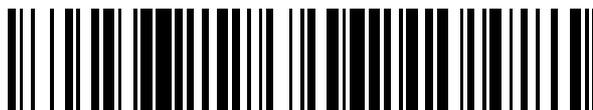


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 433**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2012 PCT/EP2012/056596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140095**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012 E 12713160 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2696844**

54 Título: **Compuestos activadores de las peptidil-arginina deiminasas 1 y/o 3 en la epidermis y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

11.04.2011 FR 1153135

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

01.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DUPLAN, HÉLÈNE;
DAUNES-MARION, SYLVIE;
POIGNY, STÉPHANE;
MECHIN, MARIE-CLAIRE;
SERRE, GUY y
SIMON, MICHEL**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 770 433 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

Compuestos activadores de las peptidil-arginina deiminasa 1 y/o 3 en la epidermis y sus utilizaciones.

5 La presente invención se refiere al campo de las moléculas capaces de activar la peptidil-arginina deiminasa de tipo I (o PAD1) y/o la peptidil-arginina deiminasa de tipo III (o PAD3) incluyendo la acefilina o una de sus sales; y todas las aplicaciones de estas moléculas en los campos de la cosmética y la terapéutica.

10 La presente invención se refiere a la utilización cosmética de la acefilina o una de sus sales como agente hidratante para la piel.

15 La piel está formada por tres compartimentos, la hipodermis, la más profunda, la dermis y la epidermis. Esta última es un epitelio malpigio cornificado que protege al cuerpo de las agresiones mecánicas, químicas y biológicas, impide las pérdidas hídricas limitando la evaporación del agua contenida en la piel y participa en la foto-protección absorbiendo una parte de los rayos ultravioleta. Estas funciones vitales se denominan colectivamente "funciones de barrera epidérmica".

20 La epidermis está constituida mayoritariamente por queratinocitos. Estos proliferan a nivel de la capa basal y después sufren un programa de diferenciación vectorizada para constituir sucesivamente las capas espinosa y después granulosa. Por último, durante la cornificación, mueren y se transforman en corneocitos. La acumulación de corneocitos forma la capa celular más externa de la epidermis, denominada capa córnea o *stratum corneum*. El *stratum corneum* es el responsable principal de las funciones de barrera epidérmica, debido a su resistencia mecánica, a su estanqueidad y a su contenido en péptidos antimicrobianos y en ácido urocánico.

25 Los corneocitos están desprovistos de núcleo y de los demás orgánulos celulares. Están formados por una matriz fibrosa, que contiene principalmente queratinas y filagrina, rodeada por una capa proteica resistente que ha reemplazado a la membrana plasmática, la envuelta córnea. Los corneocitos están unidos unos a los otros por unas estructuras de unión originales, los corneodesmosomas. Durante la descamación, proceso controlado muy finamente por numerosas proteasas y sus inhibidores, los corneocitos más superficiales se sueltan de la piel después de la proteólisis de los corneodesmosomas.

35 Fisiológicamente, la capa córnea contiene de 10 a 15% de agua. Esta hidratación que debe ser mantenida independientemente de las condiciones hídricas exteriores, es esencial para la barrera epidérmica y para la descamación. Permite en efecto la actividad de las enzimas que son numerosas, tanto en el interior (proteasas, transglutaminasas, PAD, etc.) como en el exterior (proteasas, lipasas, glicosidasas, etc.) de los corneocitos. También tiene un efecto plastificante que permite que el *stratum corneum* conserve su elasticidad y su integridad después de un estrés mecánico.

40 Una disminución de la hidratación de la capa córnea, característica de la piel "seca" o xerosis, se manifiesta por una sensación de tirantez, un tacto desagradable, un aspecto escamoso y la aparición de grietas y de escamas persistentes en superficie. A nivel molecular, induce a) una disminución de la degradación de los componentes desmosomales (corneodesmosina, cadherinas desmosomales y proteínas de la placa) y la retención de los corneodesmosomas sobre toda la superficie corneocitaria y esto en toda la altura de la capa córnea, conduciendo a una hiperqueratosis y b) unos cambios en la maduración de los lípidos intercelulares y de las envueltas córneas.

50 La xerosis puede aparecer en cualquier territorio anatómico y en contextos muy variados, por ejemplo en ciertas condiciones climáticas (frío, viento, sequía, paso rápido y repetido por un edificio climatizado en el que el aire es frío y seco, en el exterior donde hace calor y humedad), bajo el efecto de estreses psicológicos y de factores químicos (alcohol, disolventes orgánicos, detergentes, etc.); por ejemplo los lavados repetidos con ciertos jabones) o físicos (radiaciones ultravioletas). También puede aparecer en los recién nacidos como consecuencia del paso repentino de un medio acuoso -el líquido amniótico- al medio aéreo y en los ancianos, en función de la temporada. Pero también puede ser inducida por la exposición al sol.

55 Numerosas enfermedades de la piel se traducen asimismo por una perturbación de la barrera epidérmica y una sequedad de la capa córnea: las ictiosis y en particular la ictiosis vulgar (OMIM 146700), la dermatitis atópica (OMIM 605803), la psoriasis (OMIM 177900).

60 La hidratación de la capa córnea está asegurada por el factor natural de hidratación (FNH) que permite que las capas de corneocitos más externas retengan la humedad oponiéndose a la acción secante del entorno. La composición del FNH que puede representar hasta el 20% del peso seco de la capa córnea se indica a continuación:

	%
Aminoácidos libres y derivados	52,0
(De los cuales ácido pirrolidona carboxílico	12,0)

	%
Lactato	12,0
Azúcares, ácidos orgánicos, péptidos.	8,5
Urea	7,0
Cloruro	6,0
Sodio	5,0
Potasio	4,0
Calcio, magnesio, fosfato	3,5
Amoníaco, ácido úrico, glucosamina	1,5
Citrato, formato	0,5

5 Más del 50% de estos constituyentes corresponden a unos aminoácidos libres y a algunos de sus derivados. En particular, el ácido pirrolidona carboxílico, un derivado espontáneo de la glutamina que puede representar hasta el 12% del FNH, desempeña un papel higroscópico principal. El ácido urocánico, formado a partir de histidina por la histidasa, absorbe por su parte, una parte de la radiación ultravioleta-B.

10 Todos estos aminoácidos proceden directamente de la degradación de la filagrina, proteína básica de 37 kDa, sintetizada por los queratinocitos granulosa en forma de un precursor de gran tamaño (400 kDa), la profilagrina. Esta, componente esencial de los gránulos de queratohialina, está formada por la repetición de 10 a 12 subunidades de filagrina (dependiendo de los individuos), cada una de 327 aminoácidos de longitud y unidas entre ellas por un péptido de unión de 7 aminoácidos. Durante la cornificación, la profilagrina es recortada en subunidades básicas de filagrina. Estas se asocian a los filamentos intermedios de queratinas (K1 y K10) y facilitan su agregación y la formación de la matriz fibrosa intracorneocitaria. Más tarde en la capa córnea, se deimina la filagrina, lo cual provoca su disociación de los filamentos intermedios. Puede entonces ser totalmente degradada por la calpaína I, la caspasa 14 y la bleomicina hidrolasa, lo cual genera los aminoácidos constitutivos del FNH. La deiminación de la filagrina es por lo tanto una etapa indispensable, incluso limitante, para el mantenimiento de la hidratación de la capa córnea y para la función de barrera epidérmica.

20 La deiminación, o citrulinación, es una modificación postraduccional catalizada por una familia de enzimas dependientes del calcio, PAD (E.C.3.5.3.15). Corresponde a la transformación de los residuos arginilo (cargados positivamente) en residuos citrullilo (neutros). Existen cinco isotipos de PAD, codificados por cinco genes distintos (denominados *PADI*), agrupados en el brazo corto del cromosoma 1 humano en el locus 1p35-36. Son las PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 y PAD6. Mientras que PAD2 es ubicua, los otros isotipos se expresan de manera más restringida en función del tejido analizado. En particular, solo las PAD1, PAD2 y PAD3 son detectadas en la epidermis humana normal. En base a argumentos bioquímicos y fisicoquímicos y ya que están co-localizadas con la filagrina en la matriz fibrosa intracorneocitaria, se ha demostrado que PAD1 y PAD3 son los isotipos responsables de la deiminación de la filagrina. Por lo tanto, son estos isotipos a los que es preciso tener como objetivo si se quiere actuar sobre la producción de aminoácidos del FNH.

