



CONFÉDÉRATION SUISSE
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(11) **CH** **706 322 A2**

(51) Int. Cl.: **A61K** **8/64** (2006.01)
C07K **7/06** (2006.01)
A61Q **19/08** (2006.01)

Demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

(12) **DEMANDE DE BREVET**

(21) Numéro de la demande:	00651/13	(71) Requérant: Induchem Holding AG, Industriestrasse 8a 8604 Volketswil (CH)
(22) Date de dépôt:	21.03.2013	(72) Inventeur(s): Daniel Auriol, 31300 Toulouse (FR) Fabrice Lefevre, 31190 Auterive (FR) Kuno Schweikert, 8808 Pfäffikon (CH) Gérard Redziniak, 92160 Antony (FR)
(43) Demande publiée:	30.09.2013	
(30) Priorité:	23.03.2012 EP 12305335.7	(74) Mandataire: Katzarov S.A., 19, rue des Epinettes 1227 Genève (Les Acacias) (CH)

(54) **Utilisation d'agonistes des récepteurs opioïdes delta dans le domaine de la cosmétique et de la dermocosmétique.**

(57) La présente invention concerne l'utilisation d'un ligand des ROD pour la stimulation de la pigmentation dans une composition cosmétique et l'utilisation de rubiscoline 6 ou de ses dérivés dans une composition cosmétique.

Description**DOMAINE DE L'INVENTION**

[0001] La présente invention concerne le domaine de la cosmétique et de la dermocosmétique.

ART ANTERIEUR

[0002] Les récepteurs opioïdes font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui comportent sept domaines transmembranaires. Après activation par leurs ligands respectifs à l'extérieur de la cellule, les RCPG libèrent des protéines G sous une forme activée dans le cytoplasme, qui à leur tour activent plusieurs protéines cibles dans la cellule comme l'adénylate cyclase.

[0003] Les récepteurs opioïdes les plus connus sont les récepteurs mu (ROM), pour lesquels la morphine est le ligand. Deux autres familles de récepteurs opioïdes ont été décrites en plus des récepteurs mu: les récepteurs delta et kappa.

[0004] Les récepteurs opioïdes sont connus pour être impliqués dans le contrôle de la sensation de la douleur.

[0005] Toutefois, des études récentes ont montré que la délétion des récepteurs opioïdes mu et kappa chez les souris modifie l'hypertrophie épidermique, la densité des terminaisons nerveuses périphériques et le comportement des démangeaisons (Bigliardi et al. 2007). Par conséquent, ces récepteurs ont été considérés comme étant liés non seulement à la douleur et à la sensation de démangeaisons, mais également au contrôle de la différenciation de la peau.

[0006] Dans la même approche, des études scientifiques ont démontré que la délétion des ROD (récepteurs opioïdes delta) chez les souris mène à la formation d'un épiderme mince anormal. Ces résultats ont suggéré un rôle essentiel des ROD dans la différenciation, la prolifération et la migration de la peau, des facteurs qui sont importants pour la cicatrisation (Bigliardi et al. 2006).

[0007] La peau et le cerveau partagent la même origine embryologique durant le développement de l'embryon humain. Des scientifiques ont démontré que des récepteurs opioïdes ont été trouvés présents sur la surface à la fois des neurones et des cellules de la peau (Bigliardi et al., 2009), montrant que les récepteurs opioïdes ne sont pas uniquement localisés dans le système nerveux mais également dans d'autres organes comme la peau. Cette découverte a ouvert la porte pour expliquer pourquoi la délétion des récepteurs opioïdes pouvait interagir avec un développement correct de la peau.

[0008] De nombreux composés chimiques sont connus pour interagir avec les récepteurs opioïdes: des composés exogènes comme les opioïdes, ou des composés endogènes comme les encéphalines et les endorphines. Certains peptides dérivés d'aliments ont été également décrits comme agissant sur les récepteurs opioïdes. Par exemple, de petits peptides provenant de la digestion de la protéine RubisCo, en particulier il a été montré que la rubiscoline 5 et la rubiscoline 6 sont des ligands des ROD, mais pas des ROM (Yang et al., 2001; Yang et al., 2003). Comme ces peptides sont le résultat d'enzymes digestives, il a été considéré qu'ils pouvaient être impliqués dans une action neuro-calmane après digestion dans nos intestins. En outre, il a été montré que la rubiscoline 6, lorsqu'elle est administrée par voie orale, amplifie la consolidation de la mémoire. Toutefois, à cause de leur origine digestive, personne n'a imaginé utiliser de tels peptides pour une sorte quelconque d'applications topiques.

[0009] Si les récepteurs opioïdes semblent être des cibles intéressantes pour réguler la différenciation de la peau, jusqu'à présent personne n'a jamais essayé d'agir sur ces récepteurs avec des agonistes ou des antagonistes pour contrôler l'évolution de la peau ou des cheveux, comme l'inversion des signes du vieillissement ou la modulation de la pigmentation. Les raisons principales de ce fait sont les suivantes:

- Les récepteurs opioïdes sont considérés par les scientifiques comme des cibles pharmacologiques uniquement dédiées au contrôle de la douleur (par exemple pour le criblage et la conception de nouvelles molécules destinées à soulager la douleur). Par conséquent, les personnes issues de l'industrie des soins de la peau éviteront d'agir sur une telle catégorie de cibles cellulaires, de peur d'effets secondaires inverses.
- L'action sur ces récepteurs au niveau de la peau ne sera considérée que comme un moyen pour contrôler les démangeaisons, les sensations douloureuses et la neuro-inflammation dans des indications thérapeutiques.
- Il n'existe aucun lien évident entre les récepteurs opioïdes delta et le processus de pigmentation de la peau ou des cheveux: l'utilisation d'opioïdes delta ou de médicaments apparentés aux opioïdes n'a jamais été reconnue comme un moyen pour modifier la couleur de la peau ou des cheveux.
- Il n'existe aucun lien évident entre les récepteurs opioïdes et la normalisation du métabolisme de la peau: si la délétion des récepteurs opioïdes mène à des peaux anormales chez les souris, personne n'a jamais démontré qu'une action sur les récepteurs opioïdes pourrait inverser ce phénotype. D'autant plus qu'il n'existe aucune preuve que l'utilisation d'opioïdes comme la morphine pourrait inverser les signes du vieillissement et effacer les rides sur la peau humaine.

[0010] Il n'existe qu'un seul document, WO 2009/012 376, suggérant l'utilisation d'agonistes des récepteurs opioïdes delta dans une composition cosmétique, en particulier en tant que composant anti-vieillissement pour la peau. La section expérimentale est constituée d'un test avec la deltorphine, un composant endogène qui traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE). Par conséquent, à cause de la nature endogène de la deltorphine et de sa capacité à traverser la BHE, l'utilisation d'agonistes pourrait être associée à des effets secondaires inverses.

RESUME DE L'INVENTION

[0011] Dans un premier aspect de l'invention, les inventeurs ont découvert de manière surprenante que les agonistes des récepteurs opioïdes delta (agonistes des ROD) activent la pigmentation. Par conséquent, la présente invention concerne l'utilisation cosmétique d'un ligand des ROD, de préférence un agoniste des ROD, pour la stimulation de la pigmentation de la peau et des cheveux, en particulier pour la préparation d'une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée, de préférence pour une administration topique, pour la stimulation de la pigmentation de la peau des cheveux. La présente invention concerne également un produit de soins pour les cheveux comme un shampoing ou un après-shampoing comprenant un ligand des ROD, de préférence un agoniste des ROD. Elle concerne en outre un ligand des ROD, de préférence un agoniste des ROD pour une utilisation dans la stimulation de la pigmentation de la peau ou des cheveux. De préférence, l'agoniste des ROD est sélectif pour les ROD. De préférence, l'agoniste des ROD est choisi dans le groupe constitué par BU-48, SNC-80, C-8813, DPI-287, DPI-221, TAN-67, BW373U86, SIOM, RWJ-394,674, la rubiscoline 6 et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 6, la deltorphine et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 6, DPDPE, DSLET, JOM-13, DSTBULET, BUBU, et BUBUC. De manière davantage préférée, l'agoniste des ROD est un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 5. De manière encore davantage préférée, l'agoniste des récepteurs opioïdes 6 est un peptide qui a ou comprend la séquence de formule (I)

Y-P-X1-D-X2-X3

(I)(SEQIDNo 6)

dans laquelle XI représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;

X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I; et

X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.

[0012] En particulier, l'agoniste des récepteurs opioïdes 6 est un peptide choisi dans le groupe constitué par ou un peptide possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 6 et comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPIDLV (SEQ ID No 15), YPMDLV (SEQ ID No 16), YPLDIV (SEQ ID No 17), YPIDIV (SEQ ID No 18), YPMDIV (SEQ ID No 19), YPIDLV (SEQ ID No 20), YPIDMV (SEQ ID No 21), YPIDII (SEQ ID No 22), YPMDII (SEQ ID No 23), YPMDL (SEQ ID No 24), YPIDL (SEQ ID No 25), et YPMIDI (SEQ ID No 26). De manière même davantage préférée, le peptide est YPLDLF.

[0013] Dans un deuxième aspect, l'invention concerne une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée, de préférence pour une administration topique, comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés et au moins un additif cosmétique. Elle concerne également l'utilisation de rubiscoline 6 et de ses dérivés pour la préparation d'une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée, de préférence pour une administration topique. Elle concerne en outre un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés pour une utilisation dans la préparation d'une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermiques ou sous-cutanée, de préférence pour une administration topique. Elle concerne un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés pour une utilisation en tant qu'agent cosmétique. De préférence, la composition cosmétique est destinée à la prévention et/ou à l'inversion des signes du vieillissement de la peau et/ou au comblement des rides, à l'amélioration du caractère lisse de la peau, et/ou à l'égalisation des marqueurs déséquilibrés d'une peau stressée, et/ou à la normalisation d'une expression génique perturbée dans les cellules de la peau, et/ou à l'effacement des rides en forme de pattes d'oie, et/ou à la récupération de l'hydratation de la peau, et/ou à la prévention de la perte trans-épidermique d'eau de la peau, et/ou à la réactivation de la différenciation des cellules de la peau, et/ou à la stimulation de la pigmentation de la peau ou des cheveux.

[0014] De préférence, le peptide est un peptide qui a ou comprend la séquence de formule (I)

Y-P-X1-D-X2-X3

(I)(SEQIDNo6)

dans laquelle XI représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;

X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I; et

X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.

[0015] De manière davantage préférée, le peptide est un peptide choisi dans le groupe constitué par ou un peptide possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 6 et comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPIDLV

(SEQ ID No 15), YPMDLV (SEQ ID No 16), YPLDIV (SEQ ID No 17), YPIDIV (SEQ ID No 18), YPMDIV (SEQ ID No 19), YPIDLV (SEQ ID No 20), YPIDMV (SEQ ID No 21), YPIDII (SEQ ID No 22), YPMDII (SEQ ID No 23), YPMDL (SEQ ID No 24), YPIDL (SEQ ID No 25), et YPMDI (SEQ ID No 26). De manière même davantage préférée, le peptide est YPLDLF.

[0016] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention concerne un dispositif comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés, le dispositif étant capable de délivrer ledit peptide par l'intermédiaire d'une injection intra-épidermique et/ou intradermique et/ou sous-cutanée.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

[0017] Fig. 1: Effet agoniste du composé au niveau du récepteur Delta2 (ROD). Fig. 1A avec la DPDPE, $CE_{50} = 5,910^{-10}$ M, $A = 0,0$, $D = 95,8$. Fig. 1B avec des fractions de protéines hydrolysées avec la pepsine 02.01 PEPS, $CE_{50} = 0,87\%$ (v/v), $A = 0,0$, $D = 100,0$. Fig. 1C avec YPLDLF, $CE_{50} = 3,910^{-6}$ M, $A = -8,3$, $D = 100,0$.

