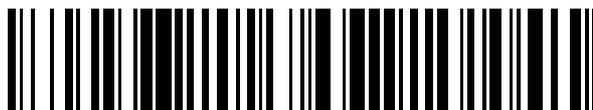


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 928**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2010 PCT/US2010/030749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10120691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 10764973 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2419117**

54 Título: **Péptido sulfóxido de metionina, composiciones y métodos de uso**

30 Prioridad:

13.04.2009 US 168808 P

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

04.06.2018

73 Titular/es:

**ELC MANAGEMENT LLC (100.0%)
767 Fifth Avenue
New York, NY 10153, US**

72 Inventor/es:

**PELLE, EDWARD y
MAES, DANIEL H.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 670 928 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).

Péptido sulfóxido de metionina, composiciones y métodos de uso**Descripción**5 CAMPO DE LA INVENCION

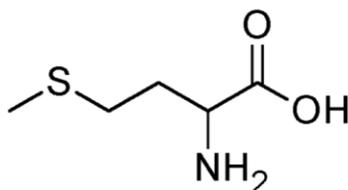
[0001] La invención se sitúa en el campo del cuidado anti-envejecimiento de la piel. Específicamente, se refiere al uso de un péptido que contiene un residuo de metionina oxidado para mejorar los efectos del estrés oxidativo en la piel humana.

10

ANTECEDENTESMetionina

15 [0002] La metionina (C₅H₁₁NO₂S) es un α-aminoácido no polar, eléctricamente neutral, hidrófobo con la estructura química

20



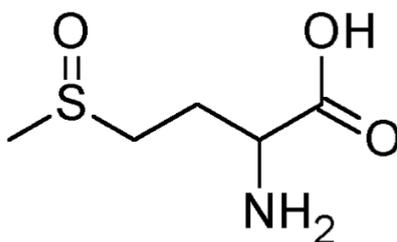
25

30 [0003] La metionina (Met) es proteinogénica. De los aminoácidos proteinógenos, la metionina tiene una de las ocurrencias más bajas reportadas en proteínas: 2,3%. Sin embargo, durante la traducción de proteínas, la metionina se encuentra en la posición N-terminal de todas las proteínas eucariotas. Los residuos encontrados, como veremos, protegen la estructura y la función de una proteína. Es un aminoácido esencial, por lo que debe ser ingerido por los humano.

35 [0004] El documento "BALOG T. ET AL.: Met-encefalina modula la resistencia al estrés oxidativo en cerebro de ratón. NEUROPEPTIDES vol. 38, octubre de 2004 describe el efecto del péptido opioide Met-encefalina (MENK) sobre la resistencia al estrés oxidativo en el cerebro de CBA de 4, 10 y 18 meses. Documento BROT N. ET AL.: "Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide" PROC. NATL. ACAD. SCI. vol. 78, n° 4, abril de 1981, describe una enzima que cataliza la reducción del sulfóxido de metionina presente en la [Met]encefalina oxidada. Documento MOZZICONACCIO. ET AL.: "Superoxide radical anions protect enkephalin from oxidation if the amine group is blocked." FREE RADIC. BIOL. MED. Vol. 43, abril de 2007, revela que el pentapéptido de metionina-encefalina (Met-enk) es un opiáceo natural que inhibe las señales de dolor. Documento SCHALLREUTER KU ET AL.: "Functioning methionine-S-sulfoxide reductases A and B are present in human skin". J. INVEST. DERMATOL, vol. 126, mayo de 2006, describe que los residuos de metionina en la estructura de proteínas y péptidos son especialmente sensibles a la oxidación por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) produciendo los diastereómeros tanto (R) como (S) del sulfóxido de metionina. F. CABREIRO: "Methionine Sulfoxide Reductases: Relevance to Aging and Protection against Oxidative Stress", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, volumen 1067, n.º 1, 1 de mayo de 2006 describe la implicación del sistema Msr en la protección contra el estrés oxidativo y el envejecimiento. El documento WO2006052775 describe péptidos que tienen un peso molecular de aproximadamente 1.034 daltons que contienen 10 residuos de aminoácidos que tienen actividad antitumoral tras la administración a mamíferos. El péptido tiene dos residuos de metionina oxigenada. El documento WO9325576 describe péptidos que corresponden sustancialmente en secuencia a fragmentos de factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF"). Estos péptidos se utilizan como agentes para el tratamiento de enfermedades vasculares. FR2391191 y FR2338925 describen péptidos que contienen Met(O) que muestra actividad analgésica. Los documentos WO2010082177 y WO2010082175 describen compuestos peptídicos, en particular del tipo KXX, para los campos cosmético y dermofarmacéutico, que son capaces de mejorar el estado general de la piel y sus apéndices. El documento EP1593685 describe péptidos antioxidantes que resultan de la digestión proteolítica de la proteína de soja. Los péptidos pueden usarse como aditivos en composiciones farmacéuticas o dietéticas para proteger los compuestos de la degradación oxidativa.

60 Oxidación de Met y envejecimiento de la piel

[0005] En las proteínas, las cadenas laterales que contienen azufre de los residuos de metionina, están sujetos a la oxidación por especies reactivas del oxígeno (ROS) en el entorno de la proteína. La oxidación de metionina por ROS da como resultado sulfóxido de metionina (MetO), que tiene la siguiente estructura:



15 **[0006]** Es posible que el átomo de azufre se oxide doblemente, dando metioninsulfona (MetO₂). La metioninsulfona es un oxidante fuerte, biológicamente irreversible, y se distingue del sulfóxido de metionina más suave, que es biológicamente reducible. A lo largo de la memoria descriptiva, las referencias a metionina oxidada se refieren a sulfóxido de metionina, no a metioninsulfona.

20 **[0007]** Cuando una proteína se oxide en un residuo de metionina y esta metionina sea crítica para la función y/o estructura de la proteína, a continuación, la actividad de la proteína puede ser alterada. La oxidación de proteínas se ha relacionado con diversos trastornos, incluido el envejecimiento de la piel, donde se ha identificado como una causa importante. Véase, por ejemplo, "The Repair Enzyme Peptide Methionine-S-Sulfoxide Reductase Is Expressed In Human Epidermis and Upregulated by UVA Radiation" (Ogawa y col., Journal of Investigative Dermatology (2006) 126, 1128-1134; publicado en línea el 2 de marzo de 2006); que establece: "the accumulation of oxidized proteins is considered a hallmark of cellular aging" y "The ability to reduce MetO appears to be essential for cells to survive in the presence of ROS". Además, ahora se sabe que la exposición al sol es un contribuyente significativo a la formación de ROS en la piel humana.

30 Reductasa de sulfóxido de metionina

35 **[0008]** Lo bueno es que la oxidación de un residuo de aminoácido de metionina es reversible, incluso en la piel humana, a través de mecanismos presentes dentro de las células. Los péptidos oxidados pueden repararse. La reducción del sulfóxido de metionina está catalizada por reductasas de sulfóxido de metionina (Msr), enzimas antioxidantes que se encuentran en la mayoría de las células. Con esta comprensión del papel de Msr, surgió la teoría de que los residuos de metionina expuestos en las superficies de proteínas, y Msr, forman un ciclo redox que regula las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula. Es decir, los residuos de proteína Met son antioxidantes endógenos que actúan como captadores de especies reactivas de oxígeno en las células, mientras que Msr reduce la metionina oxidada a una forma utilizable. Por lo tanto, la oxidación de metionina en las superficies de proteínas no es simplemente un daño aleatorio, sino parte de un sistema para mitigar los efectos del estrés oxidativo.

40 **[0009]** Hay dos formas de Msr, a saber MsrA y MsrB. MsrA participa en la reducción del estereoisómero S de Msr, mientras que MsrB participa en la reducción del estereoisómero R. La Figura 1 es un esquema del papel de MsrA en la reducción de sulfóxido de metionina de nuevo a metionina.

45 **[0010]** La presencia de actividad MsrA en los queratinocitos epidérmicos se demostró por el solicitante en 2003. Por otra parte, la presencia de actividad MsrA en queratinocitos epidérmicos humanos primarios normales y en células HaCaT, y en epidermis humana de sujetos de prueba, fue reportado por Ogawa *et al.* (referencia anterior) en 2006. Ambos grupos utilizaron métodos de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa).
50 Ogawa informó de actividad significativa de MsrA en queratinocitos humanos primarios y células HaCaT. Además, Ogawa informó de que MsrA se encuentra preferentemente en capas epidérmicas nucleadas de piel humana, en lugar de capas epidérmicas queratinizadas (es decir, estrato córneo) o capas dérmicas. Por lo tanto, dentro de las células, incluidas las células de la piel, las enzimas Msr regulan la función de la proteína y evitan la acumulación de proteínas defectuosas que funcionan mal.

55 La regulación a la baja del síndrome está relacionada con el envejecimiento del tejido

60 **[0011]** A pesar del mecanismo de Msr para la reparación de las proteínas, se ha demostrado que la cantidad de MetO en proteínas aumenta con la edad. La implicación es que el sistema Msr se ve comprometido con la edad. Como lo señalaron Stadtman *et al.* (Oxidation and Aging; Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics; Volumen 1703, Número 2, 17 de enero de 2005 (disponible en línea el 9 de septiembre de 2004), páginas 135-140):

"El cambio en los niveles de MetO puede reflejar alteraciones en uno o más de muchos mecanismos diferentes, incluyendo (i) un aumento en la tasa de generación de ROS, (ii) una disminución en la capacidad antioxidante,

(iii) una disminución en las actividades proteolíticas que degradan preferentemente las proteínas oxidadas, o (iv) **una disminución en la capacidad de convertir residuos de MetO en residuos de Met, debido a una pérdida directa de niveles de enzima Msr** o indirectamente a una pérdida en la disponibilidad de equivalentes reductores (tioredoxina, reductasa de tioredoxina, generación de NADPH). La importancia de la actividad de Msr se destaca por **el hecho de que el envejecimiento se asocia con una pérdida de actividades de Msr en varios tejidos animales**, y las mutaciones en ratones que conducen a una disminución en los niveles de Msr conducen a disminución en la vida útil máxima, mientras que la sobreexpresión de Msr lleva a un aumento dramático en la duración máxima de la vida ".