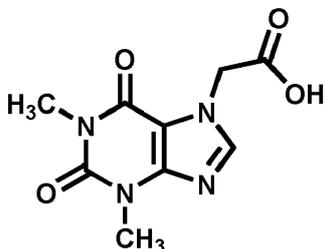
30 La producción del FNH está regulada de hecho a través del catabolismo de la filagrina, dependiendo de la tasa de humedad exterior, según un mecanismo adaptativo. Por ejemplo, durante los últimos días de desarrollo embrionario de la rata, la filagrina se acumula por toda la altura de la capa córnea. Algunas horas después del nacimiento, se proteoliza en la parte externa, según un perfil idéntico al observado en la piel de los adultos. El mantenimiento de las ratas recién nacidas en humedad relativa superior al 80% previene el desencadenamiento de este proceso de degradación, sin poner en peligro la síntesis de la proteína. Asimismo, la tasa de los aminoácidos libres y la conductancia en la superficie de la piel (reflejos de la hidratación) se restablecen en 3 días cuando se transfieren ratones sin pelo (denominados "hairless") de un entorno húmedo a un entorno normal.

40 Para reducir la sequedad cutánea, mejorar la hidratación de la capa córnea y tratar la xerosis o las ictiosis, se utilizan unas aplicaciones tópicas sobre la piel de formulaciones cosméticas o farmacéuticas que presentan unos activos higroscópicos. Estas formulaciones contienen por ejemplo urea o ácido láctico, otros componentes del FNH. De manera general, los hidroxiácidos se han convertido en una de las clases más importantes de compuestos para la industria cosmética, a causa de sus propiedades hidratantes y "anti-edad", pero el hidratante más popular y utilizado más habitualmente es realmente el glicerol.

45 Cualesquiera que sean las formulaciones ya desarrolladas, resulta necesario evidentemente proporcionar nuevos activos útiles para la industria cosmética y/o para la farmacopea para mejorar los síntomas ligados a la sequedad de la piel. El objetivo de la presente invención es justamente favorecer la producción del FNH utilizando nuevos compuestos capaces de actuar sobre los PAD 1 y 3 para favorecer la hidratación natural de la capa córnea. Esto puede encontrar una aplicación particularmente ventajosa en el campo de los productos de cuidado y/o de maquillaje de la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las pestañas, de las cejas, del cabello, del cuero cabelludo o de las uñas; de un producto solar o autobronceador; de un producto capilar en particular de coloración, de acondicionamiento y/o de cuidado del cabello.

55 En efecto, después de importantes investigaciones, el solicitante ha descubierto de manera sorprendente e inesperada que la acefilina o una de sus sales, la cafeína y la teobromina, utilizadas solas o en combinación,

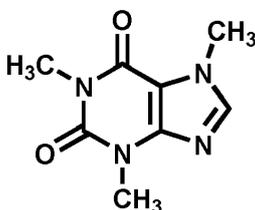
tienen la facultad de aumentar la actividad de los PAD1 y/o PAD3, en particular su capacidad para deiminar su sustrato fisiológico, la filagrina, para favorecer la hidratación natural de la capa córnea. La fórmula química de estas moléculas está precisada a continuación:



5

Aceifilina

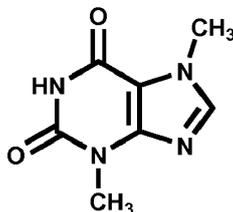
2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-purin-7(6*H*)-il)ácido acético



10

Cafeína

1,3,7-trimetil-1*H*-purina-2,6(3*H*,7*H*)-diona



15

Teobromina

3,7-dimetil-1*H*-purina-2,6(3*H*,7*H*)-diona

Se ha propuesto que la reacción de deiminación se divida en 5 etapas sucesivas:

20

- i) ataque nucleófilo del Cζ de la peptidil-L-arginina por el grupo tiol de la Cys del sitio activo de la enzima;
- ii) formación de enlaces, hidrógenos y salina, entre los Asp del sitio activo y el sustrato;
- iii) corte del enlace entre el Cζ y el Nη2 de la peptidil-L-arginina y liberación de amoníaco;

25

- iv) segundo ataque nucleófilo, esta vez por una molécula de agua, y

- v) hidrólisis del aducto formado al final de la reacción anterior y liberación del producto final de la deiminación, la peptidil-L-citrulina.

30

La presente invención tiene así por objeto la activación, por los activos descritos anteriormente, utilizados solos o en combinación, de una u otra de estas 5 etapas de la reacción catalizada por los PAD1 o 3.

35

El objetivo de la presente invención se refiere por lo tanto a la utilización cosmética de una composición que comprende aceifilina como agente hidratante para la capa córnea de la piel.

Más particularmente, dicha composición está destinada a favorecer la deiminación de la filagrina en la epidermis.

La composición según la presente invención está destinada asimismo a favorecer la producción de FNH (factor

natural de hidratación) en la capa córnea.

Estos activadores de PAD1 y/o PAD3 han sido seleccionados por lo tanto para favorecer la producción del FNH en la capa córnea, así como para su utilización en la hidratación de la epidermis, en particular de la capa córnea.

5 Los activos utilizados en la invención pueden ser de cualquier origen, a saber, aislados de vegetales como el café o el cacao, producidos por unos microorganismos incluso si no son producidos de manera natural por dichos organismos de origen, o también obtenidos por síntesis química.

10 Por "sales de acefilina" se entiende en el sentido de la invención las sales orgánicas o inorgánicas de acefilina.

Como sales orgánicas que se pueden utilizar según la invención, se pueden citar las descritas en la técnica anterior FR 2 639 541. Preferentemente se tratará de la sal de trietanolamina.

15 Como sales inorgánicas de acefilina, se pueden citar las sales de sodio, potasio o litio.

En un modo de realización particular de la invención, la sal de acefilina se forma mediante la adición a la composición que comprende acefilina de una base orgánica o inorgánica como agente neutralizante. Preferentemente la base orgánica es la trietanolamina y la base inorgánica es NaOH.

20 La invención se refiere asimismo a las composiciones cosméticas que contienen acefilina o una de sus sales asociada a la cafeína y/o a la teobromina, en combinación con por lo menos un excipiente cosméticamente aceptable.

25 Esta composición podrá ser preferentemente de origen natural o sintético, más preferentemente sintético.

Preferentemente, la acefilina presente en la composición representará entre 0,5% y 3% en peso, del peso total de la composición en el caso de una composición farmacéutica y entre 0,1% y 1% en peso, del peso total de la composición en el caso de una composición cosmética.

30 El compuesto activador de PAD1 y/o PAD3 utilizado será la acefilina o una de sus sales.

En un modo de realización particular de la invención, la acefilina o una de sus sales está asociada a la cafeína y/o a la teobromina.

35 La acefilina o una de sus sales, dado su efecto activador sobre las enzimas PAD1 y/o PAD3, permitirán un aumento de la degradación de la filagrina en el seno de la capa córnea y por lo tanto de la producción de los aminoácidos que componen el FNH, en particular del ácido pirrolidona carboxílico (PCA) derivado de la glutamina. Un aumento de la cantidad dosificada de este ácido atestigua la actividad hidratante de estos compuestos.

40 Preferentemente, las composiciones según la invención serán administradas por vía tópica.

45 Preferentemente, la composición según la invención comprenderá por lo menos una fase grasa líquida, que puede comprender por lo menos un compuesto seleccionado de entre los aceites y/o disolventes de origen mineral, animal, vegetal o sintético, carbonados, hidrocarbonados, fluorados y/o siliconados, volátiles o no volátiles, solos o en mezcla.

50 La composición según la presente descripción se presentará preferentemente en forma de un producto de cuidado y/o de maquillaje para la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las pestañas, de las cejas, del cabello, del cuero cabelludo o de las uñas; de un producto solar o autobronceador; de un producto capilar en particular de coloración, de acondicionamiento y/o de cuidado del cabello.

55 La utilización cosmética según la invención de la composición podrá permitir la hidratación de la capa córnea; para la mejora de cualquier forma de sequedad cutánea; para el refuerzo de las funciones de barrera de la epidermis.

Por hidratación de la epidermis se entiende la mejora o el mantenimiento del equilibrio en agua de la epidermis.