[0018] Fig. 2: Effet de cytokines sur le taux d'expression des ROD dans l'épiderme. Fig. 2A: Peau humaine normale – épiderme et derme; Fig. 2B: Peau humaine normale – derme et glandes sébacées; Fig. 2C: Epiderme humain reconstruit (EHR); Fig. 2D: EHR traité par PMA à 2 μ g; Fig. 2E: EHR traité par un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF- α).

[0019] Fig. 3: Fig. 3A: Formation de mélanine dans des explants de peau humaine irradiés aux UVA ou traités avec le peptide pendant 6 jours. Mélanine: taches brun sombre sur les images. Fig. 3B: Quantification de la mélanine dans les kératinocytes de la couche basale provenant d'explants de peau humaine irradiés aux UVA ou traités avec les solutions peptidiques pendant 6 jours (* $p < 0,01$ contre le contrôle non traité, test t de Student). Figure 3C: Quantification des mélanosomes dans des mélanocytes provenant d'explants de peau humaine irradiés aux UVA ou traités avec les solutions peptidiques pendant 6 jours.

[0020] Fig. 4: Fig. 4A: moyenne des variations en pourcentage en fonction de T0 obtenue pour le paramètre de perte trans-épidermique d'eau; Fig. 4B: moyenne des variations en pourcentage en fonction de T0 obtenue pour le paramètre d'hydratation de la peau; Fig. 4C: moyenne des variations en pourcentage en fonction de T0 obtenue pour le paramètre de profondeur des rides; Fig. 4D: moyenne des variations en pourcentage en fonction de T0 obtenue pour le paramètre Rz (importance des rides de la peau). En gris foncé, PHN et en gris clair, PHG.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0021] Les inventeurs ont découvert de manière surprenante que l'on peut agir sur les récepteurs opioïdes delta et inverser le processus du vieillissement et avoir des effets positifs sur la peau ou les cheveux, comme une inversion des signes du vieillissement, la récupération du caractère lisse de la peau, une activation de la production de mélanine, un comblement des rides profondes, une augmentation de l'hydratation naturelle de la peau. De manière même davantage surprenante, ils ont découvert que des peptides produits par la digestion de protéines végétales possèdent cette capacité de réguler les processus de différenciation de la peau. En outre, ils ont découvert de manière surprenante que l'on peut agir sur les récepteurs opioïdes delta et stimuler la pigmentation de la peau et des cheveux.

1. Des peptides et des hydrolysats de plantes peuvent agir sur les récepteurs opioïdes delta

[0022] Les inventeurs ont découvert pour la première fois la capacité de plusieurs peptides et d'hydrolysats de protéines végétales d'agir en tant qu'agonistes ou antagonistes des ROD (récepteurs opioïdes delta). Un hexapeptide YPLDLF (SEQ. ID No 1) a donné des résultats excellents en tant qu'agoniste avec une $CE_{50} = 3,9 \mu$ M. Les inventeurs ont démontré que soit un peptide pur soit un hydrolysats de protéines végétales peut lier et activer les ROD.

2. Dans des conditions de vieillissement simulé, les récepteurs opioïdes sont moins exprimés dans la peau. Les peptides agonistes des ROD peuvent inverser ce phénomène.

[0023] Au niveau de la peau, le processus du vieillissement est étroitement associé à une augmentation du taux de micro-inflammation dans la peau (Giacomini et al., 2005), due à une accumulation des agressions externes (stressés mécaniques répétés, rayons UV, polluants), et à l'incapacité des cellules de la peau de faire face à ces agressions (activité inférieure de détoxification, taux inférieur d'énergie cellulaire, régénération cellulaire inférieure). Ce soi-disant processus «d'inflamm-âge» génère des réponses rétroactives qui entraînent des signes visibles de vieillissement: rides, perte de tonus, cernes, affaissement, ridules, et analogues.

[0024] Les inventeurs ont simulé des conditions de vieillissement sur de l'épiderme humain reconstruit (EHR) avec un mélange de cytokines. Ils ont découvert que dans ces conditions de «vieillessement», le taux d'expression des récepteurs opioïdes delta est réduit. Comme il est connu d'après la littérature que les récepteurs opioïdes contrôlent les processus de différenciation de la peau et génèrent un phénotype de peau mince, ils ont découvert l'une des causes du vieillissement: l'expression inférieure des récepteurs opioïdes delta due à des cytokines mène à une différenciation de la peau plus faible.

[0025] Les inventeurs ont appliqué le peptide sur l'EHR à des doses différentes et ils ont découvert que le peptide YPLDLF permet de réactiver l'expression des récepteurs opioïdes delta dans la peau. Par conséquent, ils ont découvert que ce peptide peut pénétrer dans la peau et inverser le processus du vieillissement dû aux cytokines.

3. Les peptides agonistes des ROD peuvent agir sur les récepteurs opioïdes delta et mènent à la régulation de plusieurs facteurs génétiques dérégulés dans les peaux vieilles.

[0026] Afin de mieux comprendre l'effet des peptides sur les récepteurs opioïdes delta, les inventeurs ont mesuré le taux d'expression de 64 gènes humains sur de l'épiderme humain reconstruit. Ces épidermes ont été traités soit avec rien, soit avec un mélange de cytokines pour simuler le processus du vieillissement, soit avec le mélange de cytokines plus différentes quantités de peptides. Les inventeurs ont découvert que, en présence de cytokines, la majorité des gènes ont été dérégulés comparativement à la condition contrôle: ils ont été soit surexprimés soit sous-exprimés. Dans les conditions avec le peptide, presque tous les gènes ont été ramenés à un taux normal d'expression. Par conséquent, les inventeurs ont découvert que les peptides agonistes des ROD peuvent agir sur les récepteurs opioïdes delta et égaliser les effets indésirables des conditions de vieillissement.

4. Les peptides agonistes des ROD agissent sur les récepteurs opioïdes delta et mènent à la régulation de plusieurs facteurs protéiques dérégulés dans les peaux vieilles.

[0027] Les inventeurs ont réalisé la même expérience que pour les gènes, mais ils ont mesuré le taux d'expression de protéines clés, qui sont connues pour être impliquées dans la différenciation de la peau. Ils ont découvert que, dans les conditions induites par les cytokines, ces protéines ont été dérégulées (surexprimées ou sous-exprimées). Mais, l'épiderme traité avec les peptides a récupéré un taux d'expression normal de ces marqueurs protéiques. Les inventeurs ont découvert que les peptides agonistes des ROD peuvent équilibrer et réguler le taux d'expression de marqueurs de différenciation dans les peaux vieilles.

5. Les agonistes des ROD agissent sur les récepteurs opioïdes delta et mènent à l'activation de la pigmentation par la mélanine.

[0028] Parce que la production de mélanine est contrôlée par un récepteur couplé aux protéines G (le récepteur MCI), les inventeurs ont eu l'idée de tester l'effet des agonistes des ROD testés auparavant sur des explants de peau humaine pour voir quel effet ils pourraient avoir sur la pigmentation de la peau. Après quelques jours d'incubation de ces explants de peau avec les molécules, sans aucune radiation UV, ils ont découvert que les explants de peau ont commencé à produire de la mélanine et des mélanosomes dans leurs mélanocytes. Les inventeurs ont découvert que les agonistes des ROD peuvent stimuler la production des pigments dans la peau. Ce résultat est très surprenant parce que le récepteur u. (ROM) est le récepteur associé à la pigmentation (Kaiser et al, 2004).

6. Les peptides agonistes des ROD agissent sur les récepteurs opioïdes et mènent à la régénération de la peau.

[0029] Les inventeurs ont testé une crème contenant le peptide agoniste des ROD testé auparavant sur des volontaires humains dans un essai clinique en double aveugle contre un placebo. Après plusieurs jours d'utilisation, ils ont découvert que la peau des volontaires était significativement améliorée en termes d'hydratation, de réduction de la perte d'eau trans-épidermique, de caractère lisse et de réduction de la profondeur des rides. Les inventeurs ont découvert que l'utilisation de peptides agonistes des ROD qui agissent sur les récepteurs opioïdes peut avoir des effets cliniques contre un placebo et permet d'inverser les signes du vieillissement sur la peau humaine.

[0030] Par conséquent, la présente invention concerne l'utilisation d'agonistes des ROD qui agissent sur les récepteurs opioïdes delta dans des applications cosmétiques et dermocosmétiques pour

- prévenir et inverser les signes du vieillissement; et/ou,
- combler les rides (produits anti-vieillessement pour des peaux normales ou matures); et/ou,
- améliorer le caractère lisse de la peau (produits pour le corps et le visage); et/ou,
- égaliser les marqueurs déséquilibrés dans les peaux stressées; et/ou,
- normaliser l'expression génique perturbée dans les cellules de la peau; et/ou,
- effacer les rides en forme de pattes d'oie (produits pour le contour des yeux); et/ou,
- récupérer l'hydratation de la peau; et/ou,
- prévenir la perte d'eau trans-épidermique dans la peau et par conséquent prévenir la déshydratation de la peau; et/ou,
- réactiver la différenciation des cellules de la peau; et/ou,
- stimuler la pigmentation (auto-bronzage, repigmentation des cheveux, produits présolaires, soins des cheveux); et/ou,
- agir de manière synergique sur les voies couplées aux protéines G dans les cellules de la peau.

[0031] Un premier aspect de la présente invention concerne l'utilisation d'un ligand des ROD pour stimuler la pigmentation de la peau et/ou des cheveux. Elle concerne également un procédé cosmétique pour stimuler la pigmentation de la peau ou des cheveux, comprenant l'application sur la peau humaine et/ou les cheveux d'une composition comprenant un ligand des ROD. En particulier, la peau est la peau du corps et/ou du visage. Dans un aspect plus spécifique, la présente invention concerne un produit de soins pour les cheveux comprenant un ligand des ROD. Dans ce contexte, le ligand des ROD est l'agent actif. Dans un aspect particulier, il peut être le seul agent actif. En variante, il peut être combiné avec des agents actifs supplémentaires. Des exemples non exhaustifs de tels agents actifs supplémentaires comprennent des précurseurs de la synthèse de la mélanine, des activateurs de l'expression des tyrosinases et des composés actifs renforçant le bulbe

pileux. Le ligand des ROD peut être un agoniste des ROD ou un antagoniste des ROD. Dans un mode de réalisation préféré, le ligand des ROD est un agoniste des ROD.

[0032] En particulier, la présente invention concerne l'utilisation d'un agoniste des ROD pour la préparation d'une composition cosmétique pour un auto-bronzage, une pigmentation ou une repigmentation des cheveux, des produits pré-solaires ou solaires, un produit de soins pour les cheveux comme un shampoing ou un après-shampoing, ou une composition cosmétique comprenant un agoniste des ROD pour un auto-bronzage, une pigmentation ou une repigmentation des cheveux, des produits pré-solaires ou solaires, un produit de soins pour les cheveux comme un shampoing ou un après-shampoing. La composition est pour une application topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée. De manière davantage préférée, la composition est pour une administration topique, en particulier sur la peau ou les cheveux. La composition cosmétique peut comprendre au moins un additif cosmétique. Dans un aspect particulier, il peut être le seul agent actif. En variante, il peut être combiné avec des agents actifs supplémentaires, par exemple comme il a été détaillé ci-dessus.