[0012] Por lo tanto, el envejecimiento conduce a la regulación hacia la baja de Msr y la regulación hacia la baja de Msr conduce al envejecimiento del tejido. En los últimos años, muchos trastornos patológicos se han relacionado con la pérdida de la actividad Msr. Estos incluyen, enfermedades de Alzheimer y Parkinson, cataratas, vitiligo, trastornos relacionados con α_1 -antitripsina (es decir emfisema, envejecimiento de la piel) y la disminución de la longevidad.

Regulación hacia la baja de Msr está asociada con H_2O_2 .

[0013] La acumulación de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 en las células epidérmicas de los pacientes con vitiligo se ha relacionado con la expresión reducida de las enzimas Msr. Por el contrario, cuando los niveles aumentados de H_2O_2 en pacientes con vitiligo se redujeron artificialmente, la expresión de Msr se recuperó, acercándose a los niveles de piel sana. Además, el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 se ha relacionado con la actividad reducida de las enzimas Msr, y la pérdida de la capacidad de reducir MetO de nuevo a Met, en pacientes con vitiligo. Además, la pérdida de actividad de MsrA y MsrB (pero especialmente MsrA) en presencia de H_2O_2 (no necesariamente en la piel de un paciente vitiligo, solo en presencia de H_2O_2), también se ha demostrado. (Schallreuter et al., "Methionine Sulfoxide Reductases A and B Are Deactivated by Hydrogen Peroxide (H_2O_2) in the Epidermis of Patients with Vitiligo", Journal of Investigative Dermatology (2008) 128, 808-815; publicado en línea el 18 de octubre de 2007).

[0014] Por lo tanto, la reducción de los niveles de Msr y reducción de la actividad Msr, están asociados con niveles elevados de H_2O_2 . El aumento del estrés oxidativo está relacionado con niveles reducidos de Msr.

Regulación al alza de Msr

[0015] Ogawa *et al.* han demostrado que la exposición a la luz UVA aumenta significativamente la expresión de MsrA en la epidermis. Este efecto también se observó en células HaCaT cultivadas. La respuesta a los rayos UVA se produjo de forma dependiente del tiempo, la dosis y la longitud de onda. Del mismo modo, Ogawa *et al.* informan que la regulación positiva de MsrA se produjo en células cultivadas HaCaT, en respuesta a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

[0016] Por otro lado, se observaron dosis bajas de UVB para regular a la baja MsrA en células HaCaT, dentro de las 72 horas después de la exposición, según lo informado por Ogawa *et al.* Esto es curioso, porque la exposición a UVB tiende a inducir la producción de peróxido de hidrógeno en la epidermis. Por lo tanto, se podría haber esperado que el UVB y el peróxido de hidrógeno tuvieran efectos similares. La imagen se confunde aún más con los hallazgos de Schallreuter *et al.*, discutidos anteriormente, en los que el peróxido de hidrógeno parece regular por disminución a la Msr en pacientes con vitiligo. La opinión del solicitante es que el papel del peróxido de hidrógeno en la epidermis y los efectos de la exposición a los rayos UVB en la epidermis, en comparación con el Msr, no se comprenden completamente ahora.

Células de la piel dañadas por el sol

[0017] A lo largo de la especificación, que puede comprender UVB en el sentido de 280 - 320 nm de longitud de onda y UVA en el sentido de 320 - 450 nm de longitud de onda. La luz del sol daña la piel de dos maneras, denominadas daño directo y daño indirecto. Con daño directo, el ADN en la piel absorbe directamente los fotones de la parte del espectro UVB. En menor medida, el ADN también absorbe los fotones UVA. Esta absorción puede causar mutaciones en la secuencia de ADN, que desencadenan una respuesta dentro de las células de la piel. La respuesta puede incluir la formación de células de quemadura solar y la producción de melanina. Solo el 8% de todos los casos de melanoma se debe a una mutación directa del ADN.

[0018] En contraste, el daño indirecto se produce cuando los fotones ultravioleta entran en la piel y son absorbidos por los cromóforos. En un estado excitado, los cromóforos entran en reacciones que conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, en la piel humana, la exposición a los rayos UVB está asociada con la producción de peróxido de hidrógeno, mientras que los rayos UVA se asocian con la producción de oxígeno singlete. Si la piel no puede mantener la homeostasis neutralizando la especie reactiva, entonces la especie reactiva dañará el ADN y las proteínas de la célula de la piel a través de la oxidación; por ejemplo, en el sitio de la metionina. Este daño al ADN y a las proteínas se denomina estrés oxidativo y es una causa importante del envejecimiento de la piel.

Además, el 92% de todos los casos de melanoma se deben a daño oxidativo indirecto del ADN.

[0019] Desafortunadamente, parece que ciertos filtros solares son capaces de penetrar la piel y contribuir significativamente a la formación de especies reactivas del oxígeno. Por ejemplo,

"El número de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por UV (20 mJ cm⁻²) generadas en la epidermis nucleada depende de la cantidad de tiempo que el filtro UV octocrileno, octilmetoxicinamato o benzofenona-3 permanezca en la superficie de la piel. Después de que cada filtro UV permanece en la superficie de la piel durante $t = 20$ min, el número de ROS generados aumenta, aunque permanece por debajo del número generado en el control. Por $t = 60$ min, los filtros generan ROS por encima del control. muestran que cuando los tres filtros UV penetran en las capas nucleadas, el nivel de ROS aumenta por encima del producido naturalmente por los cromóforos epidérmicos bajo iluminación UV". (Hanson Kerry M., Gratton Enrico; Bardeen Christopher J. (2006). "Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin". Free Radical Biology and Medicine 41 (8):1205-1212).

[0020] Por lo tanto, se ha sugerido que el uso de ciertos filtros solares ha contribuido a una mayor incidencia de melanoma y otro daño oxidativo. La presente invención reduce los efectos perjudiciales de la exposición a UV sin el riesgo de daño oxidativo de algunos protectores solares. De hecho, la presente invención revierte el daño oxidativo de las proteínas de la piel.

Penetración de la piel

[0021] El estrato córneo representa la principal barrera de penetración para sustancias aplicadas por vía tópica. El estrato córneo es un tejido altamente especializado, compuesto por aproximadamente veinte capas de corneocitos incrustados en una matriz lipídica. Los corneocitos están fuertemente empaquetados y el espacio entre ellos está lleno de una estructura organizada de bicapas laminares. El estrato córneo regula el paso de sustancias lipofílicas e hidrofílicas a través de la piel. Muchos factores pueden determinar si un compuesto en particular podrá pasar a través del estrato córneo, y la velocidad a la que pasará, a capas más profundas de células epidérmicas vivas. Algunos de estos factores incluyen el tamaño, la polaridad y la solubilidad de la molécula, la edad y el estado de la piel, el uso de potenciadores de la penetración y la ruta tomada a través de la piel.

[0022] En cuanto a tamaño, la experiencia ha demostrado que las moléculas tienen cada vez más dificultades para penetrar el estrato córneo cuando aumenta el peso molecular de la molécula más allá de aproximadamente 600 Daltons. Algunas fuentes colocan este corte un poco más bajo, dependiendo del tipo y la salud de la piel. Por ejemplo, una fuente sugiere que "The largest molecules that can penetrate through intact skin have a molecular weight of 500". ("Routes for Skin Penetration", N. Dylan, Cosmetoscope Technical Notes 0504; consultado en <http://www.nyscc.org/cosmetoscope/archive/tech0504.html> el 4 de marzo de 2009). Por lo tanto, de ninguna manera se deberían tomar 600 Dalton como un punto de corte absoluto para la penetración de la piel. Las moléculas más grandes pueden penetrar en la piel. Sin embargo, al aumentar más allá de aproximadamente 600 Daltons, la penetración a través del estrato córneo mediante medios cosméticamente aceptables se vuelve cada vez más problemática. Por lo tanto, si se diseña una molécula transportadora para penetrar en la piel, no sería obvio usar una molécula que tenga un peso de aproximadamente 606 Daltons. Con respecto a la polaridad, en general, las especies catiónicas penetran mejor en la piel que las aniónicas. Con respecto a la solubilidad, los compuestos lipofílicos tienden a penetrar en el estrato córneo más rápido que los compuestos hidrofílicos.

[0023] La capacidad de los compuestos aplicados por vía tópica para entrar y pasar a través del estrato córneo se puede mejorar mediante potenciadores de la penetración conocidos, que reversiblemente disminuyen la resistencia de barrera de la piel. Numerosos compuestos químicos han sido evaluados para la actividad de mejora de la penetración, incluyendo sulfóxidos (es decir, dimetilsulfóxido, DMSO), azonas (es decir, laurocapram), pirrolidonas (es decir, 2-pirrolidona, 2P), alcoholes y alcanoles (es decir, etanol o decanol), glicoles (es decir, propilenglicol), surfactantes y terpenos. Estos grupos de potenciadores de la penetración representan diversos modos de acción y una variedad de canales de penetración a través de la barrera de la piel. Los medios no químicos para mejorar la penetración de barrera incluyen técnicas físicas (es decir, iontoforesis, sonoforesis), técnicas enzimáticas (que alteran ciertos aspectos de los lípidos del estrato córneo) y el uso de vehículos vesiculares (es decir, liposomas, niosomas, etc.).