60 Por mejora de cualquier forma de sequedad cutánea se entiende cualquier mejora de la hidratación de la epidermis caracterizada en particular por una falta de agua en la capa córnea, una película hidrolipídica situada en la superficie demasiado fina y que ya no protege la piel, la falta de sebo

65 Por envejecimiento cutáneo se entiende, además de los efectos sobre la dermis y la pérdida de elasticidad de los tejidos, un debilitamiento de la función de barrera. A pesar de una pérdida insensible de agua poco aumentada, la experiencia clínica ha demostrado que los ancianos sufren más a menudo de sequedad cutánea que las

personas más jóvenes y de buena salud. Esto se explica en primer lugar por una alteración de la barrera lipídica. La barrera epidérmica sería alterada más fácilmente y más lenta de reparar. La técnica de espectroscopia Raman ha permitido demostrar que las capacidades del *stratum corneum* para retener el agua así como la cantidad de FNH disminuyen con la edad, esencialmente en las capas más superficiales.

Los rayos ultravioleta B son una de las causas principales de la aparición de los cánceres de la piel debido a los daños que causan en el ADN y por lo tanto a su importante poder mutágeno. Una gran parte de ellos es absorbida por la melanina, pero la primera barrera fotoprotectora está asegurada por un componente del FNH cuya tasa media es de aproximadamente 5 µg/cm² de piel, el ácido transurocánico. Es una pantalla solar natural relativamente eficaz que ha sido añadido a numerosos productos cosméticos en los años setenta y ochenta. En el *stratum corneum*, el ácido transurocánico se deriva, como la mayoría de los aminoácidos del FNH, del catabolismo de la filagrina.

La presente descripción divulga también la utilización cosmética de los activos descritos anteriormente, utilizados solos o en combinaciones, para la hidratación de la epidermis que prevé favorecer la producción natural de ácido transurocánico.

En el marco de la presente invención, diversos métodos de análisis bioquímicos han permitido seleccionar algunas moléculas moduladoras de la actividad catalítica de PAD1 y PAD3 con respecto a su capacidad particular para deiminar la filagrina. Estos resultados están ilustrados en los dibujos adjuntos, que representan:

Figura 1: análisis de las proteínas recombinantes purificadas.

Después de la purificación, PAD1, PAD3 y la filagrina humana recombinante (Fil-His) han sido separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS), coloreadas con azul de Coomassie o inmunodetectadas, como se ha indicado. AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina detecta la Fil-His no deiminada hacia 45 kDa. Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa.

Figura 2: cinética de deiminación de la filagrina humana recombinante (Fil-His) por PAD1.

Después de la incubación con PAD1, la Fil-His ha sido inmunodetectada por AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina. La masa molecular aparente está indicada a la izquierda en kDa y los tiempos de incubación están indicados en minutos (min) por encima de la ilustración. Se observa que la deiminación de la Fil-His por PAD1 induce un cambio progresivo de su migración de 45 hacia 66 kDa.

Figura 3: deiminación de la filagrina humana recombinante (Fil-His) por PAD1 en presencia o en ausencia de estreptomina.

Después de la incubación con PAD1, en presencia de 5 mM de estreptomina (str) o en presencia de 1% de dimetilsulfóxido (d), el disolvente, la Fil-His ha sido inmunodetectada por AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina o por AMC, un anticuerpo anti-citrulina, como se ha indicado. Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa y los tiempos de incubación están indicados en minutos (min) por encima de la ilustración. Se observa que PAD1 es inhibida por la estreptomina ya que la intensidad de inmunodetección por AMC es más baja cuando la incubación ha tenido lugar en presencia de esta molécula con respecto a una incubación realizada en presencia del disolvente solo.

Figura 4: deiminación de la filagrina humana recombinante (Fil-His) por PAD1 en presencia o en ausencia de cafeína.

Después de la incubación con PAD1, en presencia de 50 µM de cafeína (caf) o en presencia de 1% de dimetilsulfóxido (d), el disolvente, la Fil-His ha sido inmunodetectada por AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina o por AMC, un anticuerpo anti-citrulina, como se ha indicado. Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa y los tiempos de incubación están indicados en minutos (min) por encima de la ilustración. Se observa que PAD1 es activada por la cafeína ya que Fil-His se deimina mucho más en presencia de esta molécula que en presencia del disolvente solo.

Figura 5: deiminación de la filagrina humana recombinante (Fil-His) por PAD3 en presencia o en ausencia de teobromina.

Después de la incubación con PAD3, en presencia de 200 µM de teobromina (teo) o en presencia de 1% de dimetilsulfóxido (d), el disolvente, la Fil-His ha sido inmunodetectada por AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina o por AMC, un anticuerpo anti-citrulina, como se ha indicado. Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa y los tiempos de incubación están indicados en minutos (min) por encima de la ilustración. Se observa que PAD3 es activada por la teobromina.

Figura 6: deiminación de la filagrina humana recombinante (Fil-His) por PAD3 en presencia o en ausencia de acefilina.

Después de la incubación con PAD3, en presencia de acefilina (ace) a la concentración final de 50 μM (parte de arriba) o 200 μM (parte de abajo), o en presencia de 1% de dimetilsulfóxido (d), el disolvente, la Fil-His ha sido inmunodetectada por AHF11, un anticuerpo monoclonal anti-filagrina o por AMC, un anticuerpo anti-citrulina, como se ha indicado. Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa y los tiempos de incubación están indicados en minutos (min) por encima de las ilustraciones. Se observa que PAD3 es activada por la acefilina (visible sobre todo en la concentración más alta).

Figura 7: deiminación de la filagrina humana recombinante por PAD1 o PAD3 en presencia de cafeína, teobromina y/o acefilina, solas o en combinación.

La Fil-His ha sido incubada en presencia de PAD1 durante 5 minutos (A-B) o en presencia de PAD3 durante 60 minutos (C-D). Antes de la incubación, se añadieron a la mezcla de reacción 312,5 μM de cafeína (Caf), de acefilina (Ace) o de teobromina (Teo) a la mezcla de reacción, solas (A y C) o en combinación (B y D), como se ha indicado. Después de la incubación, la Fil-His ha sido inmunodetectada por el anticuerpo anti-citrulina (AMC) y se cuantificó la intensidad de inmunodetección con la ayuda del programa ImageJ. Los datos se indican en forma de histogramas en porcentaje relativo de la actividad de cada enzima con respecto a los controles (-) realizados en ausencia de activo.

Figura 8: PAD1, PAD3 y proteínas deiminadas analizadas por inmunohistología en cortes de piel humana normal o de piel de pacientes que padecen dermatitis atópica.

Las proteínas deiminadas han sido inmunodetectadas con el anti-citrulina (AMC) después de la modificación química de las citrulinas. El control negativo (Neg) ha sido realizado en paralelo. PAD1 y PAD3 han sido inmunodetectadas con los anticuerpos anti-PAD1 y anti-PAD3 como se ha descrito anteriormente (ejemplo 3). Se presentan [barra = 150 μm] unas imágenes representativas de los resultados obtenidos para ocho pacientes (DA1, 2 y 3) y tres controles (Nor1).

Figura 9: análisis por Western de las proteínas deiminadas tras la aplicación tópica de acefilina en forma de sal de trietanolamina o de sal de sodio, en la superficie de las epidermis reconstruidas.

Unas epidermis reconstruidas han sido tratadas por vía tópica durante 24 horas con un gel de control (1) o un gel que contiene acefilina en la concentración de 3% (2 y 3) en forma de sales de trietanolamina (2) o de sales de sodio (3).

A. Se separaron por electroforesis las proteínas totales y se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-citrulina (AMC) y un anticuerpo anti-actina. El experimento se realizó por triplicado (I, II y III). Las masas moleculares aparentes están indicadas a la izquierda en kDa.

B. La intensidad de inmunodetección se cuantificó con la ayuda del programa ImageJ. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a la actina. Están indicados en forma de histogramas en porcentaje relativo con respecto a los controles realizados en ausencia de acefilina.

Se observa que, con respecto a las epidermis tratadas con el gel de control, la intensidad de inmunodetección de las proteínas citrulinadas es más importante para las epidermis tratadas con el gel que contiene acefilina en forma de sales.

Figura 10: análisis por inmunohistología de las proteínas deiminadas tras la aplicación tópica de acefilina en forma de sal de sodio en la superficie de las epidermis reconstruidas.

Se analizaron en inmunohistología con el anticuerpo anti-citrulina (AMC) con (A-C) o sin (D-F; controles negativos) modificación de las citrulinas [Barra = 150 μm] unos criocortes de piel normal no tratada (A y D) y de epidermis reconstruidas tratados por vía tópica durante 24 horas con un gel de control (B y E) o un gel que contiene acefilina a la concentración de 3% en forma de sales de sodio (C y F). Se observa un aumento de la intensidad de marcado de la capa córnea de la epidermis reconstruida tratada con la acefilina en forma de sal de sodio (C) con respecto a la epidermis reconstruida tratada con el gel de control (B).