[0033] L'agoniste des ROD peut être un peptide ou une molécule non peptidique. Par exemple et de manière non exhaustive, il peut être choisi dans le groupe constitué par la rubiscoline 6 et ses dérivés, la deltorphine et ses dérivés, la Leu-encéphaline, la Met-encéphaline, la DPDPE (D-Pénicillamine(2,5)-encéphaline) et ses dérivés, la DSLET, la biphaline, JOM-13, DTLET, DSTBULET, BUBU, BUBUC et des agonistes non peptidiques tels que BU-48, BW373U86, C-8813, la 7-spiroindanyloxymorphone (SIOM), la N-phénéthyl-14-éthoxymétopone, ADL-5859, SNC-40, SNC-80, SNC-86, SNC-162, DPI-221, DPI-287, DPI 3290, TAN-67, RWJ-394,674, et la norbuprénorphine.

[0034] Dans un mode de réalisation préféré, l'agoniste des ROD est sélectif pour les récepteurs opioïdes delta. Par sélectif, il est signifié que l'agoniste des ROD présente une CI50 inférieure pour les récepteurs delta par rapport aux récepteurs mu ou kappa. En particulier, le rapport de la CI50 pour les récepteurs mu et/ou kappa par la CI50 pour les récepteurs delta est supérieur à 1, de préférence supérieur à 10, de manière encore davantage préférée supérieur à 30. L'agoniste sélectif des ROD peut être un agoniste peptidique ou un agoniste non peptidique. Par exemple, il peut être choisi dans le groupe constitué par BU-48, SNC-80, C-8813, DPI-287, DPI-221, TAN-67, BW373U86, SIOM, RWJ-394,674, la rubiscoline 6 et ses dérivés, la deltorphine et ses dérivés, la DPDPE, la DSLET, JOM-13, DSTBULET, BUBU, et BUBUC.

[0035] Les séquences peptidiques définies dans ce document utilisent le code à une lettre comme suit: A: Ala (alanine); R: Arg (arginine); N: Asn (asparagine); D: Asp (acide aspartique); C: Cys (cystéine); Q: Gin (glutamine); E: Glu (acide glutamique); G: Gly (glycine); H: His (histidine); I: Ile (isoleucine); L: Leu (leucine); K: Lys (lysine); M: Met (méthionine); F: Phe (phénylalanine); P: Pro (proline); S: Ser (serine); T: Thr (thréonine); W: Trp (tryptophane); Y: Tyr (tyrosine); V: Val (valine).

[0036] Par «dérivés», il est signifié dans ce document un peptide avec des substitutions, des délétions ou des additions de 1, 2, 3, 4, ou 5 acides aminés et/ou un peptide avec des modifications telles que détaillées ci-dessous, mais qui conserve l'activité agoniste des ROD ou qui possède une activité agoniste des ROD. De préférence, les substitutions sont conservatives, ce qui signifie que le résidu est substitué par un acide aminé du même groupe physico-chimique. Les groupes physico-chimiques sont généralement définis comme suit: les acides aminés non polaires ou hydrophobes comprenant A, V, I, L, P, F, M, et W, mais de manière plus étroite, les acides aminés hydrophobes non aromatiques comme y compris A, V, I, L, P, et M; le groupe polaire non chargé comprenant G, S, T, C, Y, N et Q; le groupe polaire chargé négativement comprenant E et D; et le groupe polaire chargé positivement comprenant R et K. En variante, la substitution peut être également non conservative. Le dérivé peut également comprendre des acides aminés n'existant pas à l'état naturel comme l'acide azétidinecarboxylique, l'acide 2-aminoadipique, l'acide 3-aminoadipique, la bêta-alanine, l'acide aminopropionique, l'acide 2-aminobutyrique, l'acide A-aminobutyrique, l'acide 6-aminocaproïque, l'acide 2-aminoheptanoïque, l'acide 2-aminoisobutyrique, l'acide 3-aminoisobutyrique, l'acide 2-aminopimélique, l'acide 2,4-diaminoisobutyrique, la desmosine, l'acide 2,2'-diaminopimélique, l'acide 2,3-diaminopropionique, la N-éthylglycine, la N-éthylasparagine, l'hydroxylysine, l'allo-hydroxylysine, la 3-hydroxyproline, la 4-hydroxyproline, l'isodesmosine, l'allo-isoleucine, la N-méthylglycine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la norvaline, la norleucine, l'ornithine, et l'acide pipécolique.

[0037] Dans un mode de réalisation préféré, le dérivé peptidique ne comprend pas plus de 10, 9, 8, 7 ou 6 acides aminés, ou comporte 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 acides aminés.

[0038] Les liaisons peptidiques peuvent être éventuellement modifiées afin de prévenir une protéolyse. Par exemple, au moins une liaison peptidique peut être remplacée par une liaison choisie dans le groupe constitué par (-CH₂-NH-), (-NH-CO-), (-CH₂-O-), (-CH₂-S-), (-CH₂-CH₂-), (-CO-CH₂-), (-CHOH-CH₂-), (-N=N-), et (-CH=CH-). Eventuellement, toutes les liaisons peptidiques sont remplacées.

[0039] Les peptides agonistes des ROD peuvent présenter des substitutions et des modifications enzymatiques et/ou chimiques. En particulier, les modifications peuvent être les substitutions de tous ou de certains des résidus d'acide L-aminé en acide D-aminé. Dans un aspect très particulier, les peptides comprennent uniquement des acides D-aminés. Les peptides peuvent être acétylés, conjugués à un lipide, estérifiés, glycosylés, amidés et/ou cyclisés.

[0040] En particulier, les peptides agonistes des ROD peuvent être conjugués à un lipide afin de faciliter la pénétration à travers la couche cornée. Dans un mode de réalisation particulier, les peptides selon l'invention peuvent présenter un radical ou plusieurs radicaux lipidiques, fixés de manière covalente ou non covalente. Le radical/les radicaux lipidiques

peuvent être tout lipide présentant de C3 à C20 atomes de carbone, de préférence liés à l'extrémité N- ou C-terminale. De préférence, le lipide est conjugué à l'extrémité N-terminale du peptide. En variante, le lipide est conjugué à son extrémité C-terminale. Des exemples non exhaustifs de lipides comprennent, mais sans limitation, l'acide acétique, l'acide butyrique, l'acide capronique, l'acide caprylique, l'acide caprynique, l'acide laurique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique, l'acide béhénique, l'acide lignocératique, l'acide palmitolique, l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide γ -linoléique, l'acide α -linoléique, l'acide éicosadinoïque, l'acide éicosatrinaïque, l'acide arachidonique, l'acide éicosapentaénoïque, l'acide docosapentaénoïque, et l'acide docosahexaénoïque. Par exemple, le peptide peut être palmitoylé. Toutefois, on peut noter qu'un avantage de la rubiscoline 6 et de ses dérivés est leur capacité à pénétrer la peau sans aucune modification.

[0041] En variante, les peptides agonistes des ROD peuvent comprendre un radical facilitant la pénétration cellulaire des peptides agonistes des ROD. Par exemple, ce radical est bien connu dans l'art (voir par exemple, Vives et al, 2008).

[0042] Les peptides agonistes des ROD peuvent être isolés à partir d'une source naturelle ou ils peuvent être synthétisés.

[0043] La deltorphine et ses dérivés comprennent la deltorphine (Y-DM-FHLMD-NH₂ (SEQ ID No 2)) et des dérivés tels que les peptides suivants: Y-D A-FDVVG-NH₂ (SEQ ID No 3, deltorphine I), Y-D A-FEVVG-NH₂ (SEQ ID No 4, deltorphine II), et Y-D L-FADVASTIGDFFHSI-NH₂ (SEQ ID No 5, Leu-deltorphine).

[0044] Dans le mode de réalisation préféré entre tous, l'agoniste sélectif des ROD est la rubiscoline 6 et ses dérivés. La rubiscoline 6 a la séquence YPLDLF (SEQ ID No 1).

[0045] La rubiscoline 6 et ses dérivés comprennent des peptides qui ont ou comprennent la séquence de formule (I)



dans laquelle

X1 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;

X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I;

X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.

[0046] Par conséquent, la rubiscoline 6 et ses dérivés peuvent être un peptide choisi dans le groupe constitué par ou un peptide comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPIDLV (SEQ ID No 15), YPMDLV (SEQ ID No 16), YPLDIV (SEQ ID No 17), YPIDIV (SEQ ID No 18), YPMDIV (SEQ ID No 19), YPIDLV (SEQ ID No 20), YPIDMV (SEQ ID No 21), YPIDII (SEQ ID No 22), YPMDII (SEQ ID No 23), YPMDL (SEQ ID No 24), YPIDL (SEQ ID No 25), et YPMDI (SEQ ID No 26). Dans un mode de réalisation préféré, la rubiscoline 6 et ses dérivés peuvent être un peptide choisi dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), et YPMDL (SEQ ID No 24). Dans un mode de réalisation très spécifique, l'agoniste des ROD est un peptide YPLDLF (SEQ ID No 1) ou un peptide comprenant la séquence YPLDLF (SEQ ID No 1), éventuellement modifiée comme il a été décrit ci-dessus.

[0047] Dans un deuxième aspect, la présente invention concerne une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée, de préférence une administration topique, comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés et au moins un additif cosmétique. La rubiscoline 6 et ses dérivés sont tels que détaillés ci-dessus. Elle concerne en outre l'utilisation d'un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés pour la préparation d'une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée, de préférence une administration topique. De préférence, la composition cosmétique est destinée à la prévention et/ou à l'inversion des signes du vieillissement de la peau, et/ou au comblement des rides, à l'amélioration du caractère lisse de la peau, et/ou à l'égalisation des marqueurs déséquilibrés dans une peau stressée, et/ou à la normalisation de l'expression génique perturbée dans les cellules de la peau, et/ou à l'effacement des rides en forme de pattes d'oie, et/ou à la récupération de l'hydratation de la peau, et/ou à la prévention de la perte d'eau trans-épidermique dans la peau, et/ou à la réactivation de la différenciation des cellules de la peau, et/ou la stimulation de la pigmentation. En particulier, la peau est la peau du corps ou du visage. Elle concerne également un procédé cosmétique pour la prévention et/ou l'inversion des signes du vieillissement de la peau, et/ou le comblement des rides, l'amélioration du caractère lisse de la peau, et/ou l'égalisation des marqueurs déséquilibrés dans une peau stressée, et/ou la normalisation de l'expression génique perturbée dans les cellules de la peau et/ou l'effacement des rides en forme de pattes d'oie, et/ou la récupération de l'hydratation de la peau, et/ou la prévention de la perte d'eau trans-épidermique dans la peau, et/ou la réactivation de la différenciation des cellules de la peau, et/ou la stimulation de la pigmentation, comprenant l'application sur la peau humaine et/ou les cheveux d'une composition comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés. Dans ce contexte, le peptide agoniste des ROD est l'agent actif. Dans un aspect particulier, il peut être le seul agent actif. En variante, il peut être combiné avec des agents actifs supplémentaires. En particulier, de tels agents actifs supplémentaires peuvent être des agents anti-vieillessement, des agents photo-protecteurs, un antioxydant et des agents anti-glycation.

[0048] La rubiscoline 6 et ses dérivés peuvent être utilisés pour la normalisation de la barrière cutanée, la restructuration des peaux matures, le lissage de la surface de la peau et/ou le comblement des rides profondes. Par conséquent, leurs applications peuvent être des produits de soins pour les yeux, en particulier pour le contour des yeux, du gel pour les yeux, du sérum à appliquer sous les yeux, des produits pour le traitement des rides d'expression, des produits anti-vieillessement pour la réduction des rides profondes, des produits de soins pour le visage destinés aux peaux matures, des produits de soins du cou, des produits de soins pour la restructuration du corps, et une protection contre les agressions quotidiennes. Dans la composition cosmétique de la présente invention, l'agoniste des ROD est ajouté dans une quantité efficace du point de vue cosmétique. La quantité peut varier selon l'affection à traiter, l'âge, la gravité de l'affection à traiter, la durée du traitement, et analogues. Dans un mode de réalisation particulier, à la quantité efficace d'un point de vue cosmétique, l'agoniste des ROD n'a aucun effet thérapeutique. En effet, les utilisations envisagées dans ce document sont des utilisations non thérapeutiques.