Deficiencia de alfa 1-antitripsina

[0024] La deficiencia de alfa 1-antitripsina es un trastorno genético que conduce a la disminución de actividad de α -1-antitripsina (A1AT) en la sangre y los pulmones. Es interesante observar que un estudio sobre el uso de A1AT en aerosol está en marcha. La A1AT en aerosol se inhala en los pulmones con el objetivo de alcanzar el tracto respiratorio inferior. Todavía no se sabe si el A1AT inhalado alcanza las fibras de elastina dañadas en el pulmón. (véase el artículo "Alpha 1-antitrypsin deficiency", http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha_1-antitrypsin_deficiency; última modificación el 28 de marzo de 2009.) Este artículo no divulga ni sugiere el uso de un péptido que tenga una C-

terminal de sulfóxido de metionina en el terminal, para regular al alza la Msr en los pulmones. No describe ni sugiere un péptido aerosolizado que tenga un residuo de sulfóxido de metionina C-terminal.

5 **[0025]** Antes de la presente invención, el solicitante no estaba al tanto de cualquier composición tópica cosméticamente aceptable que, cuando se aplica antes de la exposición al sol, protege la piel a través de la regulación al alza de Msr. El (los) solicitante(s) no conocía(n) ninguna técnica anterior que describiera una composición tópica cosméticamente aceptable que comprende un péptido que tiene un sulfóxido de metionina terminal, específicamente un péptido que es aproximadamente o más pequeño que un peso molecular aproximadamente 600. El (o los) solicitante(s) no conocía(n) ningún método cosméticamente aceptable para reducir los efectos perjudiciales de la luz ultravioleta que comprende las etapas de aplicar a la piel un péptido que incluye un sulfóxido de metionina terminal.

RESUMEN

15 **[0026]** Un polipéptido corto que contiene una metionina oxidada en su extremo C-terminal se muestra para inhibir la producción de células de quemaduras solares en modelos de piel viva y para regular al alza la reductasa de sulfóxido de metionina. El polipéptido corto está dado por la siguiente secuencia: (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - M - O Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO. Se describen composiciones y métodos cosméticamente aceptables para usar el polipéptido. Se conjetura adicionalmente que el péptido oxidado puede reparar la alfa 1-antitripsina oxidada, que, a su vez, inhibe la ruptura del tejido conectivo por elastasa. Este efecto puede tener ramificaciones de amplio alcance, que incluyen, por ejemplo, la reparación de la piel dañada por el sol y el tratamiento del enfisema.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **[0027]**

La Figura 1 es un esquema del papel que desempeña MsrA en la reducción de sulfóxido de metionina a metionina.

30 La Figura 2 muestra el efecto de Msr sobre peróxido de hidrógeno inducido por UVB en queratinocitos epidérmicos humanos normales.

La Figura 3 muestra el efecto de Msr sobre la muerte celular inducida por UVB, en queratinocitos epidérmicos humanos normales.

35 La Figura 4 muestra el efecto positivo de un péptido oxidado (MetO-encefalina) sobre la regulación positiva de Msr en queratinocitos epidérmicos humanos normales.

Las Figuras 5 y 6 muestran el efecto inhibitorio de MetO-encefalina sobre la producción de células de quemadura solar causadas por radiación UVB.

La Figura 7 muestra la baja citotoxicidad de MetO-encefalina en células epidérmicas.

La Figura 8 muestra que alfa-1-antitripsina inhibe la actividad de la elastasa.

40 Figura 9 muestra que α -1-antitripsina oxidada no puede inhibir la actividad de la elastasa.

La Figura 10 muestra que la actividad inhibitoria de la elastasa de α -1-antitripsina puede ser restaurada por MsrA, lo cual reduce la α -1-antitripsina oxidada

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0028]** A lo largo de esta memoria descriptiva, "comprende" y sus conjugados se entenderán por tener un extremo abierto, lo que significa que un grupo, lista, colección o composición no se limita a los elementos nombrados explícitamente.

50 **[0029]** Después de establecer la presencia de reductasa de sulfóxido de metionina (MSR) en los queratinocitos por RT-PCR convencional, los experimentos comenzaron con formas para regular al alza esta enzima de una manera no citotóxica. El primer material probado fue la metionina oxidada (la forma de sulfóxido), pero los resultados mostraron que no se podía elevar la proporción de Msr a un gen de mantenimiento. Sin embargo, en estos experimentos, un péptido oxidado dio muy buenos resultados.

55 **[0030]** La presente invención se basa, en parte, en las siguientes observaciones: 1. Msr inhibe el peróxido de hidrógeno inducido por UVB en NHEK y mejora la viabilidad celular; 2. sulfóxido de metionina (MetO), por sí mismo, no regula significativamente al alza Msr; 3. un polipéptido de peso molecular pequeño que tiene un sulfóxido de metionina C-terminal es capaz de regular positivamente Msr en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK); 4. la versión no oxidada de este polipéptido no regula el Msr significativamente al alza; 5. Además de regular positivamente el Msr, el polipéptido oxidado es eficaz para inhibir la formación de células de quemadura solar en modelos de piel viva irradiados con UVB; 6. usando el polipéptido oxidado, Msr está regulado positivamente de una manera no citotóxica. Cada uno de estos será discutido, a su vez.

1. Msr inhibe el peróxido de hidrógeno endógeno e inducido por UVB en NHEK y mejora la viabilidad celular

[0031] Las Figuras 2a y 2b muestran los efectos de Msr sobre peróxido de hidrógeno endógeno y inducido por UVB, en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK). Los NHEK se preincubaron en Msr a las concentraciones mostradas. Después de la incubación, algunas células se expusieron a UVB (20 MJ/cm²). Como muestra el gráfico, hubo una reducción significativa en los niveles de peróxido de hidrógeno endógeno y una reducción significativa en la formación de peróxido de hidrógeno debido a la exposición a UVB. Dado que Msr inhibe el H₂O₂ inducido por UVB, se supuso que la regulación positiva de Msr, mediante los métodos descritos en este documento, puede usarse antes de la aparición del estrés oxidativo, como una medida preventiva. Dado que Msr reduce H₂O₂ endógeno se establece que la regulación positiva de Msr, por los métodos aquí descritos, es anti-envejecimiento, con respecto a los queratinocitos. Por lo tanto, la administración del péptido oxidado en la piel parece constituir un enfoque novedoso para el cuidado de la piel contra el envejecimiento.

[0032] La Figura 3 muestra el efecto de Msr sobre la muerte celular inducida por UVB en queratinocitos epidérmicos humanos normales. El NHEK se preincubó en Msr, durante cuatro horas, en las concentraciones que se muestran, seguido de la exposición a diversos niveles de UVB. Como muestra el gráfico, el porcentaje de muerte celular como resultado de la exposición a UVB se reduce significativamente, en comparación con el control no tratado. Este resultado se observa en todos los niveles probados de exposición a UVB y concentración de Msr.

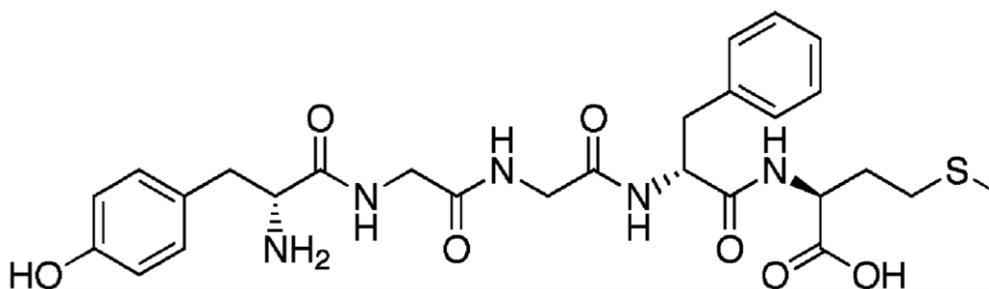
2. La metionina oxidada (MetO), por sí sola, no aumenta significativamente la Msr en NHEK

[0033] En o aproximadamente en agosto de 2003, después de establecer la presencia de reductasa de sulfóxido de metionina (MSR) en queratinocitos por RT-PCR convencional, los experimentos comenzaron con formas para regular al alza esta enzima de una manera no citotóxica. El primer material ensayado fue la metionina oxidada (la forma de sulfóxido). Los resultados mostraron, sin embargo, que el nivel de Msr en comparación con un gen de limpieza, no se elevó significativamente. Los solicitantes lo intentaron varias veces, pero en febrero de 2004, estaba claro que este aminoácido oxidado no induciría a la Msr en los queratinocitos. También se ensayó la albúmina sérica bovina oxidada, una proteína comparativamente grande, sin éxito. Sin embargo, en un experimento realizado en febrero de 2004, un polipéptido oxidado dio muy buenos resultados. Las investigaciones continuaron en ese sentido.

3. Polipéptidos de peso molecular pequeño que tienen un sulfóxido de metionina C-terminal son capaces de regular positivamente la Msr en los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK)

[0034] El péptido oxidado de acuerdo con la presente invención está dada por la siguiente secuencia: (. SEQ ID NO 1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - Meto
Este polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 606 y se oxida en su residuo de metionina C-terminal.

[0035] La versión no oxidada de este péptido se conoce como Met-enkefalina (número CAS:58569-55-4; C₂₇H₃₅N₅O₇S).



[0036] Met-enkefalina es un neurotransmisor pentapeptídico, que tiene una masa molar de 573.6611 g/mol. Met-enkefalina regula el dolor y la nocicepción en el cuerpo.