Evaluación farmacológica (ejemplos comparativos)

A/ Medición de la actividad de PAD1 y/o PAD3 con la ayuda de filagrina humana recombinante

Métodos:

1. Producción y purificación de filagrina humana recombinante

Se produjo una subunidad de filagrina humana recombinante de 324 aminoácidos (número de acceso a la base

de datos "GenBank": AF043380) en fusión con una etiqueta de 6 histidinas en COOH-terminal con la ayuda del vector pET-41b (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) en la cepa *Escherichia coli* BL21 Codon plus (DE3+)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA).

5 Para ello, el ADNc ha sido amplificado en primer lugar por PCR con la ayuda del par de oligonucleótidos siguiente:

5'-CATATGCTATAACCAGGTGAGCACTCATG-3' y
5'-CTCGAGCCCTGAACGTCCAGACCGTCC-3',

10 a partir de ARNm extraídos de epidermis humana, y después purificado y clonado en el vector pCR11-Topo (Invitrogen, Carlsbad, CA).

15 El producto de PCR estaba así flanqueado por un sitio NdeI y por un sitio XhoI, permitiendo estos 2 sitios de restricciones adicionales la subclonación orientada desde el vector pCR11-Topo al vector de expresión pET-41b. Después de la verificación por secuenciación, se produjo la subunidad de filagrina, denominada a continuación Fil-His, y se purificó por cromatografía de afinidad sobre níquel según un protocolo muy conocido por el experto en la materia. Se analizó mediante PAGE-SDS (gel al 10%) la proteína recombinante Fil-His así purificada, y se inmunodetectó con el anticuerpo monoclonal anti-filagrina AHF11. El grado de pureza se controló por coloración con azul de Coomassie, presentando la proteína Fil-His un peso molecular aparente de aproximadamente 45 kDa (véase la figura 1). Se midió (en mg/ml) la concentración de la fracción purificada obtenida con la ayuda de un NanoDrop 1000 (Fisher Scientific, Illkirch, Francia) utilizando una gama estándar de albúmina de suero bovino.

25 2. Producción de PAD1 y PAD3 humanas recombinantes activas

Se compraron al profesor Hidenari Takahara (Universidad de Ibaraki, Japón) las PAD1 y PAD3 producidas y purificadas según los protocolos muy conocidos por el experto en la materia. Las características de dichas PAD1 y PAD3 recombinantes humanas activas purificadas se recuerdan en la tabla siguiente:

PAD	Actividad * (unidad/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Actividad específica (unidad/mg)
PAD1	206,0	0,696	296,0
PAD3	10,2	0,400	25,5

* una unidad se define como la cantidad de PAD que cataliza la formación de 1 μ mol de Bz-L-Cit-O-Et a partir de Bz-L-Arg-O-Et en 1 h a 55°C.

Se controló el grado de pureza de cada enzima por coloración con azul de Coomassie tras separación por PAGE-SDS (véase la figura 1).

35 3. Deiminación de Fil-His por las PAD1 y PAD3

Se incubaron veinticinco ng de Fil-His a 50°C en presencia de 40 mU de PAD1 o de PAD3 en el tampón de deiminación (CaCl₂ 10 mM, ditiotreitol 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Después de un tiempo de incubación variable según la isoforma de PAD (generalmente de 2 a 5 minutos para PAD1 y de 60 a 180 minutos para PAD3), la reacción se detuvo por adición de tampón de muestra. Se separaron a continuación las proteínas por PAGE-SDS y se inmunodetectaron con el anticuerpo monoclonal anti-filagrina AHF11 y el anticuerpo anti-citrulina modificado AMC (Millipore, Molsheim, Francia) diluidos a 1/5000.

Resultados:

45 1. Evaluación de la deiminación de la Fil-His

Cuando la Fil-His no es deiminada, su masa molecular aparente en gel desnaturante es del orden de 45 kDa. Migra en forma de una banda proteica única tras la coloración con azul de Coomassie o tras la inmunodetección con el anticuerpo AHF11 (véase la figura 1). La deiminación de la Fil-His induce un aumento progresivo de su masa molecular aparente de 45 a ~66 kDa (véase la figura 2). La forma de ~66 kDa corresponde a la forma totalmente deiminada, correspondiendo las formas intermedias a unas formas más o menos deiminadas. El grado de deiminación de la Fil-His está correlacionado por lo tanto con su masa molecular aparente después de la separación por PAGE-SDS.

55 La Fil-His es inmunodetectada por el anticuerpo AMC únicamente después de la incubación con una PAD activa. La intensidad de inmunodetección es tanto más importante por cuanto que se deimina mucho más (véase la figura 3).

60 2. La estreptomicina inhibe la PAD1

Un cambio en la migración de la filagrina y/o un cambio de la intensidad de inmunodetección por el anticuerpo AMC permiten evaluar el efecto (activador o inhibidor) en las PAD de una molécula añadida a la mezcla de reacción antes del inicio de la reacción de deiminación. La inhibición de PAD1 por la estreptomina por ejemplo, se ha podido demostrar mediante este método (véase la figura 3). La intensidad de inmunodetección por el anticuerpo AMC de las bandas cuya masa es o bien de ~66 kDa, o bien está comprendida entre 45 y ~60 kDa, es más baja cuando la Fil-His es incubada durante 3 o 5 minutos con PAD1 en presencia de 5 mM de estreptomina, en comparación con una incubación exactamente idéntica, en presencia del disolvente solo (1% de dimetilsulfóxido).

10 B/ Activadores de PAD1 y/o de PAD3

Método:

Deiminación de la Fil-His por la PAD1 o la PAD3 en presencia de un activo o de una combinación de activos

La deiminación de la Fil-His (25 ng) ha sido realizada como se ha descrito anteriormente (párrafo A.3), en el tampón de deiminación (CaCl₂ 10 mM, ditioneitol 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) a 50°C en presencia de 40 mU de PAD1 o PAD3, durante 0, 3, 5, 60 y 180 minutos. El activo en solución en 1% de dimetilsulfóxido para obtener una concentración final de 50, 200 y 312,5 µM, o 1% de dimetilsulfóxido solo (control) o una mezcla de varios activos diluidos cada uno a 312,5 µM en 1% de dimetilsulfóxido son añadidos a la mezcla de reacción antes de la adición de la enzima. En algunos casos, los activos han sido diluidos en agua. Después de la incubación las proteínas de la mezcla de reacción han sido inmunodetectadas con el anticuerpo AMC. La intensidad de inmunodetección ha sido cuantificada por densitometría con el programa NIH ImageJ.

25 Resultados:

1. Activación de la PAD1 por la cafeína

Antes de la deiminación, la Fil-His es inmunodetectada por el anticuerpo AHF11 como una banda de aproximadamente 45 kDa pero no es detectada por el anticuerpo AMC (véase la figura 4). Después de 3 y 5 minutos de incubación en presencia de PAD1 y de dimetilsulfóxido (1% final), la Fil-His es deiminada parcialmente por PAD1: es inmunodetectada entonces por el anticuerpo AMC como una banda ancha de tamaño comprendido entre 45 y ~60 kDa. Después de 3 y 5 minutos de incubación en presencia de PAD1 y de cafeína (50 µM final en 1% de dimetilsulfóxido), la intensidad de inmunodetección de esta banda ancha es más importante y una banda suplementaria, que migra hacia ~66 kDa, es detectada por el anticuerpo AMC (véase la figura 4). Esta proteína de ~66 kDa corresponde a Fil-His completamente deiminada. Un análisis cuantitativo ha confirmado este resultado y muestra un aumento de 151% de la intensidad de inmunodetección de las bandas entre 45 y ~66 kDa después de la incubación en presencia de cafeína, en comparación con el control.

Se han obtenido unos resultados comparables en ensayos realizados con cafeína solubilizada y diluida en agua ultrapura.

La cafeína activa por lo tanto la PAD1.