[0049] De manière générale, lorsque l'agoniste des ROD est la rubiscoline 6 et l'un de ses dérivés, la composition peut comprendre entre 0,000005 et 0,002% en poids du peptide par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0,00001% et 0,001%, de manière encore davantage préférée entre 0,00003% et 0,0006%. Lorsqu'elle est exprimée en ppm, la composition comprend généralement de 0,05 à 20 ppm de peptide, de préférence de 0,1 à 10 ppm, de manière encore davantage préférée de 0,3 à 6 ppm.

[0050] La composition cosmétique peut être formulée sous la forme d'une crème, d'un gel, d'un hydratant, d'une lotion, d'un lait, d'une huile, d'un onguent, d'une cire, d'une mousse, d'une pâte, d'un sérum, d'une pommade, d'un produit de soins pour les cheveux, ou d'un shampooing. Elle peut être éventuellement appliquée sous la forme d'un aérosol. Elle peut être également sous forme solide, comme sous la forme d'un bâtonnet. Elle peut être utilisée en tant que produit de soins et/ou en tant que produit de maquillage pour la peau.

[0051] Les additifs cosmétiques peuvent être ajoutés pour obtenir un résultat cosmétique souhaité. Les résultats cosmétiques souhaités peuvent être déterminés par une personne ayant des connaissances normales dans l'art ou l'utilisateur des compositions décrites. Les additifs cosmétiques peuvent comprendre, mais sans limitation, des supports, des excipients, des composants véhicules, des hydratants, des humidifiants, des sels cosmétiques, des adjuvants, des huiles, des émulsifiants, des co-émulsifiants, des agents gélifiants, des absorbants, des solvants, des agents photoprotecteurs, et des bases inertes.

[0052] Les compositions utiles pour une application topique peuvent contenir des composants supplémentaires tels que des composants supports, excipients ou véhicules comme, par exemple, l'eau, l'acétone, l'éthanol, l'éthylène glycol, le propylène glycol, le butane-1,3-diol, le myristate d'isopropyle, le palmitate d'isopropyle, une huile minérale, et des mélanges de ceux-ci pour former des lotions, des teintures, des crèmes, des émulsions, des gels ou des pommades qui sont non toxiques et acceptables d'un point de vue pharmaceutique ou dermatologique. En outre, des hydratants ou des humidifiants peuvent être ajoutés aux présentes compositions si c'est souhaité. Des exemples de ces composants supplémentaires peuvent être trouvés dans Remington's Pharmaceutical Sciences, Eighteenth Edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990.

[0053] Cette composition cosmétique peut être sous toute forme de présentation normalement utilisée en cosmétique, et elle peut être, par exemple, sous la forme d'une solution aqueuse éventuellement gélifiée, d'une dispersion du type lotion, éventuellement une lotion à deux phases, d'une émulsion obtenue par la dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (émulsion H/E) ou inversement (émulsion E/H), d'une triple émulsion (émulsion E/H/E ou H/E/H), de nanoémulsions, en particulier des nanoémulsions H/E, dans lesquelles la taille des gouttes est inférieure à 100 nm; ou d'une dispersion vésiculaire de type ionique et/ou non ionique. Ces compositions sont préparées selon les procédés habituels. Dans un mode de réalisation, une composition sous la forme d'une émulsion huile dans l'eau est utilisée. Dans un aspect, les peptides agonistes des ROD peuvent être préparés dans des conditions spécifiques comme incorporés dans des liposomes, des niosomes, des nanosomes, des nanosphères ou des nanocapsules.

[0054] Pour une application locale sur les cheveux ou le cuir chevelu, la composition cosmétique peut être sous la forme de solutions aqueuses, alcooliques ou aqueuses-alcooliques sous la forme de crèmes, de gels, d'émulsions ou de mousses; sous la forme de compositions d'aérosol comprenant également un propulseur sous pression.

[0055] Lorsque la composition est sous forme aqueuse, spécialement sous la forme d'une dispersion, d'une émulsion ou d'une solution aqueuse, elle peut comprendre une phase aqueuse, qui peut comprendre de l'eau, une eau florale et/ou une eau minérale.

[0056] D'une manière connue, la composition cosmétique décrite dans ce document peut également comprendre au moins un adjuvant choisi parmi des adjuvants qui sont courants en cosmétique, comme des agents gélifiants hydrophiles et lipophiles, des agents actifs hydrophiles et lipophiles, des agents conservateurs, des antioxydants, des solvants, des parfums, des agents de charge, des agents de criblage, des pigments, des absorbants d'odeurs et des matières colorantes. Le au moins un adjuvant est présent dans une quantité située dans la plage, par exemple, de 0,01 % à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition. Selon sa nature, le au moins un adjuvant peut être introduit dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, ou dans des vésicules lipidiques. Dans tous les cas, ces adjuvants, et également leurs

proportions, seront choisis de manière à ne pas altérer les propriétés souhaitées de la combinaison des agents actifs anti-rides décrits dans ce document.

[0057] Lorsque la composition cosmétique décrite dans ce document est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut se situer dans la plage de 5 % à 80% en poids comme 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsifiants et les co-émulsifiants utilisés dans la composition cosmétique sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux utilisés traditionnellement dans le domaine pris en considération. L'émulsifiant et le co-émulsifiant sont présents dans la composition dans une quantité située dans la plage de 0,3% à 30% en poids comme de 0,5% à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

[0058] En ce qui concerne les huiles qui peuvent être utilisées dans cette description, une mention peut être faite, par exemple, d'huiles minérales (gelée de pétrole liquide ou poly-isobutène hydrogéné), d'huiles d'origine végétale (huile d'avocat ou huile de soja), d'huiles d'origine animale (lanoline), d'huiles de silicone (cyclométhicone ou diméthicone) et d'huiles fluorées (perfluoropolyéthers). Des alcools gras (alcool cétylique), des acides gras et des cires (cire de carnauba ou ozokérite) peuvent être également utilisés en tant que substances grasses.

[0059] Comme exemples d'émulsifiants et de co-émulsifiants qui peuvent être utilisés ici, une mention peut être faite, par exemple, d'esters d'acides gras de polyéthylène glycol comme le stéarate de PEG-100, et d'esters d'acides gras de glycérol comme le stéarate de glycéryle.

[0060] Des agents gélifiants hydrophiles qui peuvent être incorporés sont, par exemple, des polymères de carboxyvinyle (carbomer), des copolymères acryliques tels que des copolymères acrylate/acrylate d'alkyle, des polyacrylamides, comme le polyacrylamido-acide sulfonique réticulé, des polysaccharides, des gommes naturelles et des argiles, et des agents gélifiants lipophiles qui peuvent être mentionnés comprennent, par exemple, des argiles modifiées, comme les bentones, des sels métalliques d'acides gras, la silice hydrophobe et des polyéthylènes.

[0061] Dans un mode de réalisation, l'agent gélifiant hydrophile pour la composition décrite dans ce document est choisi parmi un polyacrylamido-acide sulfonique réticulé tel que décrit dans les documents EP 0 850 642, WO 9 800 094 ou Hostacerin AMPS commercialisé par Clariant.

[0062] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention concerne un dispositif comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés, le dispositif étant capable de délivrer ledit peptide par l'intermédiaire d'une injection intra-épidermique et/ou intradermique et/ou sous-cutanée. Ledit dispositif peut être, par exemple, une seringue avec une aiguille ou un dispositif d'injection sans aiguille, comme ceux utilisés dans la technique de soins connue sous le nom de mésothérapie. Un kit comprenant un dispositif peut être également envisagé, ledit kit comprenant un dispositif, en particulier une seringue ou un dispositif d'injection, et l'agoniste des ROD, en particulier la rubiscoline 6 et ses dérivés, tels que définis ci-dessus. Ledit kit peut également comprendre une aiguille. Ledit dispositif peut être également sous forme prête à l'usage, c'est-à-dire prérempli, ou il peut être nécessaire de le remplir. Dans ce dernier cas, une composition ou un autre dispositif (comme un flacon) comprend l'agoniste des ROD, en particulier la rubiscoline 6 et ses dérivés, tels que définis ci-dessus, éventuellement en combinaison avec au moins un autre composé actif. En variante, la composition de l'invention peut être utilisée en combinaison avec un traitement laser qui améliore la pénétration de la composition.

[0063] La composition de l'invention peut être également utilisée en combinaison avec d'autres traitements comme la luminothérapie ou la photothérapie, en particulier la thérapie laser à faible intensité ou la luminothérapie à pénétration profonde. En outre, l'application topique de la composition peut être combinée avec l'utilisation d'un appareil de massage facial.

[0064] Suivent des exemples fournis uniquement pour illustrer la présente invention, lesquels ne doivent pas être interprétés comme limitant l'étendue de l'invention, telle que décrite dans ce document.

EXEMPLES

Exemple 1: Expériences

1. Test de peptides et d'hydrolysats de protéines sur les récepteurs opioïdes delta

[0065] Des feuilles d'épinard congelées ont été décongelées et brisées en particules fines à l'aide d'un mélangeur. Ce jus a été en outre traité aux ultrasons pour rompre les cellules et les protéines ont été récupérées par précipitation acide. Ces protéines ont été ensuite digérées par plusieurs enzymes, y compris la pepsine et la papaïne. L'hydrolysats a été purifié (ultrafiltration), fractionné et stocké avant l'analyse. En même temps, des peptides synthétiques ont été commandés à un fabricant. Les peptides et les hydrolysats ont été testés sur des cellules portant le récepteur opioïde delta2 et l'impédance des cellules a été mesurée pour évaluer l'activité de liaison des composés testés (Law and Loh, 1993J).

[0066] Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la réponse agoniste spécifique du contrôle (la DPDPE (SEQ ID No 27) a été utilisée pour cet objectif) ((réponse spécifique mesurée/réponse agoniste spécifique du contrôle) x 100) obtenue en présence des composés à tester.

[0067] Les valeurs de CE50 (concentration produisant une réponse spécifique semi-maximale) et les valeurs de CI50 (concentration provoquant une inhibition semi-maximale de la réponse agoniste spécifique du contrôle) ont été déter-

minées par une analyse de la régression non linéaire des courbes concentration-réponse générées avec les valeurs moyennes des répliquats en utilisant l'ajustement de la courbe de l'équation de Hill ($Y = D + [(A D)/(1 + (C/C50)^nH)]$), où Y = réponse spécifique, D = réponse spécifique minimale, A = réponse spécifique maximale, C = concentration du composé, et C50 = CE50 ou CI50, et nH = facteur de la pente).

Composé	CE50	Balises
YP		N.C.
YPL		N.C.
YPLD		N.C.
YPLDL		> 1,010 ⁻⁵
YPLDLF	3,910 ⁻⁶ M	
02.01 PEPS	0,87% (v/v)	
02.02 PEPS		> 5% (v/v)
02.01 PANE		N.C.
02.02 PANE		N.C.

Tableau 1: détermination des CE50

[0068] YP, YPL, YPLD (SEQ ID No 29), YPLDL (SEQID No 28), YPLDLF (SEQID No 1): peptides purs

PEPS: fractions de protéines hydrolysées avec la pepsine

PANE: fractions de protéines hydrolysées avec la papaïne.

N.C.: valeur de CE50 non calculable. La courbe concentration-réponse montre moins de 25 % d'effet à la concentration testée la plus élevée.

>: valeur de CE50 supérieure à la concentration testée la plus élevée. La courbe concentration-réponse montre moins de 50% d'effet à la concentration testée la plus élevée.