[0037] Por "Meto-enkefalina" nos referimos a la versión oxidada de Met-enkefalina, oxidada en el azufre de su residuo de metionina C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO. 1.

[0038] Lo siguiente demuestra que meto-enkefalina regula al alza Msr en los queratinocitos epidérmicos humanos normales. Las células NHEK se incubaron durante la noche en medio de cultivo (control) y en medio de cultivo que contenía péptido oxidado y en medio de cultivo que contenía péptido no oxidado (control). Las concentraciones (mg/ml) del péptido oxidado incluyeron 0,01, 0,1 y 0,25. El péptido no oxidado (es decir, Met-enkefalina) se ensayó solo a 0,25 mg/ml. Después de la incubación, el mRNA se extrajo de las células y el ADNc se preparó por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Las muestras se sondearon para Msr a través de electroforesis en gel utilizando β-microglobulina como control. Los resultados se muestran en la figura 4. Los

aumentos medios en la expresión de Msr fueron 18, 28 y 25,4 por ciento, para las concentraciones de péptido oxidado de 0,01%, 0,1% y 0,25%, respectivamente. El resultado se confirmó con transferencia Western, que mostró aumentos de mRNA de Msr en células tratadas con el péptido oxidado.

5 4. El polipéptido no oxidado no regula de forma significativa Msr en NHEK

[0039] Como también puede verse en la figura 4, el péptido no oxidado no causó ningún aumento significativo en la expresión de Msr. De nuevo, este resultado se confirmó con la transferencia Western, que no mostró aumentos significativos del mRNA de Msr en células tratadas con el péptido no oxidado.

10 5. El polipéptido oxidado es eficaz para inhibir la formación de células de quemadura solar en modelos de piel viva irradiados con UVB

15 [0040] El efecto de péptido oxidado meto-encefalina en modelos de piel viva irradiada con UVB fue evaluado al examinar la producción de células de quemaduras solares (SBC).

20 [0041] Métodos: Modelos de piel viva epidérmica de espesor total 200 (EFT 200) que se obtuvieron de MatTek y se incubaron durante 48 horas en medios con o sin 1 mg/ml de meto-encefalina. El péptido oxidado se puede almacenar a temperatura ambiente. Debido a que el péptido ya está oxidado, tiene una reactividad relativamente baja durante el almacenamiento. Se añadieron dos ml de medio debajo de los modelos de piel viva, que estaban situados en una membrana Transwell para permitir el mantenimiento de una interfaz de aire/acuosa. Después de 48 horas, los modelos que viven en la piel fueron expuestas a 100 mJ/cm² de UVB, se re-alimentaron, y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, las muestras se fijaron en formalina al 10% y se enviaron a Paragon Bioservices para el corte histológico y la tinción H&E. Cinco campos microscópicos contiguos para cada sección se evaluaron para la presencia de SBC contando el número de células SBC y no implicadas y expresando SBC como un porcentaje del total. Las células de quemadura solar se caracterizan por tinción eosinofílica del citoplasma y núcleos picnóticos (cromatina condensada).

30 [0042] Resultados: La producción de células de quemaduras solares en la muestra tratada con 1 mg/ml de meto-encefalina, se redujo notablemente. Los resultados de dos ensayos separados del mismo experimento se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente. La reducción porcentual promedio en SBC de ambos ensayos fue 31,1%. Por lo tanto, una cantidad sustancial de protección contra los efectos nocivos de la radiación UVB ha sido demostrada por el péptido MetO-encefalina.

35 [0043] Se formuló la pregunta, ¿se debe la reducción observada en la formación de células de quemadura solar a la absorbancia de UVB por el péptido? La respuesta es ciertamente no. El espectro UV de MetO-encefalina es casi idéntico al agua. A 290 nm, hay una absorbancia que se traduce en un valor k de 0,24 y un coeficiente de extinción de 145,5. Sin embargo, esta absorbancia es leve y, por lo tanto, la absorbancia del péptido no contribuyó significativamente a la reducción en la aparición de SBC. Además, el péptido se aplicó debajo de los modelos de piel viva y las exposiciones se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos que tenían tapas de poliestireno, que filtraban eficazmente toda la radiación UV por debajo de aproximadamente 300 nm. Por lo tanto, se puede concluir que el péptido MetO-encefalina protege los queratinocitos epidérmicos humanos normales de los efectos nocivos de la radiación UVB, por medios distintos de la absorción de la radiación. Sin desear estar sujetos a ninguna teoría, se cree que mientras que la radiación UVB aumenta la concentración celular de MetO, la MetO-encefalina regula el Msr a la alza, que luego reduce el MetO inducido por UVB de nuevo a Met.

50 6. Al usar el polipéptido oxidado, Msr se regula positivamente de una manera no citotóxica

[0044] La Figura 7 muestra la citotoxicidad (o la falta de la misma) de MetO-encefalina, a diversas concentraciones, en queratinocitos. Estos resultados también demuestran que los efectos observados en los queratinocitos después de la incubación con el péptido oxidado, no se debieron a la citotoxicidad.

55 [0045] Fue inesperado, y no inferido en la técnica anterior, que un pequeño polipéptido, que contiene metionina, en sí ya oxidado en un residuo de metionina C-terminal, tendría los efectos observados. Esto es especialmente cierto, ya que, en sí misma, la metionina oxidada no puede regular positivamente el Msr. En resumen, los datos sugieren que el polipéptido oxidado de MetO-encefalina regula positivamente el Msr, protege a los modelos de piel contra el estrés UVB reduciendo la formación de SBC e inhibiendo la producción de H₂O₂, y puede reducir el daño inducido por elastasa en la piel, así como aumentar los niveles de Msr en pacientes con vitiligo.

60 Reparación de α_1 -antitripsina oxidada, inhibiendo la elastasa con Msr

[0046] Por primera vez, Msr se ha utilizado para reparar α_1 -antitripsina oxidada (también conocido como A1AT; también conocido como inhibidor de proteínasa α_1 A1PI), con consecuencias potencialmente de amplio alcance. A1AT, un inhibidor de proteasa de serina fabricado en el hígado, inhibe una amplia variedad de proteasas, no solo la

tripsina. Por ejemplo, A1AT protege los tejidos de los efectos de las enzimas liberadas durante los episodios inflamatorios. Una de esas enzimas es elastasa.

5 **[0047]** La elastasa es una proteasa que descompone la elastina. La elastina es uno de los dos componentes principales de todo el tejido conectivo. Con el tiempo, si la elastasa no se verifica, pueden producirse diversas patologías del tejido conectivo, dependiendo de la ubicación y la función del tejido afectado. Por ejemplo, la actividad excesiva de la elastasa puede conducir a la flaccidez de la piel y la elatosis; enfisema o enfermedad pulmonar obstructiva crónica en los pulmones; y cirrosis en el hígado, solo por nombrar algunos.

10 **[0048]** En condiciones normales, α -1-antitripsina (A1AT) comprueba la actividad de la elastasa de neutrófilos mediante el mantenimiento de la elastasa en una forma inactiva. A1AT hace esto usando su residuo de metionina 358 para unir elastasa. Pero cuando A1AT se oxida en su residuo de metionina 358, la función de unión de A1AT se altera y se produce una ruptura excesiva del tejido conectivo. La oxidación de los residuos de metionina 358 de A1AT se ha asociado con mayores niveles de peróxido de hidrógeno celular, inflamación, tabaquismo y estrés oxidativo.
15 Lo que se necesita, es un método para reponer α -1-antitripsina. Ventajosamente, se ha observado que Msr parece reparar α -1-antitripsina oxidada y restaurar la inhibición de la elastasa.

[0049] Métodos: Un ensayo de elastasa de Sondas Moleculares se utilizó y se adaptó para la inhibición con α -1-antitripsina. La fluorescencia de la gripe se midió por excitación a 485 nm y emisión a 525 nm en un lector de placa
20 CytoFluor.

[0050] Resultados: La Etapa 1 del experimento demuestra que la actividad de la elastasa se inhibe por α -1-antitripsina. Esto se logró mediante la incubación de 0,1 mg/ml de elastina y 0,05 unidades/ml de elastasa con α -1-antitripsina en una forma dependiente de la dosis (2,5- 50 ug/muestra). Los resultados se muestran en la Figura 8,
25 donde con = control; E = elastasa; I = inhibidor (incluido con el ensayo); AT = α -1-antitripsina. La fluorescencia disminuye con concentración creciente de α -1-antitripsina, que indica una mayor inhibición de la elastasa.

[0051] Etapa 2 del experimento demuestra que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) interfiere con la capacidad de α -1-antitripsina para inhibir la elastasa. Esto se hizo mediante la oxidación de 10 μ g de α -1-antitripsina con peróxido de hidrógeno. Figura 9 muestra que concentraciones de 5, 10, y 30 milimolares (mM) de H_2O_2 , se incubaron durante 3
30 horas a temperatura ambiente, inhiben α -1-antitripsina en una forma dependiente de la dosis. A 30 mM de H_2O_2 , casi toda la inhibición de elastasa proporcionada por α -1-antitripsina se pierde.

[0052] La Etapa 3 del experimento demuestra que la oxidación de α -1-antitripsina se puede revertir con msrA. Esto se logró mediante la incubación de la A1AT que se había oxidado en 30 mM H_2O_2 con 0,7 mg/ml msrA y 10 mM DTT durante 2 horas. Las muestras se volvieron a ensayar como antes en el ensayo de actividad de elastasa, junto con los controles apropiados, tales como, DTT solo, Msr solo, etc., y que no tuvieron ningún efecto. La Figura 10 muestra el resultado de este experimento. Comenzamos con 100% elastasa. Como antes, α -1-antitripsina (AT) elimina aproximadamente el 90% de la actividad de la elastasa (elastasa + AT marcado con barra). Después de la oxidación
40 de la α -1-antitripsina, toda la actividad de la elastasa retorna (elastasa + ATox marcado con barra). Finalmente, la barra situada más a la derecha en la figura 10 muestra que 0,7 mg/ml de MsrA condujo a la reinhibición de más del 59% de la actividad de elastasa. Por lo tanto, MsrA fue capaz de restablecer de manera significativa la inhibición de la elastasa a α -1-antitripsina oxidada con precisión enzimática.