45 2. Activación de la PAD3 por la teobromina

Antes de la deiminación, la Fil-His presenta una masa aparente de aproximadamente 45 kDa; es inmunodetectada por el anticuerpo AHF11 pero no por el anticuerpo AMC (véase la figura 5). Después de 180 minutos de incubación en presencia de PAD3 y de dimetilsulfóxido (1%), es deiminada parcialmente por PAD3: es inmunodetectada entonces por el anticuerpo AMC como una banda ancha de tamaño comprendido entre 45 y ~66 kDa. Después de 180 minutos de incubación en presencia de PAD3 y de teobromina (200 µM en 1% de dimetilsulfóxido), la intensidad de las bandas inmunodetectadas por el anticuerpo AMC es más importante (véase la figura 5). La cuantificación de la intensidad de inmunodetección ha mostrado un aumento de 182%.

Se han obtenido unos resultados comparables en ensayos realizados con teobromina solubilizada y diluida en agua ultrapura.

La teobromina activa por lo tanto la PAD3.

60 3. Activación de la PAD3 por la acefilina

Antes de la deiminación, la Fil-His es inmunodetectada por el anticuerpo AHF11 hacia 45 kDa pero no es detectada por el anticuerpo AMC (véase la figura 6). Después de 180 minutos de incubación en presencia de PAD3 y de dimetilsulfóxido (1%), la Fil-His es deiminada parcialmente por PAD1: es inmunodetectada entonces por el anticuerpo AMC como una banda ancha de tamaño comprendido entre 45 y ~60 kDa y una banda de ~66 kDa. Después de 180 minutos de incubación en presencia de PAD3 y de acefilina (200 µM en 1% de

dimetilsulfóxido), la intensidad de las bandas inmunodetectadas por el anticuerpo AMC es claramente más intensa (véase la figura 6). La cuantificación de la intensidad de inmunodetección ha confirmado este resultado y muestra un aumento de 225%.

- 5 Se han obtenido unos resultados comparables en los ensayos realizados con acefilina solubilizada y diluida en agua ultrapura.

La acefilina activa por lo tanto la PAD3.

- 10 4. Evaluación del efecto de una mezcla de cafeína, teobromina y/o acefilina sobre la actividad de las PAD1 y PAD3

15 Se han realizado unos ensayos similares de deiminación de la Fil-His por PAD1 (incubaciones de 5 minutos) y PAD3 (incubaciones de 60 minutos) en presencia de cada uno de los tres activos (cafeína, teobromina y acefilina) o de una mezcla de dos o tres de estos activos. Los activos se solubilizaron y después se diluyeron en agua ultrapura. Se utilizaron a la concentración final de 312,5 μ M en la prueba. La intensidad de inmunodetección por el anticuerpo AMC se cuantificó como anteriormente (véase la figura 7).

20 Los resultados obtenidos han confirmado la activación de PAD1 por la cafeína y la de PAD3 por la teobromina y la acefilina. Han demostrado además que los tres activos utilizados individualmente activan PAD1 y PAD3, con unos niveles de activación comparables (véanse las figuras 7A y 7C).

25 La adición de los activos en combinación de dos en dos o los tres juntos no ha inducido ningún efecto inhibitor. Se ha observado el mismo nivel de activación de PAD1 (véase la figura 7B). La adición de dos o tres activos parece incluso activar la PAD3 de manera más marcada (véase la figura 7D).

La cafeína, la teobromina y la acefilina utilizadas solas o en combinación activan por lo tanto la PAD1 y la PAD3.

- 30 C/ Disminución de la detección de las proteínas deiminadas de la capa córnea de la epidermis lesional de la piel de los pacientes que padecen dermatitis atópica (ejemplo ilustrativo)

Métodos:

- 35 1. Cortes de piel

40 Se efectuaron unas biopsias de 3 mm de diámetro en piel lesional de 8 pacientes que padecen dermatitis atópica (diagnóstico realizado por un médico del Service de Dermatologie des Hôpitaux de Toulouse) y en piel sana de 3 controles, fijadas con formol e incluidas en parafina. Se realizaron unos cortes en serie (6 μ m) para cada biopsia, se dispusieron sobre unos portaobjetos Superfrost, se desparafinaron mediante unos baños sucesivos de xileno y de etanol y después se rehidrataron y se colorearon con hematoxilina-eosina o se analizaron por inmunohistología.

2. Detección de las proteínas deiminadas por inmunohistología

45 Para inmunodetectar las proteínas deiminadas, los cortes de piel se incubaron durante 3 horas a 37°C en el tampón de modificación: 0,0125% de FeCl₃, 2,3 M de H₂SO₄, 1,5 M de H₃PO₄, 0,25% de diacetil monoxima y 0,125% de antipirina. Se realizaron unos controles negativos sistemáticamente omitiendo la diacetil monoxima y la antipirina. Después del lavado con agua, los cortes se incubaron con el anticuerpo de referencia AMC diluido a 1/500^a y después se revelaron con el equipo "Impress Reagent anti rabbit Ig PO" según las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, CA) en presencia de diamino-bencidina como sustrato cromógeno de la peroxidasa. Por último, se realizó una contracoloración con hematoxilina.

3. Detección de las PAD1 y PAD3 por inmunohistología

55 Las PAD1 y PAD3 han sido inmunodetectadas con la ayuda de los los anticuerpos anti-péptidos específicos anti-PAD1 y anti-PAD3(B3) utilizados respectivamente a 1/80^a y a 1/100^a, según el protocolo descrito anteriormente. La contracoloración se realizó con hematoxilina. Se realizaron unos controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

- 60 Resultados:

1. Disminución de las proteínas deiminadas en la epidermis de pacientes que padecen dermatitis atópica

65 Todas las muestras que no han sufrido la modificación química son negativas. Las muestras de piel de los individuos de control presentan un marcado con el anticuerpo AMC muy fuerte y continuo a lo largo de toda la capa córnea y en todas las capas de corneocitos. Por el contrario, las muestras de piel de los pacientes que

padecen dermatitis atópica presentan un marcado de la capa córnea claramente más débil y a menudo discontinuo (véase la figura 8).

5 En conclusión, la deiminación de las proteínas de la epidermis lesional de pacientes que padecen dermatitis atópica disminuye claramente en comparación con los controles sanos.

2. Expresión de las PAD1 y 3 en la epidermis de pacientes que padecen dermatitis atópica

10 Para todas las extracciones de pieles atópicas, la PAD1 es detectada en el citoplasma de los queratinocitos de todas las capas vivas de la epidermis, con una intensidad más fuerte a nivel de los queratinocitos más diferenciados. Se observa el mismo perfil de inmunodetección para las extracciones de pieles normales, como es bien conocido por el experto en la materia. La intensidad del marcado obtenido en las pieles atópicas y normales es la misma.

15 En la epidermis normal, la PAD3 es detectada esencialmente en el citoplasma de los queratinocitos granulosa, como es bien conocido por el experto en la materia. En la epidermis atópica de todos los pacientes, la PAD3 es detectada en el citoplasma de varias capas celulares de los queratinocitos más diferenciados. La intensidad del marcado es a menudo igual a la del marcado de la epidermis normal (véase la figura 8).

20 Las PAD1 y PAD3 están expresadas ampliamente por lo tanto en la epidermis de los pacientes que padecen dermatitis atópica. Por lo tanto, no es una ausencia de estas enzimas lo que explica la disminución de la deiminación de las proteínas observada anteriormente, sino tal vez una actividad más débil.

D/ Aumento de las proteínas deiminadas de la capa córnea tras el tratamiento con un gel que contiene acefilina

25 Métodos:

1. Epidermis reconstruidas

30 Unas epidermis humanas reconstruidas de 0,33 cm² se pusieron en cultivo en la interfaz aire-líquido durante 14 días. Se aplicaron a continuación en su superficie cinco mg/cm² de pre-fórmulas que contenían los diversos activos de manera homogénea con la ayuda de un pincel. Se realizaron unos triplicados durante un tiempo de tratamiento de 24 horas a 37°C. Las epidermis se dividieron entonces: se congeló una mitad en Tissue Tek y después se realizaron unos criocortes de 6 µm de espesor para inmunohistología; la otra mitad se congeló en seco a -80°C para la preparación de extractos proteicos totales antes de un análisis por Western. Las proteínas totales se extrajeron por ebullición en tampón de muestra (0,175 M Tris-HCl pH 6,8; 12,5% de beta-mercaptoetanol, 7,5% de SDS, 25% de glicerol) y se separaron mediante SDS-PAGE, en geles de gradiente de 4-15%

40 2. Detección de las proteínas deiminadas por inmunohistología

45 Las proteínas deiminadas han sido inmunodetectadas como se ha descrito anteriormente después de la incubación en el tampón de modificación. Se realizaron unos controles negativos sistemáticamente omitiendo la modificación. Después del lavado con agua, se incubaron los cortes con el anticuerpo anti-citrulina AMC diluido a 1/1000^a. Por último, se realizó una contracoloración con hematoxilina.