[0069] Cette expérience (tableau 1 et fig. 1) a révélé qu'un peptide a été fonctionnellement actif sur les ROD en tant que ligand avec une CE50 = 3,9 µM. Un hydrolysats de protéines a été également actif sur les ROD, montrant que pas seulement les peptides purs, mais également les hydrolysats de protéines pouvaient être actifs en tant que ligand des ROD.

2. Effet des cytokines sur le taux d'expression des ROD dans l'épiderme

[0070] L'expression des protéines des récepteurs opioïdes delta (ROD) a été analysée en utilisant une «micropuce tissulaire» (TMA pour «tissue microarray») composée de nombreux modèles cellulaires associés à la peau afin d'identifier les meilleurs modèles pour d'autres études.

Inclusion en paraffine

[0071] Des tissus fixés au formol ont été déshydratés dans des bains multiples avec une concentration croissante d'éthanol et ensuite inclus dans de la paraffine «Paraplast X-tra». Les coupes transversales ont été réalisées en utilisant un microtome (épaisseur de 5 µm) et conservées à température ambiante jusqu'à la coloration.

Marquage immunohistochimique

[0072] Les coupes ont été débarrassées de la paraffine puis les sites antigéniques ont été récupérés en utilisant des tampons spécifiques (pH 6 et pH 9). Les coupes ont été ensuite lavées et incubées avec du peroxyde d'hydrogène. Après une étape de lavage supplémentaire, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (anti-ROD). Le marquage a été ensuite révélé en utilisant un anticorps secondaire conjugué à de la biotine. Après l'addition de streptavidine conjuguée à de la peroxydase et du substrat de la peroxydase, les noyaux ont été contre-colorés avec une solution d'hématoxyline. Les lames ont été lavées dans de l'eau ultra-pure et montées dans un milieu aqueux.

Observation microscopique

[0073] Les coupes ont été observées en utilisant un microscope NIKON E400. Les images ont été capturées avec un NIKON DS-Ri1 et traitées avec le logiciel NIS-Elements 3.10.

Fig. 2A: Peau humaine normale -épiderme et derme	L'expression des protéines des ROD a été observée dans la couche granuleuse de l'épiderme. En outre, certaines cellules dermiques ont été légèrement marquées dans leur cytoplasme.
Fig. 2B: Peau humaine normale -derme et glandes sébacées	Certaines zones des glandes sébacées ont exprimé les protéines des ROD
Fig. 2C: Epiderme humain reconstitué (EHR)	Les protéines des ROD ont été fortement exprimées dans les membranes des cellules de la couche granuleuse de l'EHR. Toutes les cellules vivantes des couches basale et suprabasale ont exprimé les protéines dans leur cytoplasme.
Fig. 2D: EHR traité par du PMA à 2 µg	Comparativement à l'EHR non traité, l'expression des ROD a été diminuée après traitement à l'acétate myristate de phorbol (PMA) à 2 µg. Il n'a été observé aucun marquage dans la couche épineuse alors que l'expression a persisté fortement dans la couche basale et légèrement dans la couche granuleuse.
Fig. 2E: EHR traité par un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF-α)	Comparativement à l'EHR non traité, l'expression a été fortement diminuée dans l'EHR traité avec le mélange de cytokines: dans les couches granuleuse et épineuse, le marquage a totalement disparu. Seule l'expression dans la couche basale a été conservée.

Tableau 2: Analyse de l'expression des ROD dans l'épiderme

[0074] Ces résultats (tableau 2 et fig. 2) ont montré que les protéines des ROD ont été exprimées dans la peau humaine et dans le modèle 3D d'épiderme humain reconstitué. L'expression a été vraiment importante dans la couche granuleuse des deux modèles. Après des traitements d'inflammation (mélange de cytokines ou PMA) simulant des conditions de peau vieillie, l'expression des protéines des ROD a diminué ou a disparu totalement. Ceci démontre que dans des conditions de vieillissement, les récepteurs opioïdes delta sont moins exprimés.

3. Effet anti-cytokines d'un peptide agoniste des ROD sur le taux d'expression des ROD dans l'épiderme

[0075] Dans la présente étude, les effets d'un peptide (YPLDLF) sur l'expression des récepteurs opioïdes delta (ROD) ont été recherchés sur un modèle d'épiderme humain reconstitué (EHR) dans des conditions basales ou stimulées. Plus précisément, les EHR ont été stimulés par un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF-α) capable d'induire un fort profil inflammatoire et un phénotype psoriasique dans les kératinocytes.

[0076] Un épiderme humain reconstitué (EHR) de 11 jours a été préparé selon un procédé dérivé décrit par Poumay et al. (2004). Ces EHR ont été cultivés à 37 °C et 5% de CO₂ dans un milieu de maintien spécifique.

[0077] Les EHR traités dans des conditions basales ont été placés dans le milieu du test contenant ou pas (contrôle non stimulé) les solutions peptidiques et ils ont été incubés pendant 54 heures. Pour les conditions inflammatoires, les EHR ont été placés dans le milieu du test contenant ou pas (contrôle stimulé) les solutions peptidiques ou la référence (inhibiteur de JAK I à 10 µM) et ils ont été préincubés pendant 6 heures. Les EHR ont été ensuite stimulés avec un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF-α à 3 µg/ml) et ils ont été incubés pendant 48 heures. Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en n = 3.

[0078] A la fin de l'incubation, les surnageants ont été recueillis et les EHR ont été lavés dans de la solution tampon phosphate (PBS) pour l'analyse par immunohistofluorescence.

Inclusion en paraffine

[0079] Les tissus fixés au formol ont été déshydratés dans des bains multiples avec une concentration croissante d'éthanol et ensuite ils ont été inclus dans de la paraffine. Les coupes transversales ont été réalisées en utilisant un microtome (épaisseur de 5 µm) et conservées à température ambiante jusqu'à la coloration.

Marquage immunohistochimique

[0080] Les coupes ont été débarrassées de la paraffine et les sites antigéniques ont été récupérés en utilisant un tampon spécifique (pH 6). Les coupes ont été ensuite lavées et incubées avec du peroxyde d'hydrogène. Après une étape de lavage supplémentaire, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (anti-ROD). Le marquage a été ensuite

révélé en utilisant un anticorps secondaire conjugué à de la biotine. Après l'addition de streptavidine conjuguée à de la peroxydase et du substrat de la peroxydase, les noyaux ont été contre-colorés avec une solution d'hémaroxylène. Les lames ont été lavées dans de l'eau ultra-pure et montées dans un milieu aqueux.

Observation microscopique

[0081] Les coupes ont été observées en utilisant un microscope NIKON E400. Les images ont été capturées en utilisant un NIKON DS-Ri1 et traitées avec le logiciel NIS-Elements 3.10.

[0082] Résultats

Aucune cytokine		Conditions stimulées avec 3 ng/ml de cytokines			
Contrôle	Contrôle	Inhibiteur de JAK I	Peptide à 0,03 PPM	Peptide à 0,3 PPM	Peptide à 3 PPM
++	–	++	++	++	++

Tableau 3: Score de l'expression de ROD1 dans l'EHR dans des conditions différentes

[0083] Les protéines des ROD ont été correctement détectées dans l'épiderme humain reconstruit en suivant l'immunohistomarquage in situ. ROD1 a été fortement et presque exclusivement exprimé dans la couche granuleuse. Après le traitement avec le mélange de cytokines, l'expression du ROD1 dans le contrôle stimulé a été fortement diminuée comparativement au contrôle non stimulé. La référence anti-inflammatoire, l'inhibiteur de JAK I, testé à 10 μ M, a inversé l'effet inhibiteur du mélange de cytokines sur le ROD1. L'effet inhibiteur du mélange de cytokines sur l'expression du ROD1 a été également inversé après traitement avec le peptide.

[0084] Cette expérience a démontré qu'un peptide agoniste des ROD, comme le peptide YPLDLF, peut inverser l'effet d'un mélange de cytokines sur le taux d'expression des ROD.

4. Effets d'un peptide sur l'expression génique dans l'épiderme humain reconstruit inflammatoire

[0085] Les effets transcriptionnels d'un peptide (YPLDLF) sur l'expression génique ont été recherchés sur un modèle d'épiderme humain reconstruit (ERH) dans des conditions inflammatoires. L'inflammation de l'EHR a été induite en utilisant un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF- α). Les effets sur l'expression génique ont été évalués en utilisant la technologie de RT-qPCR. L'ARNm extrait a été analysé sur une puce de PCR personnalisée conçue par le sponsor de l'étude et contenant 64 gènes cibles (y compris 2 gènes domestiques) choisis pour leur rôle dans la différenciation des kératinocytes, où leur implication dans les jonctions cellulaires et la synthèse des lipides, ou leur relation avec les récepteurs opioïdes delta (ROD).

[0086] L'épiderme humain reconstruit (EHR) de 11 jours a été préparé selon un procédé dérivé décrit par Poumay et al. (2004). Ces EHR ont été cultivés à 37 °C et 5 % de CO₂ dans un milieu de maintien spécifique.

[0087] Les EHR ont été cultivés dans un milieu de test contenant ou pas (contrôles) les composés à tester ou la référence (inhibiteur de JAK I à 10 μ M) et ils ont été préincubés pendant 24 heures. Les épidermes ont été ensuite stimulés ou pas (contrôle non stimulé) avec un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF- α) à 3 ng/ml et les épidermes ont été incubés pendant 24 heures. Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en n = 2.

[0088] A la fin de l'incubation, les surnageants ont été recueillis et les EHR ont été lavés dans de la solution tampon phosphate (PBS) et immédiatement cryodesséchés à -80 °C.

Analyse de l'expression différentielle

[0089] L'expression des marqueurs a été analysée en utilisant le procédé de RT-qPCR sur l'ARNm extrait des EHR pour chaque traitement (avant l'extraction de l'ARN, les répliquats ont été groupés).

[0090] L'analyse de l'expression génique a été réalisée en n = 2 en utilisant une puce de PCR personnalisée réservée à la recherche et adaptée au format «criblage».

Transcription inverse

[0091] L'ARN total a été extrait à partir de chaque échantillon en utilisant le réactif TriPure Isolation Reagent® selon les instructions de fournisseurs. La quantité et la qualité de l'ARN ont été évaluées en utilisant un bioanalyseur de laboratoire-sur-puce (technologies Agilent). Les contrôles de qualité de l'ARN sont présentés en annexe. Les traces de contaminants potentiels d'ADN génomique ont été éliminées en utilisant le système DNFree (Ambion). La transcription inverse de l'ARNm a été conduite en présence d'oligo(dT) et de transcriptase inverse Superscript II. La quantification de l'ADNc a été réalisée en utilisant Nanovue (GE Healthcare) et l'ajustement de l'ADNc à 10 ng/ μ l.

PCR quantitative

[0092] Les PCR (réactions en chaîne de la polymérase) ont été réalisées en utilisant le système «LightCycler®» (Roche Molecular System Inc.) selon les instructions du fournisseur. Ce système permet des PCR rapides et puissantes, après la détermination des conditions d'analyse des amorces à tester.

[0093] Le mélange réactionnel (10 µl au final) a été additionné comme suit:

- de 2,5 µl d'ADNc à 10 ng/µl,
- des amorces directes et inverses,
- du mélange réactionnel contenant l'ADN polymérase taq, du SYBR Green 1 et du MgCl₂.

Gestion des données de la PCR quantitative

[0094] Les données brutes ont été analysées avec le logiciel Microsoft Excel®.