45 **[0053]** Puesto que las reparaciones de Msr oxidaron α -1-antitripsina, se espera que el péptido oxidado meto-encefalina se puede usar para reducir el daño inducido por elastasa a la piel, al regular al alza Msr epidérmico. Una vez MetO-encefalina se suministra a y se absorbe en la piel de una persona en necesidad de tratamiento, el MetO-encefalina regulará al alza Msr, que luego reparará α -1-antitripsina oxidada. La α -1-antitripsina reparada no detendría la descomposición del tejido conectivo por la elastasa.
50

[0054] Del mismo modo, se esperaría que MetO-encefalina fuera útil en cualquier condición o patología que implica la oxidación del residuo de metionina 358 de α -1-antitripsina. Por ejemplo, se espera que MetO-encefalina pueda ser útil en el tratamiento del enfisema. Por ejemplo, MetO-encefalina se puede administrar al tracto respiratorio inferior en un vehículo de aerosol, inhalado por una persona que necesita tratamiento para el enfisema o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En el tracto respiratorio, MetO-encefalina puede regular al alza Msr, que luego repararía α -1-antitripsina oxidada. La α -1-antitripsina reparada detendría la descomposición del tejido conectivo por la
55 elastasa.

[0055] Se espera además, que MetO-encefalina pueda ser útil en general, como un regulador positivo de la Msr, en todos los tejidos a los que MetO-encefalina pueden ser administrados.
60

Composiciones

[0056] Se espera que los beneficios de los péptidos oxidados descritos en el presente documento se realicen

mediante la aplicación a la piel, que comprende una composición de una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y los péptidos oxidados en la misma. El péptido oxidado es MetO-encefalina. Una "cantidad efectiva" de péptido(s) oxidado(s) es una cantidad suficiente para regular positivamente Msr en cantidades suficientes para prevenir un nivel definido de daño tisular oxidativo sobre un área superficial determinada de la piel. Se pueden realizar cantidades efectivas cuando la concentración de péptido(s) oxidado(s) es tan baja como 0,01% en peso de la preparación. Por lo tanto, la cantidad promedio de preparación tópica por centímetro cuadrado típicamente aplicada por un consumidor podría comprender fácilmente una cantidad efectiva de péptido oxidado.

[0057] El péptido oxidado por MetO-encefalina se puede incorporar en una amplia gama de formulaciones cosméticamente aceptables adecuadas para aplicación tópica a la piel de un usuario. Una primera restricción principal sobre los ingredientes, la forma de composición y el método de fabricación es que el producto final debe contener una "cantidad efectiva" de péptido oxidado, como se describió anteriormente. Una segunda restricción principal es que la formulación final no debe reducir, a niveles inaceptables, la capacidad del péptido oxidado de regular positivamente Msr o inhibir la formación de células de quemadura solar.

[0058] En general, será posible, a través de experiencia ordinaria en la técnica, incorporar el péptido oxidado en composiciones acuosas y no acuosas. Las composiciones acuosas pueden estar en forma de una emulsión, solución, suspensión, dispersión, barra, gel o aerosol. Si en forma de una emulsión, puede ser una emulsión de agua en aceite o aceite en agua. Todas las formas acuosas de la composición pueden contener rangos de agua, de menos a más preferible, de la siguiente manera: aproximadamente: 1-99%, 5-99%, 1-90%, 10-99%, 5-90%, 1-85%, 5-85%, 10-90% y 10-85%. Cuando el aceite está presente, hay 1-99%, preferiblemente de aproximadamente 5-90%, más preferiblemente de aproximadamente 5-75% de aceite.

[0059] La composición puede contener prácticamente cualquier ingrediente cosméticamente aceptable. Por ejemplo, puede contener protectores solares. Los protectores solares incluyen protectores solares UVA o UVB químicos o filtros solares físicos en forma de partículas. Si está presente, los protectores solares pueden variar de aproximadamente 0,1 a 50%, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 40%, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 35%. Sin embargo, para un nivel de protección dado, puede ser posible reducir la cantidad de protector solar, debido a la protección proporcionada por MetO-encefalina, descrita anteriormente. Otros ingredientes opcionales incluyen: humectantes (es decir, glicoles, azúcares); tensioactivos (es decir basados en silicona u orgánicos, si está presente, el tensioactivo puede variar de aproximadamente 0,001 a 30%, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 25%, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20% en peso de la composición total); materiales biológicos (es decir, % de fragmentos de ARN o ADN celular, o microorganismos probióticos, si están presentes, tales materiales pueden variar de aproximadamente 0,001 a 30%, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 25%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20); agentes estructurantes; aceites (es decir, volátiles y no volátiles, silicona y sin silicona); vitaminas; antioxidantes; activos de piel y más.

Métodos de uso

[0060] El péptido oxidado de la presente invención puede usarse para reparar el daño debido al estrés oxidativo o que se puede usar para prevenir el daño debido al estrés oxidativo.

[0061] Reparación - Para reparar daños en la piel debido al estrés oxidativo, los péptidos oxidados de la presente invención se pueden aplicar a la piel dañada. Una composición de acuerdo con la presente invención, aplicada a la piel de una persona que necesita tratamiento para la piel dañada oxidativamente, regulará positivamente el Msr, que reparará las proteínas en la piel que se han oxidado en sus residuos de metionina C-terminales. El Msr regulado al alza también puede reparar α_1 -antitripsina (A1AT) que se han oxidado en sus residuos de metionina 358. Por lo tanto, se describe un método para reducir la cantidad de residuos de aminoácidos oxidados, la metionina en la piel humana, si estos residuos oxidados están en proteínas de la piel, tales como las que se encuentran en los queratinocitos, o en α_1 -antitripsina. El método incluye los pasos de aplicar una "cantidad efectiva" de MetO-encefalina a la piel que ha oxidado los residuos de aminoácidos de metionina. El método puede incluir la etapa de aplicar una composición que comprende el péptido oxidado a una concentración de al menos aproximadamente 0,01% en peso.

[0062] Prevención - Para evitar daños en la piel debido a estrés oxidativo, el péptido oxidado de la presente invención puede ser aplicada a la piel antes de la aparición de un estrés oxidativo específico. Por ejemplo, si alguien planea pasar un día en la playa, una composición de acuerdo con la presente invención, aplicada a la piel, regulará positivamente el Msr e/o inhibirá la formación de la celulitis, lo que reducirá el daño que de otro modo hubiera ocurrido debido a exposición UVA y/o UVB. Por lo tanto, se describe un método para mantener la cantidad de residuos de aminoácidos de metionina oxidados en la piel humana. El método incluye los pasos de aplicar una "cantidad efectiva" de péptido oxidado con MetO-encefalina a la piel con riesgo de experimentar la aparición del estrés oxidativo; y, después del paso de aplicar el péptido oxidado, exponer la piel al riesgo. El método puede incluir la etapa de aplicar una composición que comprende el péptido oxidado a una concentración de al menos aproximadamente 0,01% en peso.

[0063] La reducción de los signos del envejecimiento - Un método de la invención reduce mensurable uno o más signos de envejecimiento de la piel. En este método, una cantidad efectiva del péptido oxidado de MetO-encefalina se aplica repetidamente a un área de la piel que manifiesta uno o más signos de envejecimiento de la piel. Las aplicaciones repetidas se realizan durante días o semanas o meses o años, al menos hasta que se observe una mejora en la piel. El péptido oxidado se puede aplicar a la piel según un cronograma definido, es decir, una o más veces por día durante tres semanas; o dos veces al día cada dos días, durante seis meses. Las aplicaciones pueden llevarse a cabo hasta que se realice una reducción mensurable en uno o más signos de envejecimiento. A partir de entonces, las aplicaciones pueden detenerse o modificarse para mantener la reducción de los signos de envejecimiento. Este método incluye la etapa de aplicar regularmente una composición que comprende el péptido oxidado a una concentración de al menos aproximadamente 0,01% en peso. Los signos de envejecimiento que pueden reducirse de forma mensurable incluyen, pero no se limitan a, todas las manifestaciones visibles y táctiles hacia el exterior, así como cualquier otro efecto macro o micro debido al envejecimiento de la piel. Dichos signos pueden ser inducidos o causados por factores intrínsecos o factores extrínsecos, por ejemplo, envejecimiento cronológico y/o daño ambiental. Estos signos pueden incluir, entre otros, los siguientes (en la medida en que lo siguiente es causado por daño oxidativo de la proteína): discontinuidades de textura como arrugas; pérdida de elasticidad de la piel (pérdida e/o inactivación de la elasticidad funcional de la piel), flacidez (hinchazón en el área de los ojos y la papada), pérdida de firmeza de la piel, pérdida de la firmeza de la piel, pérdida del retroceso de la piel por deformación, elastosis, degradación del colágeno y otros cambios histológicos en el estrato córneo, dermis, epidermis; decoloración (incluso debajo de los círculos oculares), manchas, poca profundidad, regiones hiperpigmentadas de la piel, como manchas y pecas de la edad, queratosis, diferenciación anormal e hiperqueratinización.