3. Detección de las proteínas deiminadas por Western

50 Los extractos proteicos, clarificados por centrifugación y separados por PAGE-SDS se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-citrulina AMC como se ha descrito anteriormente o con un anticuerpo anti-actina (Millipore, clon MAB1501). Las intensidades de inmunodetección se cuantificaron como se ha descrito anteriormente.

Resultados:

55 1. Aumento de las proteínas deiminadas en las epidermis reconstruidas tratadas con acefilina en forma de sal de trietanolamina o de sal de sodio

60 Se detectan en todos los extractos unas proteínas deiminadas con una masa molar aparente comprendida entre 90 y 30 kDa (véase la figura 9A). Una de entre ellas es la filagrina (flecha). La intensidad de inmunodetección es más importante (aproximadamente 2,5 veces) en las pistas correspondientes a las epidermis tratadas con un gel acuoso que contiene acefilina en forma de sal de trietanolamina o de sal de sodio que en las correspondientes a las epidermis tratadas con el gel acuoso solo (véanse las figuras 9A y 9B).

65 2. Aumento de las proteínas deiminadas en la capa córnea de las epidermis reconstruidas tratadas con acefilina en forma de sal de sodio

Todas las muestras que no han sufrido la modificación química son negativas (véanse las figuras 10D, 10E y 10F). Las muestras de epidermis reconstruidas presentan con el anticuerpo AMC un marcado discontinuo a lo largo de toda la capa córnea. La intensidad de inmunodetección es más fuerte después del tratamiento con la acefilina en forma de sal de sodio (véase la figura 10).

En conclusión, la acefilina en forma de una de sus sales aplicada en un gel acuoso en la superficie de las epidermis reconstruidas aumenta la deiminación de las proteínas de la capa córnea y en particular de la filagrina.

E. Ejemplo de preparación de un gel acuoso que contiene 3% de acefilina en forma de sal de sodio

Nombre INCI	Función	%
Acefilina	Activo	3
Hidróxido de sodio	Base	0.51
Hidroxietilcelulosa	Gelificante	1.5
Fenoxietanol	Conservante	0.7
Agua	Diluyente	94.29
Adición de 2% de agua		

Modo de funcionamiento

Etapa A: en el agua previamente calentada a 70°C, dispersar la acefilina bajo agitación (1300 rpm) + añadir NaOH: 70°C

Etapa B: añadir el fenoxietanol + espolvorear lentamente el natrosol pulverizado bajo agitación (500 rpm) y después aumentar el cizallamiento.

Y después B en A bajo agitación (1300 rpm durante 10 minutos). Enfriar y homogeneizar (1 h a 900 rpm) pH final = 7,16

Observaciones macroscópicas: gel espeso, transparente e incoloro.

Ejemplos de composición

Varias formulaciones en forma de crema tienen las composiciones siguientes (las cantidades se proporcionan en porcentaje másico con respecto al peso total de la composición).

Ventajosamente, las formulaciones presentan entre 0,5 y 3% de acefilina o una de sus sales, estando el porcentaje ajustado en función del poder hidratante deseado.

Ejemplo 1:

Designación	% másico	Función
Acefilina	0,5 a 3	Agente hidratante
Glicerol	15	Humectante
Vaselina	8	Emoliente
Parafina líquida	2	Emoliente
Ácido esteárico	1,5	Emulsionante
Monoestearato de glicerol	5	Emulsionante
Ciclometicona	1,5	Emoliente
Dimeticona	0,5	Emoliente
Polietilenglicol 600	5,0	Humectante
Trietanolamina	QS	Agente neutralizante pH = 6,5
Parahidroxibenzoato de propilo	QS	Conservante
Agua	QSP 100,0	

Ejemplo 2:

Designación	% másico	Función
Acefilina	0,1 a 1	Agente Hidratante
Aceite vegetal	1,5	Emoliente
Cetearil Glucósido/Cetearil alcohol	5,0	Emulsionante
Estearato de glicerilo/PEG-100 estearato	2,5	Emulsionante
Parafina líquida	10,0	Emoliente
Manteca de karité	1,0	Emoliente

ES 2 770 433 T3

Designación	% másico	Función
PPG-15 Esteariléter	6,5	Emoliente
Ciclometicona	6,0	Emoliente
Glicerina 99.5%	7,0	Humectante
Goma xantana	0,1	Gelificante y estabilizante
Poliacrilamida	0,8	Gelificante y estabilizante
Conservantes	QS	Conservante
Butilhidroxitolueno	0,01	Antioxidante
NaOH	QS	Agente neutralizante pH = 6,5
Perfume	QS	Perfume
Agua	QSP 100,0	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización cosmética de una composición que comprende acefilina o una de sus sales como agente que favorece la hidratación de la capa córnea de la piel.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición está destinada a favorecer la deiminación de la filagrina en la epidermis.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición está destinada a favorecer la producción del FNH (factor natural de hidratación) en la capa córnea.
4. Utilización según la reivindicación 1, para mejorar cualquier forma de sequedad cutánea, o para reforzar las funciones de barrera de la epidermis y prevenir los signos de envejecimiento cutáneo.
- 15 5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición está destinada a favorecer la producción natural de ácido transurocánico.
- 20 6. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la acefilina o una de sus sales está asociada a la cafeína y/o a la teobromina.
7. Procedimiento cosmético para hidratar la capa córnea de la piel que comprende la aplicación sobre la piel de una composición cosmética que comprende acefilina o una de sus sales.
- 25 8. Composición cosmética que contiene por lo menos un compuesto activador de PAD1 y/o PAD3 constituido por acefilina o una de sus sales en asociación con cafeína y/o teobromina y por lo menos un excipiente cosméticamente aceptable.
- 30 9. Composición cosmética según la reivindicación 8, caracterizada por que la acefilina o una de sus sales representa entre 0,1% y 1% en peso del peso total de la composición.
- 35 10. Composición según una de las reivindicaciones 8 y 9, caracterizada por que comprende por lo menos una fase grasa líquida que comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre los aceites y/o disolventes de origen mineral, animal, vegetal o sintético, carbonados, hidrocarbonados, fluorados y/o siliconados, volátiles o no volátiles, solos o en mezcla.
- 40 11. Composición según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizada por que se presenta en forma de un producto de cuidado y/o de maquillaje de la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las pestañas, de las cejas, del cabello, del cuero cabelludo o de las uñas; de un producto solar o autobronceador; de un producto capilar en particular de coloración, acondicionamiento y/o de cuidado del cabello.