[0095] L'incorporation de fluorescence dans l'ADN amplifié a été mesurée en continu durant les cycles de PCR. Ceci a entraîné un tracé «intensité de fluorescence» en fonction des «cycles de PCR» permettant l'évaluation d'une valeur d'expression relative (ER) pour chaque marqueur. La valeur choisie pour les calculs d'ER représente le «point de sortie» (Ct) de la courbe de fluorescence. Pour un marqueur considéré, plus le nombre de cycles est élevé; plus la quantité d'ARNm est basse. La valeur d'ER a été exprimée en unités arbitraires (UA) selon la formule: $(1/2^{\text{nombre de cycles}}) \times 10^6$

Résultats

[0096] Le peptide, testé à 0,3 µg/ml, a montré globalement une modulation du profil d'expression génique de l'EHR stimulé par le mélange de cytokines.

[0097] Cette expérience a démontré que les peptides agonistes des ROD, comme le peptide YPLDLF, peuvent inverser l'effet de dérégulation d'un mélange de cytokines sur le taux d'expression de gènes spécifiques dans l'épiderme.

Expression relative de gènes en fonction des conditions du contrôle (EHR non stimulé)			Avec cytokines	Avec cytokines et peptide 0,3 PPM
			% du contrôle (HK moyen)	
Fonction des gènes	Référence des gènes	Nom des protéines	100	100
Domestiques	RPS28	Protéine ribosomiale S28	104	91
	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	94	116
Marqueurs associés aux récepteurs opioïdes delta 1	OPRD1	Récepteur des opioïdes, delta 1	97	101
	ADRB2	Récepteur adrénergique, bêta-2, surface	62	259
	CREB1	Protéine 1 de liaison des éléments sensibles à l'AMPc	120	109
	GNAS	Locus complexe GNAS	121	130
	MAPK1	Protéine kinase 1 activée par un mitogène	126	108
	MAPK14	Protéine kinase 14 activée par un mitogène	117	109
	PTGS2	Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2 (prostaglandine G/H synthase et cyclooxygénase)	42	119
	STAT3	Transducteur des signaux et activateur de la transcription 3 (facteur de réponse en phase aiguë)	444	120

CH 706 322 A2

Expression relative de gènes en fonction des conditions du contrôle (EHR non stimulé)			Avec cytokines	Avec cytokines et peptide 0,3 PPM
			% du contrôle (HK moyen)	
Fonction des gènes	Référence des gènes	Nom des protéines	100	100
Différenciation des kératinocytes	BIRC5	Survivine	25	88
	ODC1	Ornithine décarboxylase 1	52	110
	CASP3	Caspase 3, cystéine peptidase associée à l'apoptose	117	104
	SLC1A3	Protéine de la famille Soluté Carrier 1 (transporteur glial du glutamate de haute affinité), membre 3	39	100
	EGFR	Récepteur du facteur de croissance des cellules épidermiques (homologue d'oncogène viral de la leucémie érythroblastique (v-erb-b), aviaire)	138	141
	CALML5	De type calmoduline 5	57	72
	FLG	Filaggrine	34	117
	KRT1	Kératine 1	27	140
	KRT10	Kératine 10	26	145
	LOR	Loricrine	60	121
	SPRR1A	Petite protéine riche en proline 1A	181	142
	SPRR1B	Petite protéine riche en proline 1B (comifine)	251	127
	SPRR2A	Petite protéine riche en proline 2A	467	111
	TGM1	Transglutaminase 1 (polypeptide K de type épidermique I, protéine-glutamine-gamma-glutamyltransférase)	308	108
	CRNN	Cornuline	55	71
	IVL	Involucrine	90	119
	KRT19	Kératine 19	112	134
	PADI1	Peptidyl-arginine désiminase, type I	19	105
	SFN	Stratifine	173	143
Jonctions communicantes	GJA1	Protéine de jonction communicante, alpha 1, 43 kDa	46	111
	GJA5	Protéine de jonction communicante, alpha 5, 40 kDa	100	90
	GJB2	Protéine de jonction communicante, bêta 2	405	131

CH 706 322 A2

Expression relative de gènes en fonction des conditions du contrôle (EHR non stimulé)			Avec cytokines	Avec cytokines et peptide 0,3 PPM
			% du contrôle (HK moyen)	
Fonction des gènes	Référence des gènes	Nom des protéines	100	100
Jonctions imperméables	GBJ3	Protéine de jonction communicante, bêta 3, 31 kDa	73	111
	GJB4	Protéine de jonction communicante, bêta 4, 30,3 kDa	89	77
	GJB5	Protéine de jonction communicante, bêta 5, 31,1 kDa	78	122
	GJB6	Protéine de jonction communicante, beta 6, 30 kDa	197	203
	GJC1	Protéine de jonction communicante, gamma 1,45 kDa	96	126
	GJD3	Protéine de jonction communicante, delta 3, 31,9 kDa	108	487
	PANX1	Pannexine 1	190	133
	CLDN1	Claudine 1	93	128
	CLDN2	Claudine 2	72	121
	OCLN	Occludine	143	131
	F11R	Récepteur F11	174	115
	TJP1	Protéine de jonction imperméable 1 (zona occludens 1)	162	129
	TJAP1	Protéine associée aux jonctions imperméables 1 (périphérique)	87	81
Jonctions d'ancrage	CDH1	Cadhérine 1, type 1, E-cadhérine (épithéliale)	173	126
	CTNNA1	Caténine (protéine associée aux cadhérines), alpha 1,102 kDa	132	117
	CTNNB1	Caténine (protéine associée aux cadhérines), bêta 1,88 kDa	93	134
	PVRL1	Associée au récepteur du poliovirus 1 (médiateur de l'entrée des herpèsvirus C)	140	131
	DST	Dystonine	38	93
	CDSN	Cornéodesmosine	115	161
	DSG1	Desmoglérine 1	75	98
	DSP	Desmoplakine	151	107
	EPPK1	Epiplakine 1	99	82

Expression relative de gènes en fonction des conditions du contrôle (EHR non stimulé)			Avec cytokines	Avec cytokines et peptide 0,3 PPM
			% du contrôle (HK moyen)	
Fonction des gènes	Référence des gènes	Nom des protéines	100	100
Synthèse des lipides	EVPL	Envoplakine	107	132
	ITGAV	Intégrine, alpha V (récepteur de la vitronectine, polypeptide alpha, antigène CD51)	292	103
	ITGB3	Intégrine, bêta 3 (glycoprotéine plaquettaire IIIa, antigène CD61)	–	–
	ITGA2	Intégrine, alpha 2 (CD49B, sous-unité alpha 2 du récepteur VLA-2)	131	108
	ACSS2	Famille à chaîne courte des acyl-CoA synthétases, membre 2	94	113
	GBA	Glucosidase, bêta; acide (comprend la glucosylcéramidase)	112	110
	SMPD1	Sphingomyéline phosphodiesterase 1, aririfi lvsnsnmialfi	88	87
	SPTLC1	Serine palmitoyltransférase, sous-unité 1 de base à chaîne longue	92	120
	SULT2B1	Famille des sulfotransférases, cytosoliques, 2B, membre 1	92	173
	UGCG	UDP-glucose céramide glucosyltransférase	119	117

5. Protéines

[0098] Dans la présente étude, les effets d'un peptide sur l'expression de 7 protéines ont été estimés sur un modèle d'épiderme humain reconstruit (EHR) stimulé ou pas avec un mélange de cytokines (IL-17 + OSM + TNF- α).

[0099] Plus précisément, les effets des composés ont été évalués sur l'expression des protéines des marqueurs impliqués dans:

- les jonctions imperméables (occludine),
- les jonctions d'ancrage (cornéodesmosine)
- la différenciation des kératinocytes (kératine 10, involucrine, de type calmoduline 5),
- et la synthèse des lipides (acyl-CoA synthétase et sulfotransférase 2B).

[0100] Les épidermes humains reconstruits (EHR) de 11 jours ont été préparés selon un procédé dérivé décrit par Poumay et al. (2004). Ces EHR ont été cultivés à 37 °C et 5 % de CO₂ dans un milieu de maintien spécifique.

[0101] Les EHR ont été traités avec le milieu du test contenant ou pas (contrôle) les composés à tester et ils ont été incubés pendant 72 heures avec un renouvellement de traitement après 24 heures. Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en n = 3.

[0102] A la fin de l'incubation, les surnageants ont été recueillis et les EHR ont été lavés dans de la solution tampon phosphate (PBS) pour un immunomarquage in situ.

[0103] Les EHR ont été traités avec le milieu du test contenant ou pas (contrôle) les composés à tester ou l'inhibiteur de JAK I à 10 μ M et ils ont été incubés pendant 24 heures. Après une préincubation, le milieu du test et les traitements ont

été renouvelés et les épidermes ont été stimulés avec un mélange de cytokines (OSM + IL-17 + TNF- α^*) à 3 ng/ml et ils ont été incubés pendant encore 48 heures. Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en n = 3.

[0104] A la fin de l'incubation, les surnageants ont été recueillis et les EHR ont été lavés dans de la solution tampon phosphate (PBS) pour un immunomarquage in situ.

[0105] *Oncostatine M (OSM) + Interleukine 17 (IL-17) + Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)

Marquage immunofluorescent de l'acétyl-coenzyme A synthétase, de la cornéodesmosine, de l'involucrine, de la kératine 10, et de l'occludine.

[0106] Après incubation, les EHR ont été congelés instantanément dans de l'isopentane liquide/N₂ et stockés à -80 °C. Les coupes transversales ont été réalisées en utilisant un microtome (épaisseur de 5 μ m, une lame par EHR, plusieurs coupes par lame).

[0107] Les coupes ont été fixées avec un mélange d'acétone/méthanol et séchées. Après saturation avec du PBS-lait à 5 %, les coupes ont été incubées avec les solutions d'anticorps primaires spécifiques. Après des lavages, les sites de liaison ont été révélés en utilisant un anticorps secondaire couplé approprié et les noyaux cellulaires ont été colorés avec une solution d'iodure de propidium. Les coupes ont été lavées et ensuite observées sous microscopie à épifluorescence.

Marquage à l'immunoperoxydase de la protéine de type calmoduline 5 et de la sulfotransférase cytosolique 2b

[0108] Après l'incubation, les EHR ont été rincés et fixés avec une solution de formol. Les tissus fixés ont été déshydratés dans des bains multiples avec une concentration croissante d'éthanol et ensuite ils ont été inclus dans de la paraffine. Les coupes transversales ont été réalisées en utilisant un microtome (épaisseur de 5 μ m) et conservées à température ambiante.

[0109] Les coupes ont été débarrassées de la paraffine puis les sites antigéniques ont été récupérés. Les coupes ont été lavées et incubées avec du peroxyde d'hydrogène. Les coupes, une fois lavées, ont été incubées avec l'anticorps primaire (anti-protéine de type calmoduline 5 ou anti-SULT2BI). Après lavage, le marquage a été révélé en utilisant un anticorps secondaire conjugué à de la biotine. Après l'addition de streptavidine conjuguée à de la peroxydase et de substrat de la peroxydase, les noyaux ont été contre-colorés avec une solution d'hématoxyline. Les coupes ont été lavées, montées dans un milieu aqueux et observées sous microscopie à transmission de lumière.

Observation microscopique et analyse des images

[0110] Les coupes ont été observées en utilisant un microscope NIKON E400. Les images ont été capturées avec un NIKON DS-Ri1 et traitées avec le logiciel NIS-Elements 3.10 (3 images par répliquât). L'analyse des images a été réalisée en mesurant l'intensité de la fluorescence en utilisant le logiciel Image J.

[0111] Les résultats ont été exprimés en % du taux d'expression de chaque marqueur protéique dans les EHR non traités.