Tratamiento de los trastornos de α_1 -antitripsina

[0065] Se da a conocer una composición para uso en métodos de tratamiento de trastornos debidos a la oxidación del residuo 358 de metionina en α_1 -antitripsina. En este método, una cantidad eficaz de MsrA o MetO-encefalina se administra a proteínas α_1 -antitripsina oxidadas. Por ejemplo, el método puede incluir la aplicación de MsrA o MetO-encefalina a la piel de una persona que necesita dicho tratamiento, particularmente en un vehículo que permitirá que Msr o MetO-encefalina se absorban en la piel. El trastorno puede estar en la piel o en tejidos más profundos. En la piel, el trastorno puede ser elastosis o envejecimiento de la piel causado por la descomposición del colágeno.

[0066] Una composición de acuerdo con la presente invención se puede aplicar como parte de un régimen de tratamiento de la piel que incluye otros métodos de la piel beneficiosos. Por ejemplo, la piel se limpia y se trata con tóner, después de lo cual se aplica la composición de la invención. Además, la composición puede ser parte de un kit que comprende, por ejemplo, un limpiador, un tóner, un exfoliante y una composición de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0067]

<110> ELC Management LLC

<120> Péptido sulfóxido de metionina, composiciones y métodos de uso

<130>> 08.57

<150>> US61/168,808

<151> 13 de abril de 2009

<160>> 1

<210>> 1

<211> 5

<212>> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>>

<223> Regulador al alza de MsrA

<220>>

<221> misc_feature

<222> (5)

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y al menos un 0,01% en peso de péptido oxidado
 (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO.
- 10 **2.** La composición de la reivindicación 1, en la que la composición es aproximadamente 1- 99% de agua.
- 10 **3.** La composición de la reivindicación 1 que comprende un protector solar.
- 15 **4.** Una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y al menos un 0,01% en peso del péptido oxidado
 (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO
 para reducir la cantidad de residuos de metionina oxidados en la piel humana, aplicando la composición a la piel que ha oxidado los residuos de metionina.
- 20 **5.** La composición de la reivindicación 4 en donde los residuos de metionina oxidados están en queratinocitos.
- 6.** La composición de la reivindicación 4 en donde los restos de metionina oxidados son residuos de α_1 -antitripsina metionina 358.
- 25 **7.** Una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y al menos un 0,01% en peso del péptido oxidado
 (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO
 para mantener la cantidad de residuos oxidados de metionina en la piel humana mediante
- 30 - aplicar la composición a la piel en riesgo de experimentar la aparición del estrés oxidativo; y, después del paso de aplicar,
 - exponer la piel al riesgo.
- 35 **8.** La composición de la reivindicación 7, en la que el riesgo es la exposición a luz UVA y/o UVB.
- 9.** Un método no terapéutico para reducir uno o más signos de envejecimiento de la piel, que comprende los pasos de:
- 40 - proporcionar una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y al menos un 0,01% en peso del péptido oxidado
 (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO;
- 45 - aplicar la composición, repetidamente, a un área de la piel que manifiesta uno o más signos de envejecimiento de la piel, al menos hasta que se observe una mejora en la piel.
- 50 **10.** El método de la reivindicación 9, en el que las solicitudes repetidas se realizan a lo largo de los días o durante esos años, según un cronograma definido.
- 11.** El método de la reivindicación 9, en el que el uno o más signos de envejecimiento de la piel incluyen arrugas, pérdida de elasticidad de la piel, pérdida de firmeza de la piel, elastosis, degradación del colágeno e hiperpigmentación.
- 55 **12.** Una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y el péptido oxidado
 (SEQ ID NO:1) Y - G - G - F - MO Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO
 o el péptido oxidado y MsrA
 para tratar trastornos de α_1 -antitripsina que comprende la etapa de aumentar los niveles de MsrA en los tejidos afectados por el trastorno mediante la aplicación a la composición, en un vehículo que permitirá que el péptido oxidado se absorba en la piel.
- 60

13. La composición de la reivindicación 12, en la que el trastorno tisular es vitiligo.

14. La composición de la reivindicación 12, en la que el trastorno tisular es enfisema.

5 15. Una composición que comprende una base cosmética o farmacéuticamente aceptable y el péptido oxidado

(SEQ ID NO: 1) Y - G - G - F - M-O Tyr - Gly - Gly - Phe - MetO

para regular al alza MsrA en tejidos humanos aplicando al tejido la composición capaz de penetrar el estrato córneo.

10

16. La composición de la reivindicación 15, en la que la regulación positiva ocurre en los queratinocitos epidérmicos.

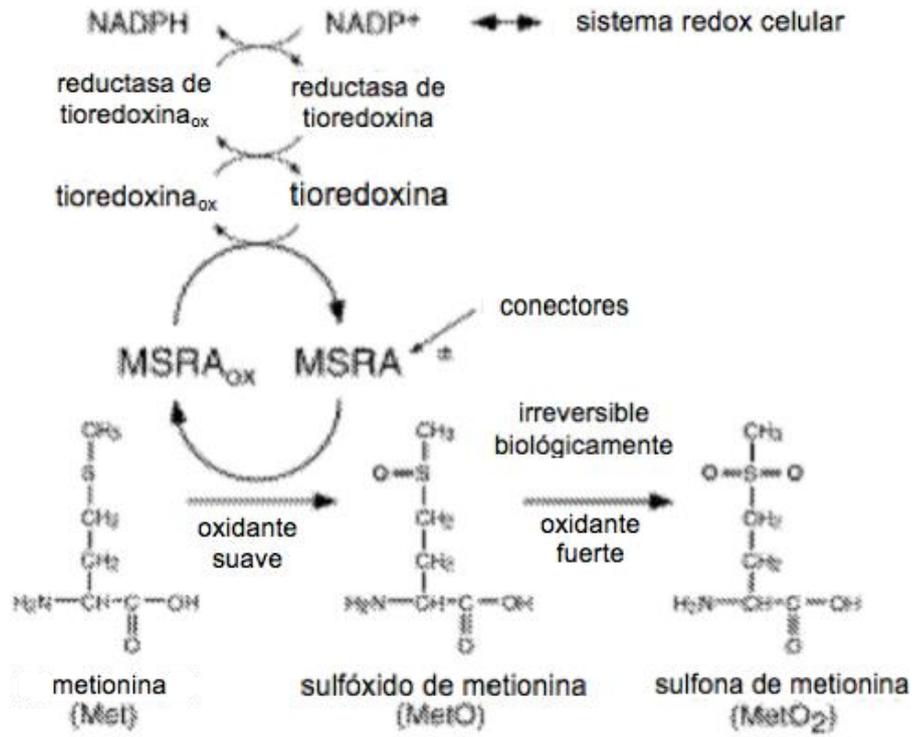


Fig. 1

Inhibición de H₂O₂ endógeno en NHEK por preincubación con Msr (+/- des. est. medio, n = 3)

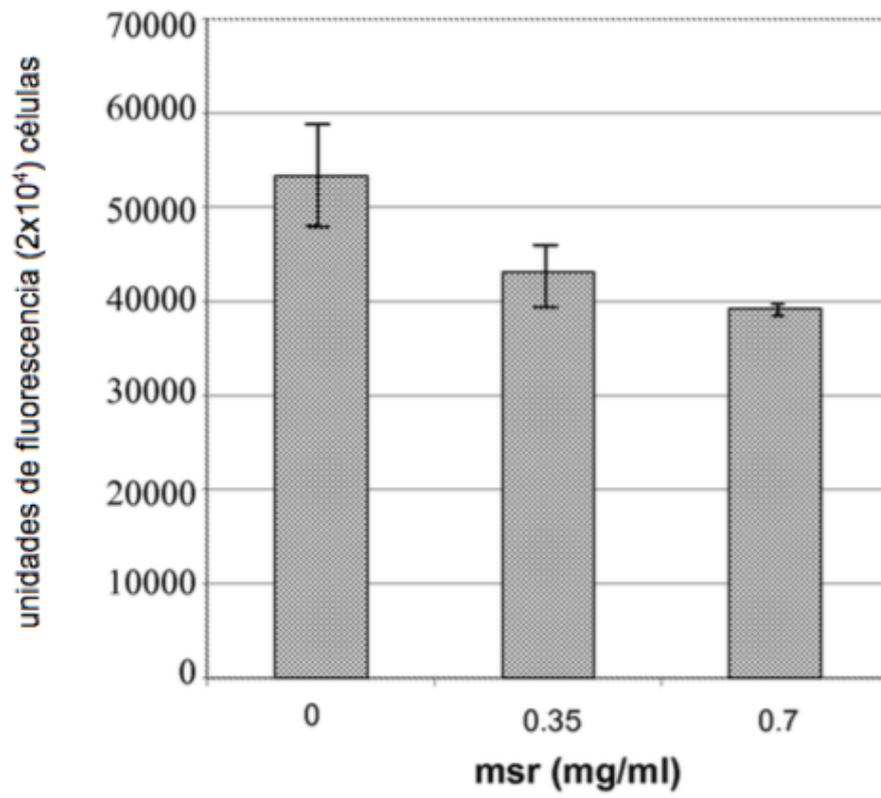


Fig. 2a

Inhibición de H₂O₂ inducido por UVB (20 mJ/cm²) en NHEK por preincubación con Msr (+/- des. est. medio, n = 3)

