concentraciones del efecto del extracto de plántulas de avena, del ácido hialurónico y de la L-alanil-L-glutamina, solos o en asociación sobre la migración de los queratinocitos están indexados en las tablas 1 y 2 y representados a continuación en la figura única. Los valores de intensidad de fluorescencia representados en esta curva corresponden a una media de 6 a 8 mediciones efectuadas durante un experimento representativo de 3 manipulaciones independientes.

En presencia de DMEM y 0% de SVF, el control positivo de los experimentos EGF induce la migración de los queratinocitos. En estas condiciones experimentales, el extracto de plántulas de avena (10 o 30 µg/ml) solo y el hialuronato (20 o 60 µg/ml) solo no tuvieron ningún efecto significativo sobre la migración de los queratinocitos. Por el contrario, su asociación parece mostrar una tendencia a aumentar la migración: +45% o +27% con respecto al control en función de las concentraciones ensayadas (tablas 1 y 2).

La L-alanil-L-glutamina sola induce la migración de los queratinocitos de manera dependiente de la concentración. Estas inducciones son incluso más importantes que con el control positivo EGF. Las asociaciones de los 3 ingredientes activos -extracto de plántulas de avena, ácido hialurónico y L-alanil-L-glutamina- inducen de manera muy importante y estadísticamente significativa la migración de los queratinocitos. Las tablas 1 y 2 y la figura 1 muestran que estas inducciones son estadísticamente significativas con respecto al control, pero también lo son con respecto al extracto de plántulas de avena y al ácido hialurónico solos o con respecto a su asociación.

La figura 1 adjunta ilustra el efecto del extracto seco de plántulas de avena (ES), del ácido hialurónico (AH), de la L-alanil-L-glutamina (Ala-Glu) y sus asociaciones en la migración de los queratinocitos. Los porcentajes corresponden a los porcentajes de actividad suplementarios con respecto al control.

Tabla 1: Efectos del extracto seco de plántulas de avena (ES), del ácido hialurónico (AH), de la L-alanil-L-glutamina (A-G) y sus asociaciones en la migración de queratinocitos. DS: desviación estándar, **p < 0,01 versus control.

Grupos	Concentración	Media ± DS	% Migración
Control		1850 ± 504	100
EGF	33 ng/ml	2569 ± 554	216
Extracto seco de plántula de avena (ES)	10 µg/ml	1748 ± 681	84
Ácido hialurónico (AH)	20 µg/ml	1939 ± 438	114
ALANIL GLUTAMINA (Ala-Glu)	40 µg/ml	2471 ± 788	200
ES + AH	10 + 20 µg/ml	2129 ± 190	145
ES + AH + A-G	10 + 20 + 40 µg/ml	4211 ± 541	480**

Tabla 2: Efectos del extracto seco de plántulas de avena (ES), del ácido hialurónico (AH), de la L-alanil-L-glutamina (A-G) y sus asociaciones en la migración de queratinocitos. DS: desviación estándar, *p < 0,05, **p < 0,01 versus control.

Grupos	Concentración	Media ± DS	% Migración
Control		1729 ± 384	100
EGF	33 ng/ml	3553 ± 1556	301*
ES	30 µg/ml	1386 ± 226	62
AH	60 µg/ml	1735 ± 488	101
A-G	90 µg/ml	2586 ± 1092	194
ES + AH	30 + 60 µg/ml	1152 ± 541	127
ES + AH + A-G	30 + 60 + 90 µg/ml	2877 ± 1024	317**

Por consiguiente, una asociación de extracto de plántulas de avena, de ácido hialurónico o una de sus sales y de L-alanil-L-glutamina aumenta de forma sinérgica la migración de los queratinocitos. Estos resultados confirman el interés de utilizar una asociación de este tipo en una composición dermatológica o cosmética cicatrizante.

Ejemplo de composición: emulsión aceite en agua

		Porcentaje	Función
Fase acuosa	Agua	CSP 100 %	
	Extracto de avena obtenido después de una extracción acetónica, filtración y concentración hasta la obtención de un mosto al 70% de materia seca	0,1-3%	Ingrediente activo
	Hialuronato de sodio de peso molecular 250-400 kDa	0,05-1%	Ingrediente activo
	L-alanil-L-glutamina	0,1-1%	Ingrediente activo

ES 2 661 908 T3

		Porcentaje	Función
	Glicerina	1-30%	Humectante
	Hexilenglicol	0,1-7%	Glicol
Fase lipófila	Glucósido cetearílico	0,1-1%	Emulsionante
	Alcohol cetearílico	0,9-4%	Emulsionante
	Ácido esteárico	0,5-4%	Factor de consistencia
	Estearato de glicerilo	0,1-4%	Factor de consistencia
	Aceite vegetal	0,1-10%	Emoliente
	Manteca de Butyrospermum Parkii (shea)	0,1-10%	Emoliente
	Silicona	0,1-5%	Emoliente