		TAUX D'EXPRESSION DES PROTEINES DANS L'EPIDERME HUMAIN (EHR)		
		Conditions normales	Condition; stimulées avec des cytokines	
PROTEINE	ROLE DANS LA PEAU		Aucun peptide	3 PPM de peptide
Cornéodesmosine	Fonction de barrière (cornéocytes)	100%	147%	84%
Involucrine	Fonction de barrière (enveloppe cornée)	100 %	122%	99%
Protéine de type calmoduline 5	Homéostasie (Ca ²⁺)	100%	40%	100%
Occludine	Homéostasie (jonctions imperméables)	100 %	50%	97%
Kératine 10	Robustesse (intégrité de l'épiderme)	100%	120%	104%

PROTEINE	ROLE DANS LA PEAU	TAUX D'EXPRESSION DES PROTEINES DANS L'EPIDERME HUMAIN (EHR)		
		Conditions normales	Condition; stimulées avec des cytokines	
			Aucun peptide	3 PPM de peptide
Acyl-CoA synthétase	Production d'énergie (mitochondries)	100%	33%	65%
Sulfotransférase 2B	Synthèse des lipides (sulfate de cholestérol)	100 %	200%	100%

Tableau 5: Expression des protéines

[0112] Cette expérience a démontré que les peptides agonistes des ROD, comme le peptide YPLDLF, peuvent normaliser l'effet de dérégulation d'un mélange de cytokines sur le taux d'expression de protéines spécifiques dans l'épiderme. Par conséquent, de tels composés peuvent inverser des situations déséquilibrées comme il arrive lors du vieillissement. De manière plus significative, ces composés régulent l'expression des protéines impliquées dans les jonctions imperméables (occludine), les jonctions d'ancrage (cornéodesmosine) et la différenciation des kératinocytes (kératine 10, involucrine, protéine de type calmoduline 5) et la synthèse des lipides (acétyl-coA synthétase et sulfotransférase 2B) dans la peau. Les peptides agonistes des ROD, comme le peptide YPLDLF, peuvent donc avoir des effets majeurs dans la réorganisation d'un métabolisme correct de la peau et ils favorisent la restructuration de la peau.

6. Evaluation des propriétés de pro-pigmentation des peptides agonistes des ROD sur des explants de peau

[0113] Cette étude vise à explorer l'activité de pro-pigmentation d'un composant (peptide YPLDLF) sur des explants de peau humaine maintenus en survie.

[0114] L'activité du produit a été évaluée par:

- une expertise histologique de la morphologie générale de la peau après une coloration au trichrome de Masson,
- une visualisation de la mélanine par une imprégnation argentique,
- une immunocoloration de Melan-A

[0115] Des explants de peau avec un diamètre de 10 mm ont été préparés à partir d'un échantillon de peau issu d'une chirurgie plastique réalisée sur une femme âgée de 43 ans. Les explants ont été mis en survie dans un milieu de croissance spécifique à 37 °C dans une atmosphère humide enrichie avec 5% de CO₂.

[0116] Les solutions du peptide (à 0,3 PPM ou 3 PPM) ont été appliquées de manière topique pendant 2 heures tous les jours en utilisant des disques de papier filtre prétrempés dans 30 µl de chaque solution.

[0117] Les explants contrôles n'ont pas reçu de traitement quelconque sauf le renouvellement du milieu de culture.

[0118] Certains autres explants contrôles ont été irradiés tous les jours avec des UV (+ 6 à 8% d'UVB) à une dose de 1,12 J/cm².

[0119] A J0, un lot T0 des explants a été prélevé et divisé en deux. Une moitié a été fixée dans du formol tamponné et l'autre moitié a été congelée à -80 °C. Au jour 6 et au jour 10, trois explants provenant de chaque lot ont été prélevés et traités de la même manière.

[0120] La mélanine a été visualisée par imprégnation argentique selon la variante de Fontana de la technique de Masson. La mélanine marquée a été évaluée par examen microscopique.

[0121] L'expression de la mélanine dans les couches basales a été quantifiée par une analyse des images en utilisant le logiciel Cell-D.

[0122] Melan-A a été détecté avec un anticorps monoclonal anti-Melan-A (de Santa Cruz Company) pendant 1 h à température ambiante avec un RTU Vectastain Universal amplifieur System VECTOR avidin / biotin et révélé par FITC. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec de l'iodure de propidium. Le Melan-A marqué a été évalué par examen microscopique et comptage des mélanocytes positifs pour le Melan-A et les résultats ont été exprimés par centimètre d'épiderme.

Contrôle non traité	Irradié par UVA	Peptide (0,3 ppm)	Peptide (3 ppm)
+	++	+	++

	Contrôle non traité	Irradié par UVA	Peptide (0,3 ppm)	Peptide (3 ppm)
Mélanine dans les mélanocytes				
Dendricité des mélanocytes	+	++	++	++
Contact des mélanocytes avec les kératinocytes	+	++	+	++
Transfert de mélanine aux kératinocytes	+	++	+	++

Tableau 6: Variations physiologiques semi-quantitatives dans les mélanocytes provenant d'explants de peau humaine irradiés aux UVA ou traités avec les solutions peptidiques pendant 6 jours.

[0123] Cette expérience a démontré, de manière surprenante, qu'un peptide qui se lie sur les récepteurs opioïdes peut activer d'une manière dépendante de la dose la production de pigment (mélanine) dans la peau humaine en 6 jours. L'efficacité de la stimulation de la production de mélanine et de la création des mélanosomes par ce peptide est presque aussi bonne que l'effet des rayons UV sur la peau.

7. Evaluation clinique en double aveugle contrôlée par un placebo de l'efficacité d'un produit cosmétique antirides

[0124] Le but de cette étude a été d'évaluer l'efficacité d'un produit cosmétique antirides dans l'atténuation de l'aspect des rides, l'amélioration de la surface de la peau et l'atténuation des signes du vieillissement de la peau. Afin d'atteindre cet objectif, une étude clinique a été réalisée sur 20 volontaires. L'efficacité du produit a été évaluée 15, 30 et 60 jours après une utilisation quotidienne du produit au moyen d'une technique d'analyse instrumentale telle que décrite ici ci-dessous. L'analyse a été ensuite complétée avec à la fois l'évaluation clinique réalisée par le dermatologue et l'auto-estimation des sujets participant à l'étude.

[0125] La surface de la peau est estimée quantitativement par Primos 3D (GFMesstechnik GmbH). Primos 3D est un dispositif de mesure de la peau in vivo sans contact basé sur la projection de lumière structurée. Conjointement avec une mesure 3-D complète et un logiciel d'évaluation, le détecteur permet d'évaluer les propriétés de la surface de la peau (c'est-à-dire, la profondeur des rides, le volume, la rugosité, etc.). Dans cette étude, il est calculé le paramètre Rz (ISO 4287, DIN 4768) et la profondeur des rides.

[0126] La mesure de l'hydratation de la peau est basée sur le procédé CORNEOMETER® reconnu au niveau international (Courage+Khazaka, electronic GmbH). Cette mesure est basée sur la constante diélectrique de l'eau. La sonde montre les variations de capacitance selon la teneur en humidité de l'objet mesurant. Un champ de dispersion électrique pénètre dans la toute première couche de la peau et détermine la diélectricité.

[0127] La perte d'eau trans-épidermique est mesurée au moyen du procédé TEWAMETER® reconnu au niveau international. L'instrument utilisé est un Tewameter 300® (Courage+Khazaka, electronic GmbH).

Crèmes testées:

[0128] PHN (placebo): EAU, NEOPENTANOATE D'OCTYLDODECYLE, OCTYLDODECANOL, MYRISTATE DE MYRISTYLE, POLYMERE CROISE D'ACRYLATES/ACRYLATE D'ALKYLE EN C10 A C30, HYDROXYDE DE SODIUM, PHENOXYETHANOL, PARABENZOATE DE METHYLE, PARABENZOATE D'ETHYLE, PARABENZOATE DE BUTYLE, PARABENZOATE DE PROPYLE, PARABENZOATE D'ISOBUTYLE

PHG (avec 3 PPM de peptide YPLDLF): EAU, NEOPENTANOATE D'OCTYLDODECYLE, OCTYLDODECANOL, MYRISTATE DE MYRISTYLE, POLYMERE CROISE D'ACRYLATES/ACRYLATE D'ALKYLE EN C10 A C30, HYDROXYDE DE SODIUM, PHENOXYETHANOL, PARABENZOATE DE METHYLE, PARABENZOATE D'ETHYLE, PARABENZOATE DE BUTYLE, PARABENZOATE DE PROPYLE, PARABENZOATE D'ISOBUTYLE, SOLUTION PEPTIDIQUE A 1%.

Protocole clinique

[0129] Appliquer les deux produits (actif et placebo) deux fois par jour (matin et soir) sur un visage parfaitement nettoyé (en suivant le procédé de moitié du visage, selon le schéma de randomisation décrit dans le formulaire d'information donné au sujet) autour de la zone des yeux, et masser doucement jusqu'à absorption complète.

[0130] Les données sont soumises au «test t» bilatéral de Student pour des données appariées. Les significations statistiques sont rapportées comme suit: n.s. non significatif $p > 0,05$; * significatif $p < 0,05$.

Résultats sur la perte d'eau trans-épidermique

[0131] Le diagramme sur la fig. 4A rapporte la moyenne des pourcentages de variations en fonction de T0 obtenue pour le paramètre de perte d'eau trans-épidermique.

[0132] Ce résultat démontre que les peptides agonistes des ROD peuvent réduire significativement la perte d'eau trans-épidermique dans la peau humaine. Après 60 jours, il y a eu 82% de réduction de perte d'eau par rapport au placebo.

Résultats sur l'hydratation de la peau

[0133] Le diagramme de la fig. 4B rapporte la moyenne des pourcentages de variations en fonction de T0 obtenue pour le paramètre d'hydratation de la peau.

[0134] Ce résultat démontre que les peptides agonistes des ROD peuvent améliorer le taux d'hydratation naturelle de la peau humaine.

Résultats sur les rides profondes

[0135] Le diagramme de la fig. 4C rapporte la moyenne des pourcentages de variations en fonction de T0 obtenue pour le paramètre de profondeur des rides.

[0136] Ce résultat démontre que les peptides agonistes des ROD peuvent réduire significativement la profondeur des rides dans la peau humaine. En particulier, il a été observé une réduction significative de 58 % de la profondeur des rides par rapport au placebo.

Résultats sur le caractère ridé de la peau

[0137] Le diagramme de la Fig. 4D rapporte la moyenne des pourcentages de variations en fonction de T0 obtenue pour le paramètre Rz (caractère ridé de la peau).

[0138] Ce résultat démontre que les peptides agonistes des ROD peuvent améliorer le caractère lisse de la peau humaine.

Exemple 2: Exemples de formulations de soins pour la peau comprenant le peptide YPLDLF**Crème régénérative pour peaux matures****A-Phase aqueuse****[0139]**

Glycérine	2,0 %
Hexylène glycol	3,0 %
Gomme xanthane	0,5 %
Conservateurs	q.s.
Carbomer	0,35 %
Peptide à 300 PMM	1 %
Eau	qsp. 100 %

B-Phase huileuse

Squalane	15%
Alcool cétylique	2%
Alcool arachidylrique/alcool béhénylique/arachidylglu-cosi	1%
Stéarate de glycérol	5%
Eau	1,5 %
NaOH	0,35 %
Conservateur + parfum	q.s.