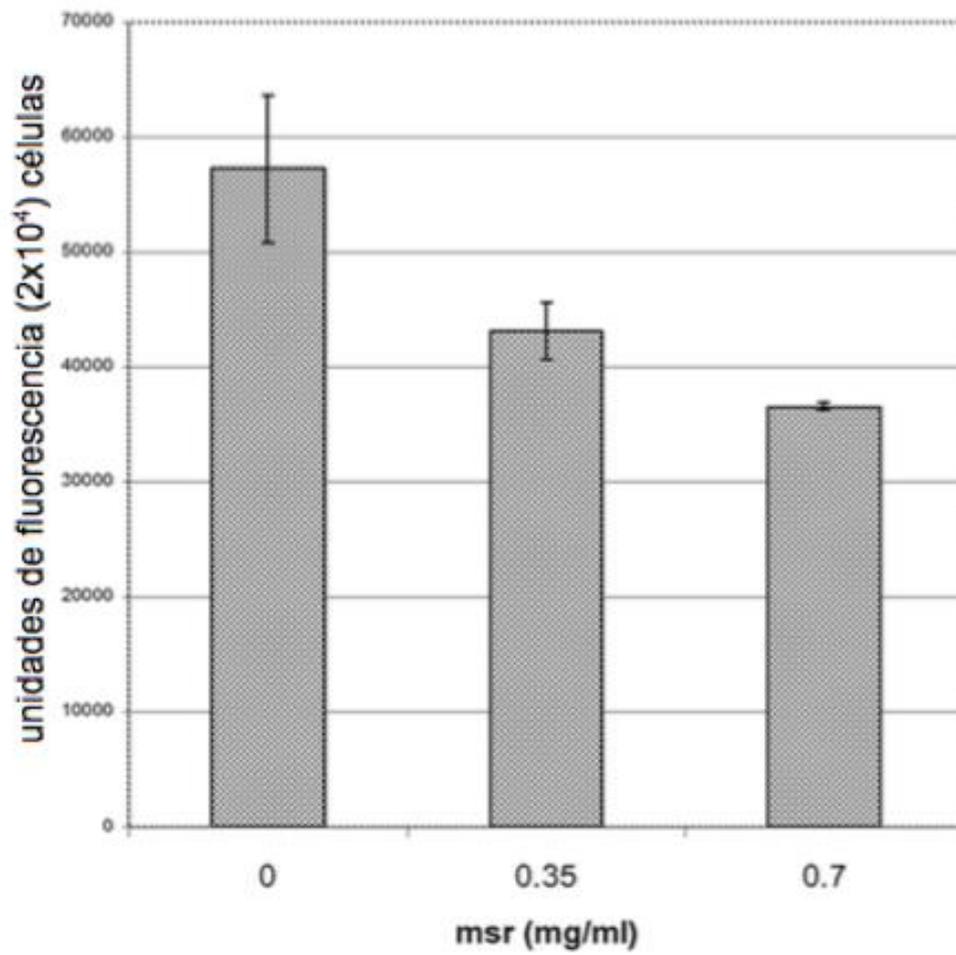


Fig. 2b

Toxicidad celular de queratinocitos tratados con UVB (+/-) MSR pretratamiento (4 h)