REIVINDICACIONES

1. Asociación que comprende L-alanil-L-glutamina, ácido hialurónico o una de sus sales y un extracto de avena.
- 5 2. Asociación según la reivindicación 1, caracterizada por que el ácido hialurónico está en forma de fragmentos de hialuronato de sodio.
3. Asociación según la reivindicación 2, caracterizada por que el peso molecular de los fragmentos de hialuronato está comprendido entre 50000 y 750000 Da.
- 10 4. Asociación según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el extracto de avena se obtiene a partir de plántulas de avena.
5. Asociación según la reivindicación 4, caracterizada por que la relación en masa ácido hialurónico/extracto de plántulas de avena/L-alanil-L-glutamina está comprendida respectivamente entre 2/1/3 y 2/1/5 en peso.
- 15 6. Asociación según la reivindicación 5, caracterizada por que la relación ácido hialurónico/extracto de plántulas de avena/L-alanil-L-glutamina es una relación en peso respectivamente de 2/1/4.
7. Asociación según una de las reivindicaciones 1 a 6, para utilización tópica destinada a tratar las lesiones cutáneas favoreciendo la migración queratinocitos.
- 20 8. Asociación según una de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización tópica destinada a mejorar la cicatrización.
- 25 9. Composición dermatológica o cosmética que comprende a título de principio activo una asociación según una de las reivindicaciones 1 a 6, con por lo menos un excipiente dermatológica o cosméticamente aceptable.
- 30 10. Composición según la reivindicación 9, para su utilización en el tratamiento de los cortes, de las suturas, de los arañazos, de los rasguños, de las rozaduras, de las cicatrices después de cirugía o después de intervenciones dermatológicas estéticas, de las quemaduras superficiales y de las quemaduras de sol.

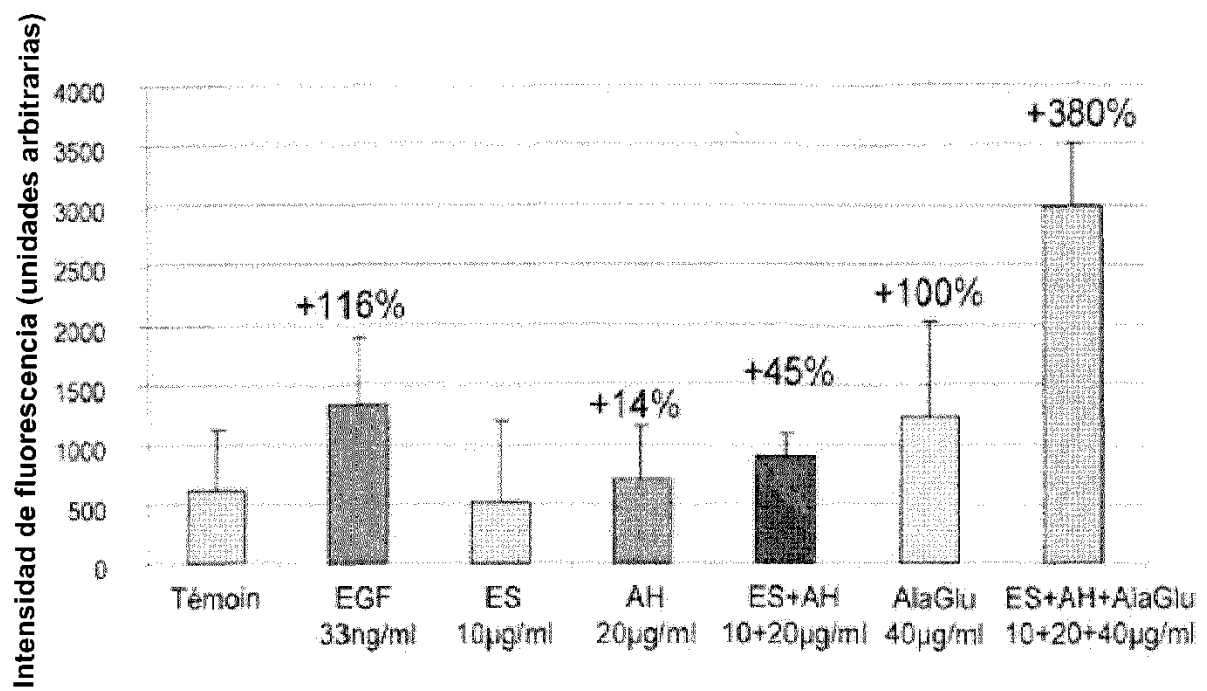


Figura única