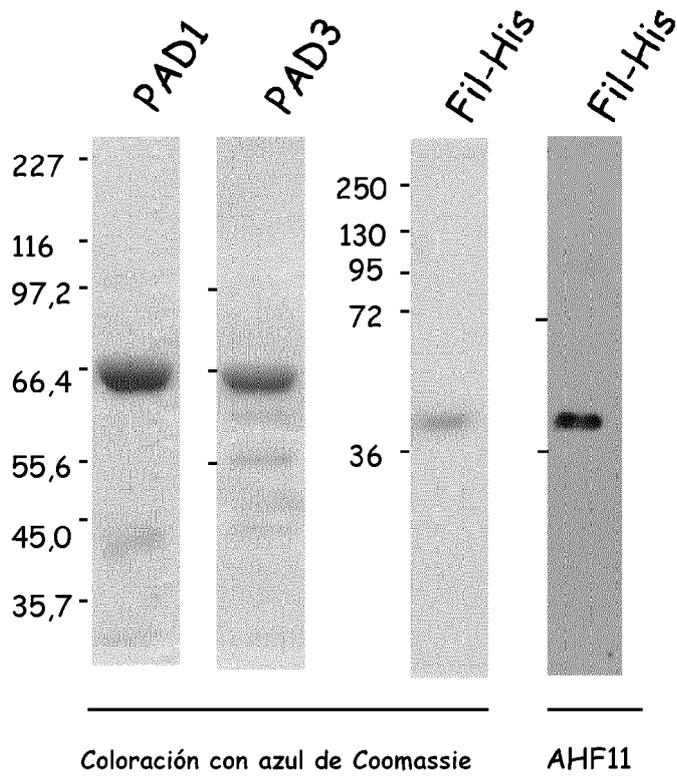


Figura 1

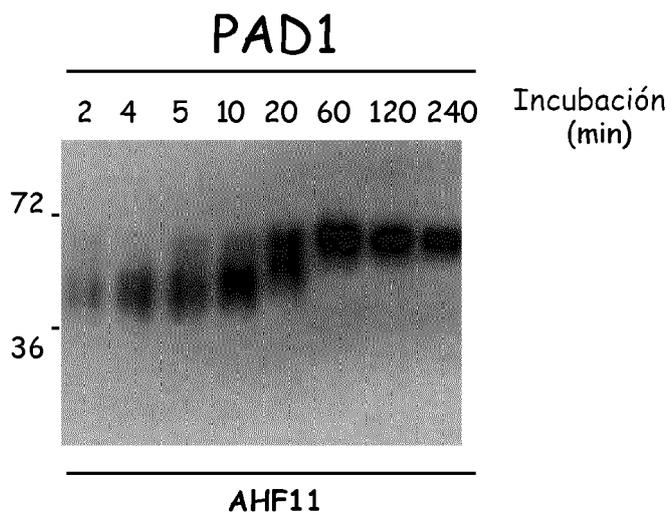


Figura 2

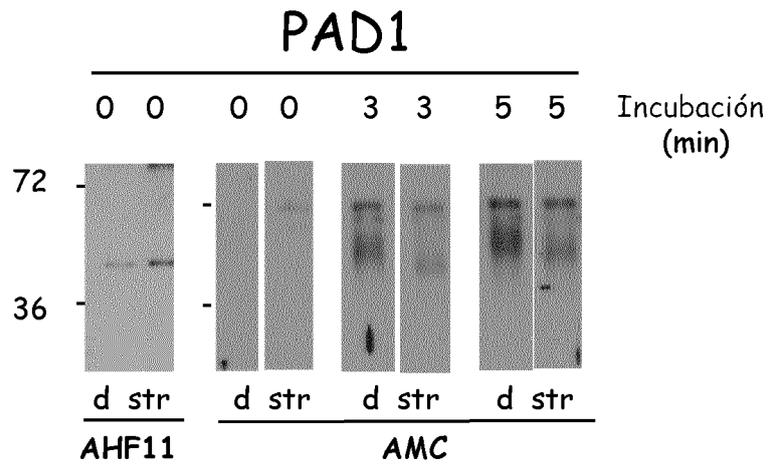


Figura 3

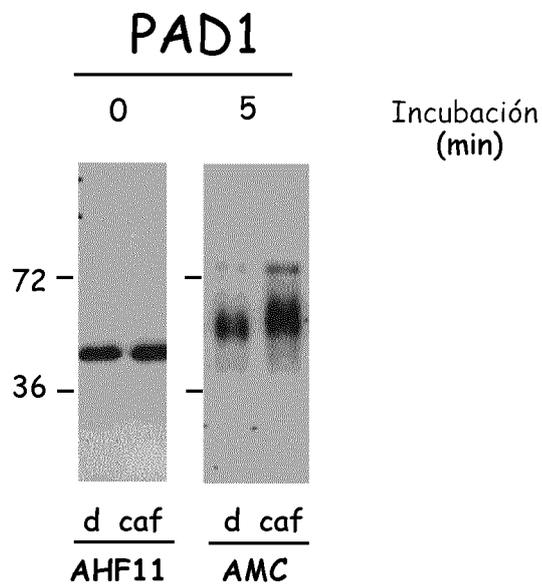


Figura 4

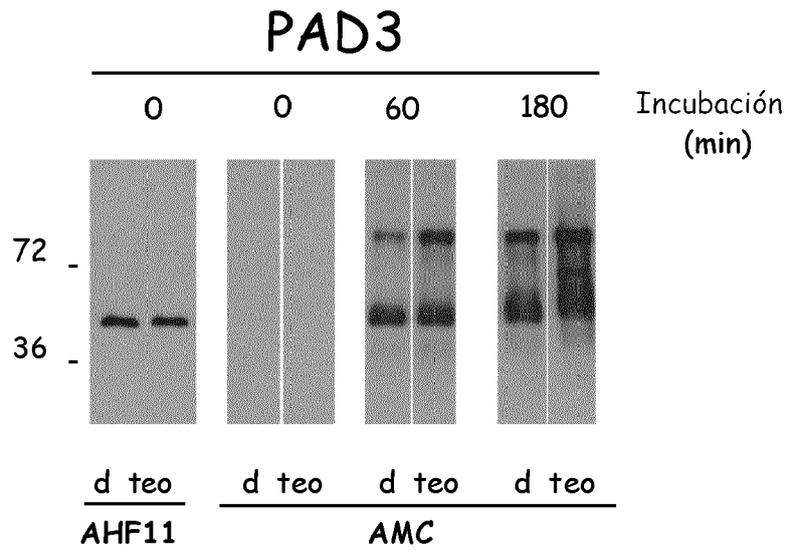


Figura 5