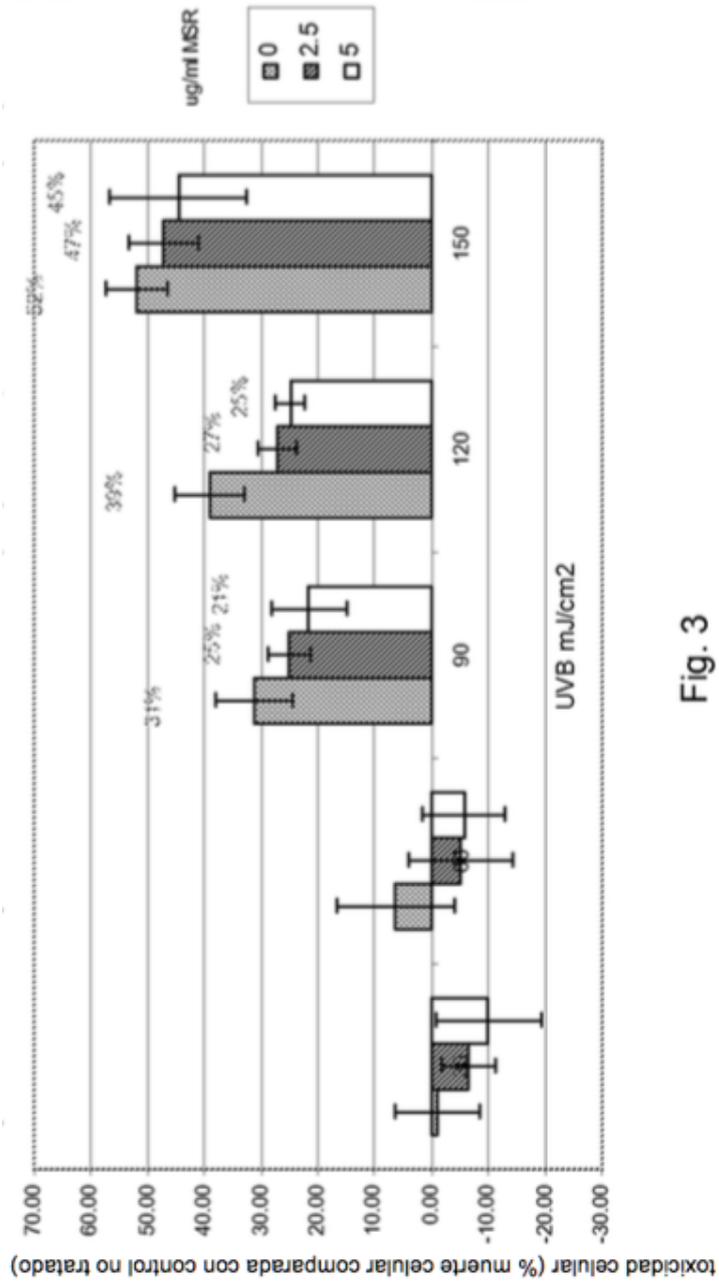


Fig. 3

% Aumentos en expresión de msr (+/- des. est. medio, n = 2) en NHEK

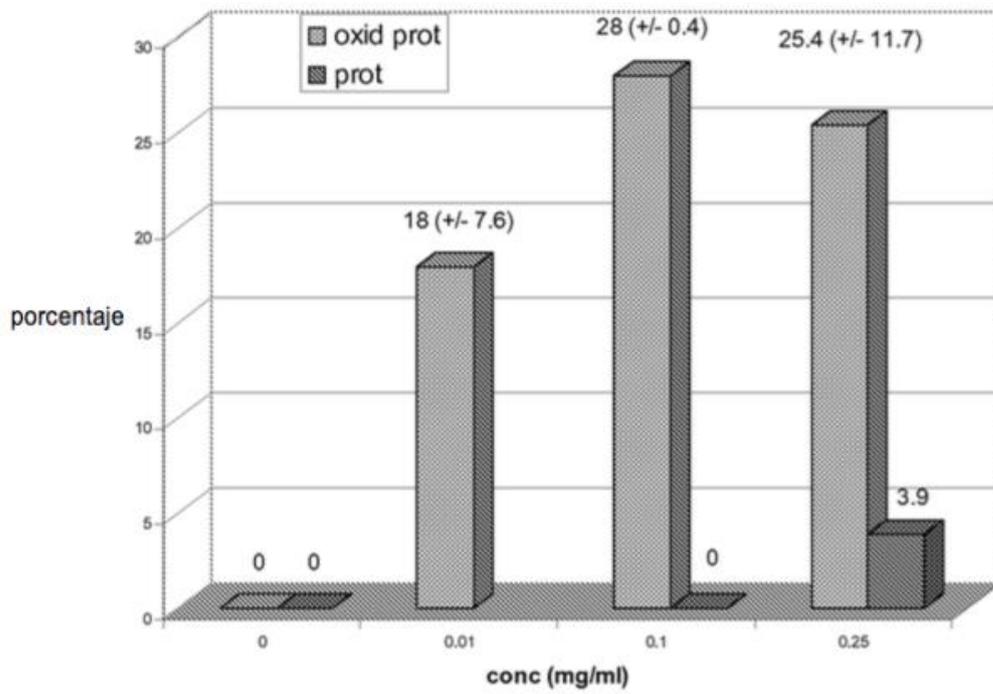


Fig. 4

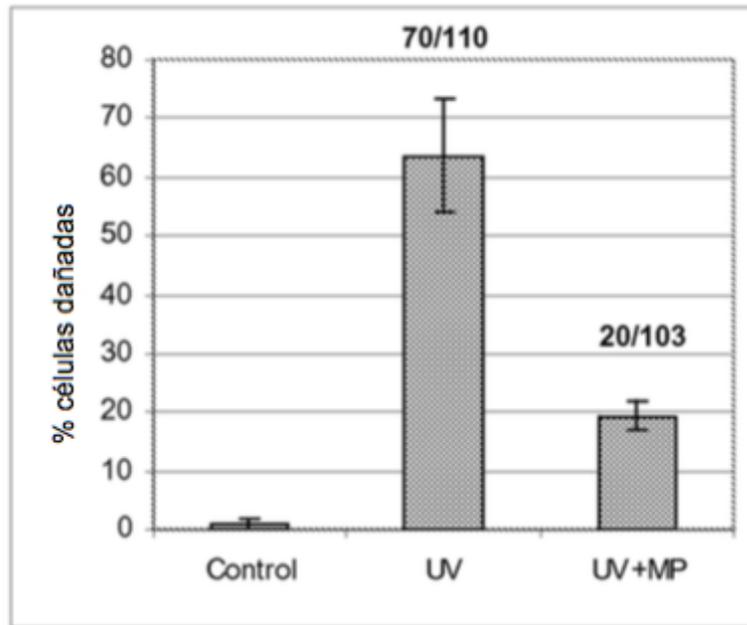


Fig. 5

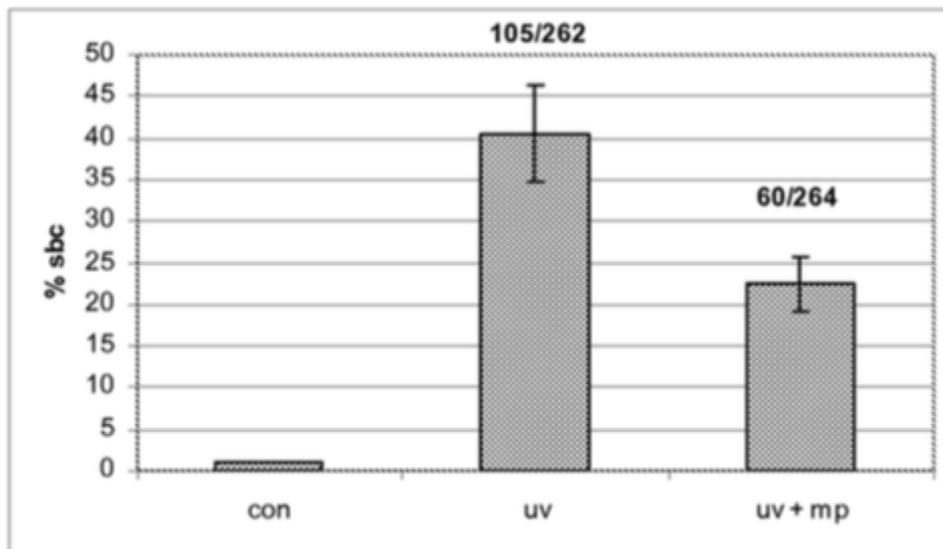


Fig. 6

**Citotoxicidad (MTS) de proteína oxidada en queratinocitos
(+/- des. est. medio, n = 3)**

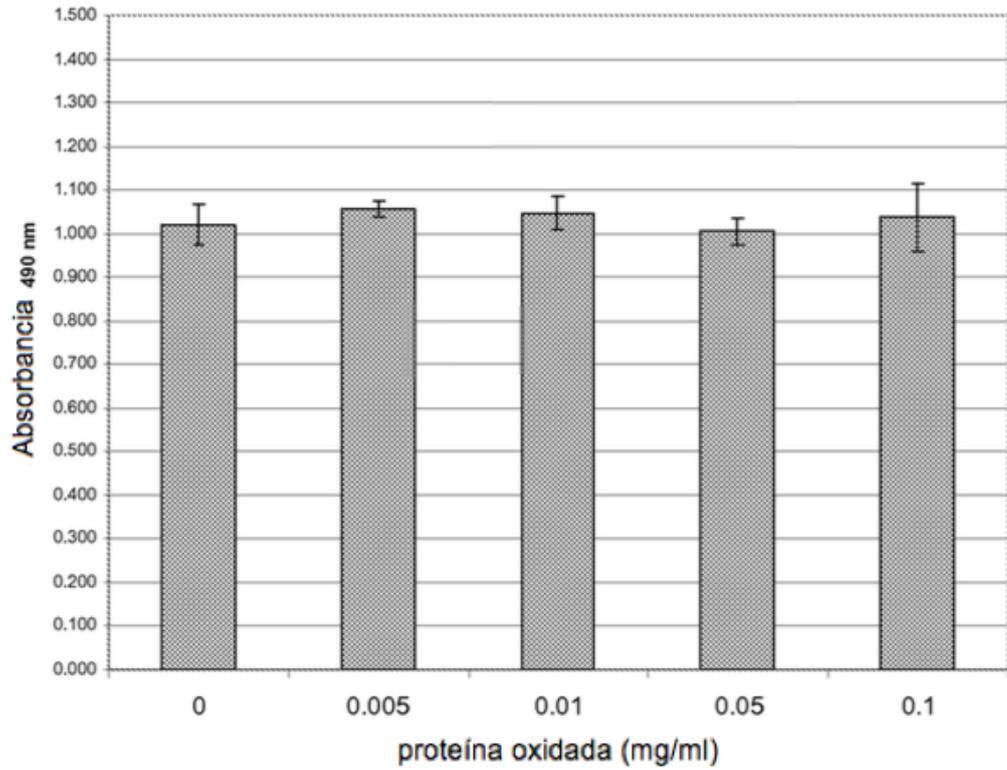


Fig. 7

α_1 -antitripsina inhibe actividad de elastasa

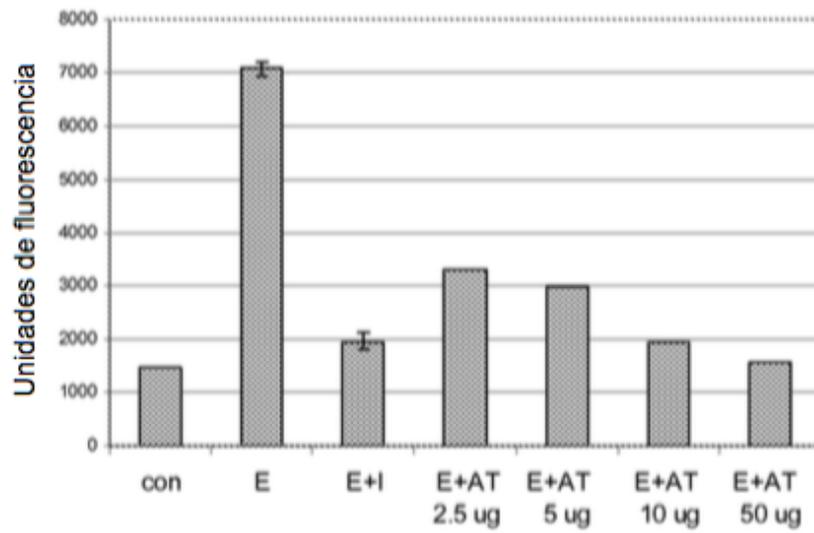


Fig. 8

α_1 -antitripsina oxidada no inhibe elastasa

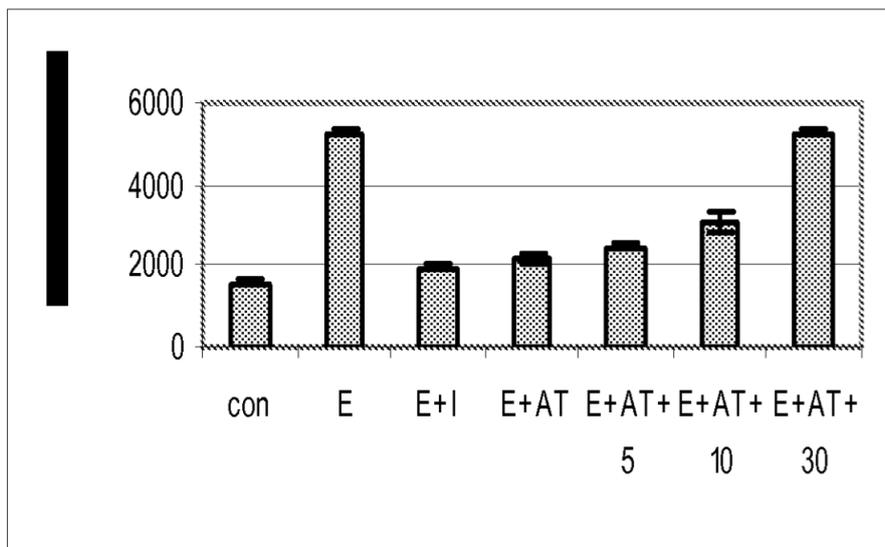


Fig. 9

MsrA repara α_1 -antitripsina oxidada y restaura inhibición de elastasa

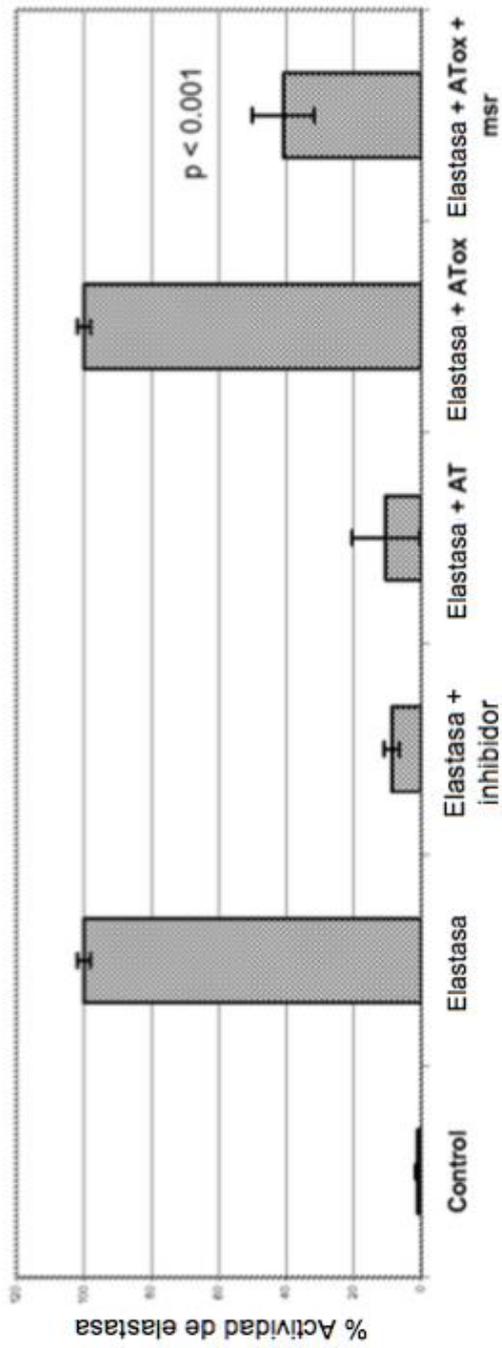


Fig. 10