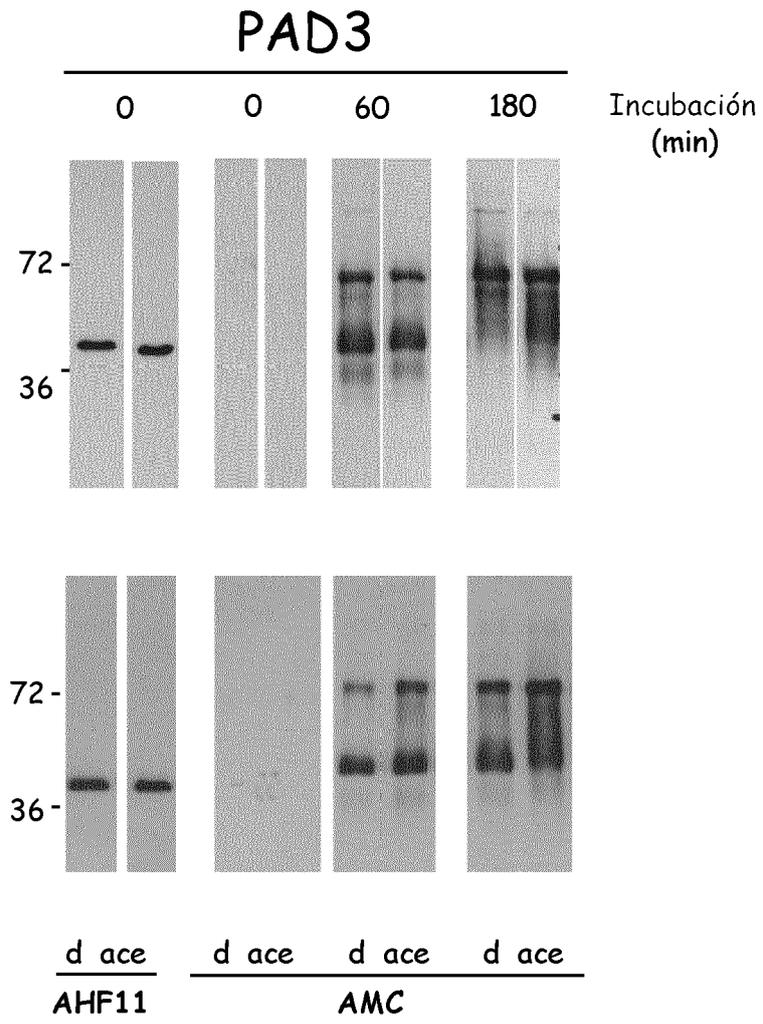


Figura 6

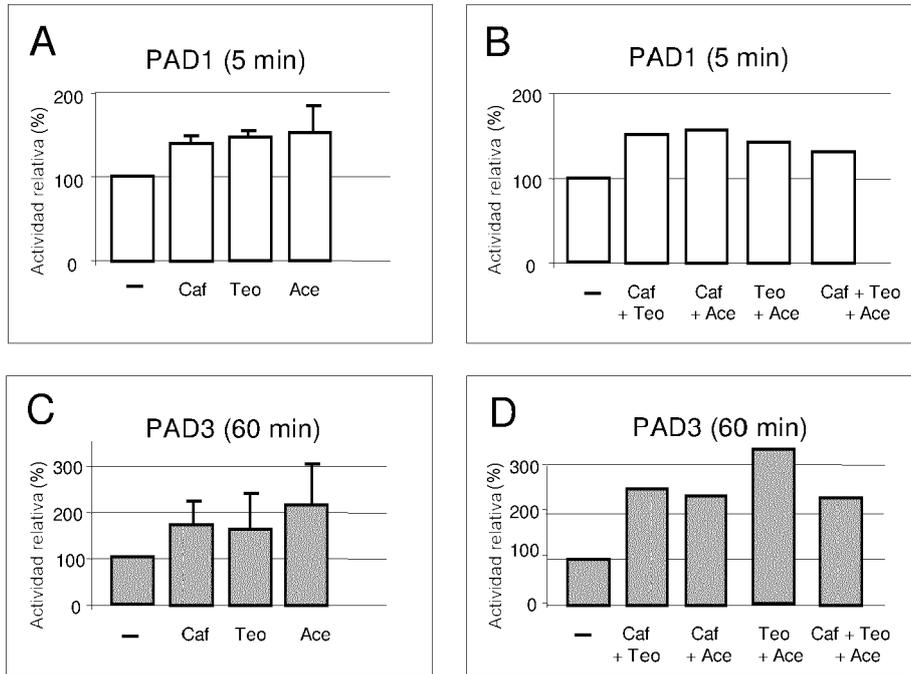


Figura 7

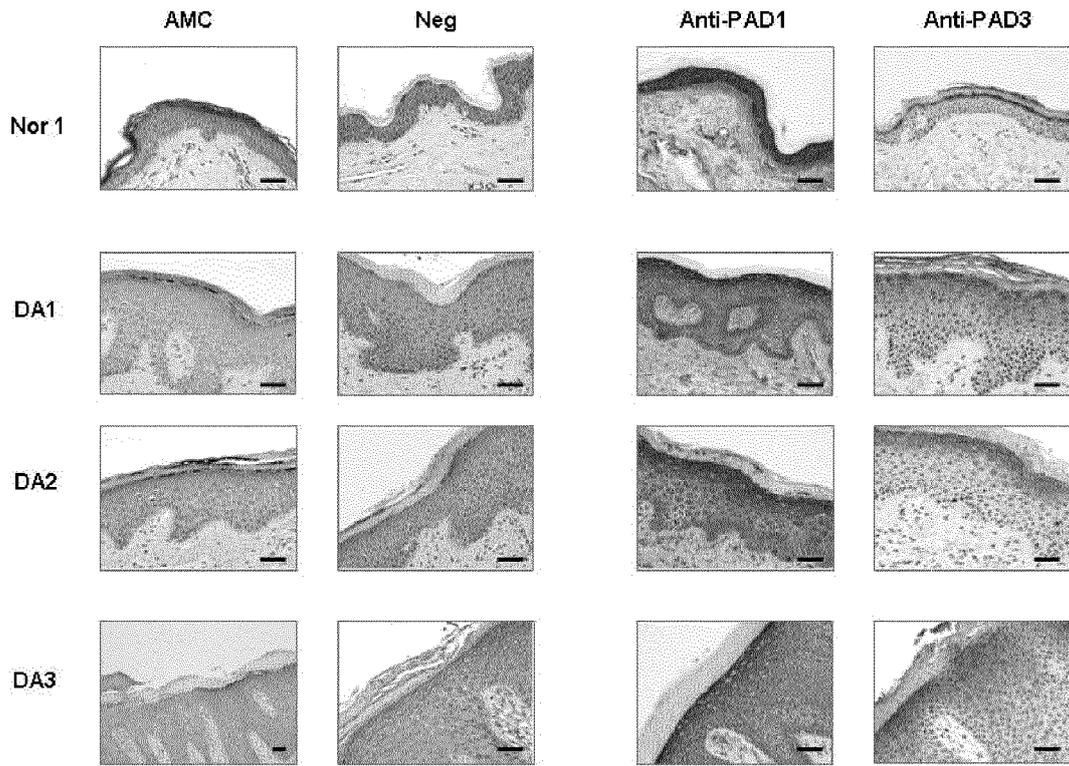


Figura 8

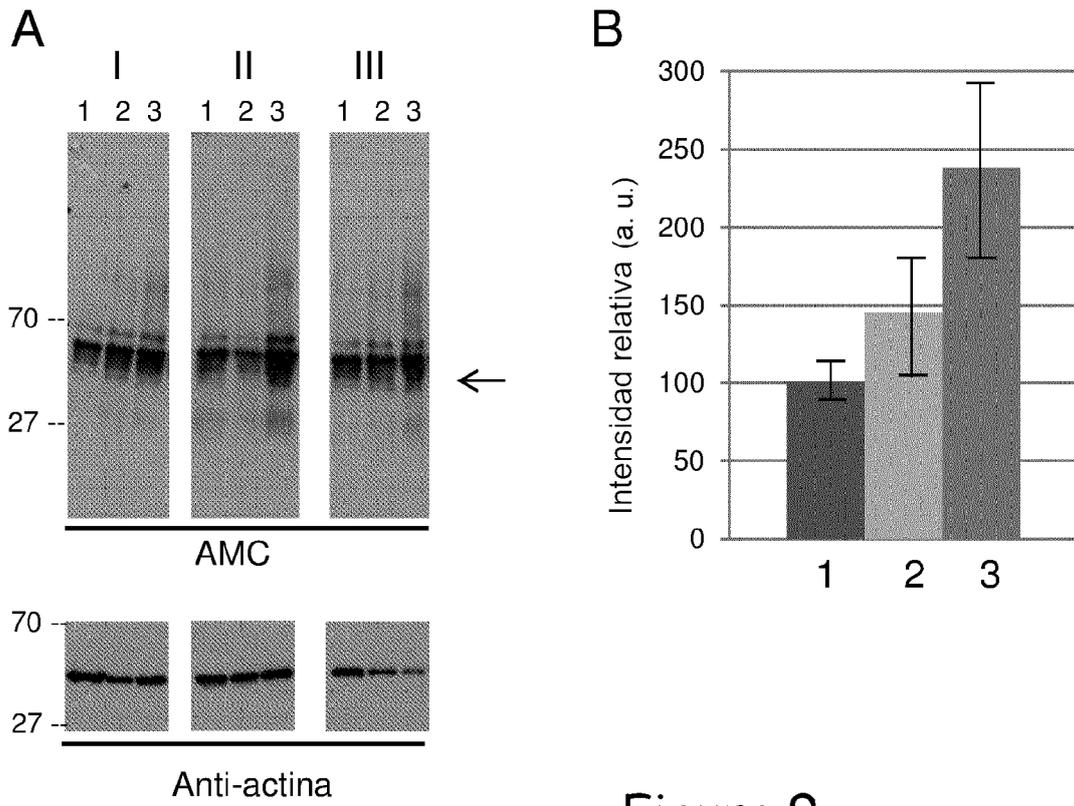


Figura 9

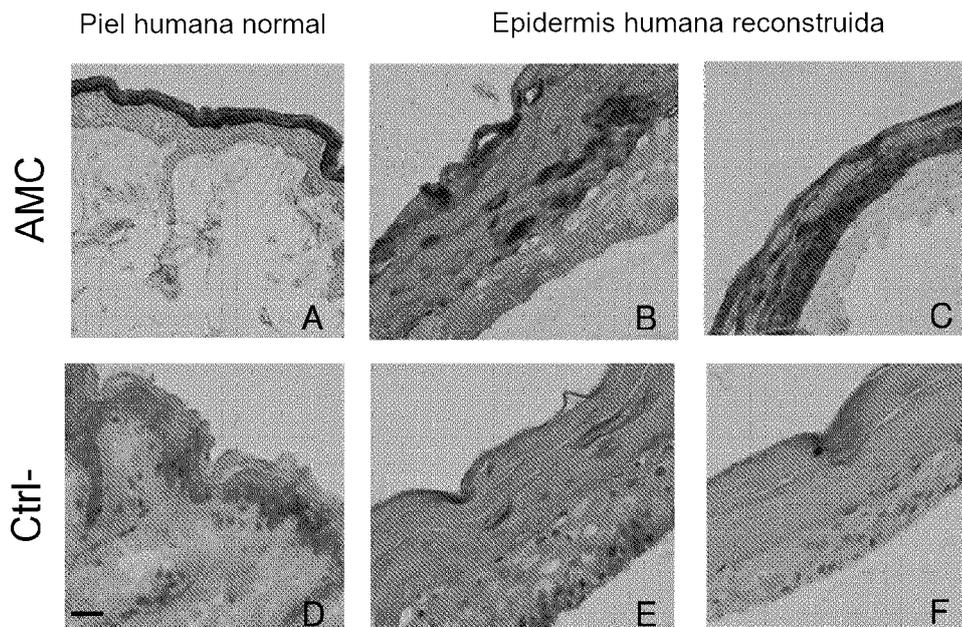


Figura 10