Lotion hydratante et émolliente**[0140]**

A-Phase huileuse	
Cétéareth-2	3,5%
Cétéareth-21	2 - 4 %
Huile de germe de blé	3%
Cyclométhicone	7%
Palmitate d'octyle	8%
B-Phase aqueuse	
Eau	qsp. 100 %
Glycérine	7,0 %
Hexylène glycol	3,0 %
Peptide à 300 PPM	1%
Conservateurs	q.s.
C-Composants ajoutés dans l'émulsion, à une température inférieure à	40 °C
Hyaluronate de sodium	0,1 %
Eau	5%
Tocophérol	0,05 %
Palmitate de vitamine A	0,1 %
Phospholipides	0,5 %
Céramides 3	0,1%
Polyacrylamide & C ₁₄₋₁₃ isoparaïne & laureth-7	2-3,5 %

Crème solaire sous forme de lait pour peaux vieilles par le soleil**[0141]**

A-Phase huileuse	
Monostéarate de glycérol	2%
Stéarate de PEG-100	3%
Benzoate d'alkyle en C12 à C15	10%
Diméthicone	5%
Acétate de tocophérol	1%
Octyl-triazone (Uvinul T150)	1,5%
Butyl-méthoxy-dibenzoyl-méthane (Eusolex 9020)	2,0%
Alcool cétostéarylique	1%
B-Phase aqueuse	
Eau	qsp. 100%
Conservateurs	0,6%

CH 706 322 A2

Glycérine	7%
Hexylène glycol	3,0%
Carbomer	0,5%
EDTA tétrasodique	0,2%
Peptide à 300 PPM	1%
Hyaluronate de sodium HPM	0,1 %
Eau	5%
NaOH	0,5%
Conservateurs + parfum	q.s.

Crème antirides post-chirurgicale

[0142]

A-Phase huileuse	
Squalane	5%
Alcool cétylique	2%
Diméthicone	5%
Palmitate d'octyle	5%
B-Phase aqueuse	
Butylène glycol	0,5–4%
Eau	qsp. 100%
Peptide à 300 PPM	1%
Glycérine	2.0%
Hexylène glycol	3,0%
Gomme xanthane	0,5%
Conservateurs	q.s.
C-Composants ajoutés dans l'émulsion, à une température inférieure à	40 °C
Acétate de tocophérol	0,1–1%
Pyridoxine	0,01–0,05%
Palmitate de vitamine A	0,01–1%
D-Panthénol	0,1–1%
Acide citrique	0,1– 0,5%
Gluconate de zinc	0,1–1%
Citrate trisodique	1–2,5%
Eau	5%

Lotion nettoyante pour peaux matures**[0143]**

Polysorbate 20	1,0%
Caprylyl/capryl-glucoside (Oramix CG110)	2,0 %
Peptide à 300 PPM	0,1%
Cocoate de PEG-7 glycéryle	0,5%
Hexylène glycol	4–5%
D-Panthénol	0,1%
Mannitol	0,02%
Conservateurs	q.s.
Eau	qsp. 100%

Shampooing conditionneur 2 en 1 pour la repigmentation des cheveux**[0144]**

Eau	q.s. 100 %
Polymère croisé d'acrylates 4	9%
PEG-7 amodiméthicone	1,5 %
Laurylsulfate d'ammonium, laureth-sulfate d'ammonium, lauryl-glucoside et cocamide DEA	13%
Peptide à 300 PPM	2%
NaOH (solution à 18%)	0,84%
Cocamidopropyl-bétaïne (actif à 35 %)	2%
Lauramide DEA	2%
Mica et dioxyde de titane	0,02%
Conservateurs	0,5%
Colorant	0,15%
Parfum	0,5%

REFERENCES

[0145] Bigliardi et al. 2006, Differentiation, 74:174–185.
 Bigliardi et al. 2007, J Invest Dermatol., 127(6):1479-88
 Bigliardi et al., 2009, Exp Dermatol.;18(5):424-30
 Giacomoni et al., 2005, EMBO reports, 6, S45–S48
 Kauser et al, 2004, J Invest Dermatol, 123:184–195.
 Law and Loh, 1993, Mol. Pharmacol, 43: 684–693.
 Poumay et al., 2004, Arch Dermatol Res. 296(5):203-II
 Vives et al, Biochimie et Biophysica Acta, 2008,1786,126-138
 Yang et al, 2001, FEBS Lett.;509(2):213-7
 Yang et al., 2003, Peptides, 24(4):503-8

Revendications

1. Utilisation cosmétique d'un ligand agoniste des récepteurs opioïdes 6 pour la stimulation de la pigmentation de la peau ou des cheveux.

2. Utilisation selon la revendication 2, où l'agoniste des récepteurs opioïdes δ est sélectif pour les récepteurs opioïdes delta, et de préférence choisi dans le groupe constitué par BU-48, SNC-80, C-8813, DPI-287, DPI-221, TAN-67, BW373U86, SIOM, RWJ-394,674, la rubiscoline 6 et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes δ , la deltorphine et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes δ , la DPDPE, la DSLET, JOM-13, DSTBULET, BUBU, et BUBUC.
3. Utilisation selon la revendication 2, où l'agoniste des récepteurs opioïdes δ est un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes δ .
4. Utilisation selon la revendication 3, où l'agoniste des récepteurs opioïdes δ est un peptide qui a ou comprend la séquence de formule (I)
Y-P-X1-D-X2-X3 (I) (SEQ ID No 6)
dans laquelle XI représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;
X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I; et
X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.
5. Utilisation selon la revendication 4, où l'agoniste des récepteurs opioïdes δ est un peptide choisi dans le groupe constitué par un peptide possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes δ et comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPLDLV (SEQ ID No 15), YPIDLV (SEQ ID No 16), YPMDLV (SEQ ID No 17), YPLDIV (SEQ ID No 18), YPIDIV (SEQ ID No 19), YPMDIV (SEQ ID No 20), YPIDLV (SEQ ID No 21), YPIDIV (SEQ ID No 22), YPIDMV (SEQ ID No 23), YPIDII (SEQ ID No 24), YPMDII (SEQ ID No 25), YPMDL (SEQ ID No 26), YPIDL (SEQ ID No 27), et YPMDI (SEQ ID No 28).
6. Utilisation selon la revendication 5, où l'agoniste des récepteurs opioïdes δ est un peptide YPLDLF (SEQ ID No 1).
7. Composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés et au moins un additif cosmétique.
8. Composition cosmétique selon la revendication 7, où le peptide est un peptide qui a ou comprend la séquence de formule (I)
Y-P-X1-D-X2-X3 (I) (SEQ ID No 6)
dans laquelle XI représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;
X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I; et
X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.
9. Composition cosmétique selon la revendication 8, où le peptide est un peptide choisi dans le groupe constitué par un peptide possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes δ et comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPIDLV (SEQ ID No 15), YPMDLV (SEQ ID No 16), YPLDIV (SEQ ID No 17), YPIDIV (SEQ ID No 18), YPMDIV (SEQ ID No 19), YPIDLV (SEQ ID No 20), YPIDMV (SEQ ID No 21), YPIDII (SEQ ID No 22), YPMDII (SEQ ID No 23), YPMDL (SEQ ID No 24), YPIDL (SEQ ID No 25), et YPMDI (SEQ ID No 26), de préférence YPLDLF (SEQ ID No 1).
10. Utilisation cosmétique d'un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés pour la préparation d'une composition cosmétique pour une administration topique, intradermique, transdermique ou sous-cutanée.
11. Utilisation selon la revendication 10, où la composition cosmétique est destinée à la prévention et/ou à l'inversion des signes du vieillissement de la peau, et/ou au comblement des rides, à l'amélioration du caractère lisse de la peau et/ou à l'égalisation des marqueurs déséquilibrés dans une peau stressée, et/ou à la normalisation de l'expression génique perturbée dans les cellules de la peau, et/ou à l'effacement des rides en forme de pattes d'oie, et/ou à la récupération de l'hydratation de la peau, et/ou à la prévention de la perte d'eau trans-épidermique, et/ou à la réactivation de la différenciation des cellules de la peau, et/ou à la stimulation de la pigmentation.
12. Utilisation selon la revendication 10 ou 11, où le peptide est un peptide qui a ou comprend la séquence de formule (I)
Y-P-X1-D-X2-X3 (I) (SEQ ID No 6)
dans laquelle XI représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L, I, et M;

X2 représentant un acide aminé hydrophobe non aromatique, de préférence choisi dans le groupe constitué par L, I, et M, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par L et I; et
X3, présent ou absent, représentant un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi dans le groupe constitué par F, L, I, M, V et A, de manière davantage préférée choisi dans le groupe constitué par F, I, et V, et en particulier représentant F ou V.

13. Utilisation selon la revendication 12, où le peptide est un peptide choisi dans le groupe constitué par ou un peptide possédant une activité d'agoniste des récepteurs opioïdes 6 et comprenant une séquence choisie dans le groupe constitué par YPLDLF (SEQ ID No 1), YPIDLF (SEQ ID No 7), YPMDLF (SEQ ID No 8), YPLDIF (SEQ ID No 9), YPLDLL (SEQ ID No 10), YPLDLI (SEQ ID No 11), YPLDLM (SEQ ID No 12), YPLDLV (SEQ ID No 13), YPLDLA (SEQ ID No 14), YPIDLV (SEQ ID No 15), YPMDLV (SEQ ID No 16), YPLDIV (SEQ ID No 17), YPIDIV (SEQ ID No 18), YPMDIV (SEQ ID No 19), YPIDLV (SEQ ID No 20), YPIDMV (SEQ ID No 21), YPIDII (SEQ ID No 22), YPMDII (SEQ ID No 23), YPMDL (SEQ ID No 24), YPIDL (SEQ ID No 25), et YPMDI (SEQ ID No 26).
14. Utilisation selon la revendication 13, où le peptide est YPLDLF (SEQ ID No 1).
15. Dispositif comprenant un peptide choisi parmi la rubiscoline 6 et ses dérivés, le dispositif étant capable de délivrer ledit peptide par l'intermédiaire d'une injection intra-épidermique et/ou intradermique et/ou sous-cutanée.

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25 SEQUENCE LISTING

<110> INDUCHEM HOLDING AG
 <120> utilisation d'agonistes des récepteurs opioïdes delta dans le domaine de la cosmétique et de la dermocosmétique
 <130> B1320
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Rubiscolin-6
 <400> 1

Tyr Pro Leu Asp Leu Phe
 1 5

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> deltorphin

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> D-configuration

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> AMIDATION

<400> 2

Tyr Met Phe His Leu Met Asp
 1 5

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> dérivé de deltorphin

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> D-configuration

<220>
 <221> MOD_RES

CH 706 322 A2

81320FR SEQ LIST.ST25

<222> (7)..(7)
<223> AMIDATION

<400> 3

Tyr Ala Phe Asp Val Val Gly
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de deltorphin

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> D-configuration

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDATION

<400> 4

Tyr Ala Phe Glu Val Val Gly
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de deltorphin

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> D configuration

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> AMIDATION

<400> 5

Tyr Leu Phe Ala Asp Val Ala Ser Thr Ile Gly Asp Phe Phe His Ser
1 5 10 15

Ile

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial sequence

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25

<220>

<223> Formula (I)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X1 étant un acide aminé non-aromatique hydrophobe, de préférence L, I, M, V ou A, de préférence encore L, I, ou M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X2 = being a non-aromatic hydrophobic amino acid, preferably L, I, or M, more preferably L or I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X3, présent ou absent, étant un acide aminé hydrophobe, de préférence F, L, I, M, V ou A, de préférence encore F, I, ou V,

<400> 6

Tyr Pro Xaa Asp Xaa Xaa
1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 7

Tyr Pro Ile Asp Leu Phe
1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 8

Tyr Pro Met Asp Leu Phe
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 9

Tyr Pro Leu Asp Ile Phe
1 5

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 10

Tyr Pro Leu Asp Leu Leu
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 11

Tyr Pro Leu Asp Leu Ile
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 12

Tyr Pro Leu Asp Leu Met
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 13

Tyr Pro Leu Asp Leu Val
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 14

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25

Tyr Pro Leu Asp Leu Ala
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> artificia1

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 15

Tyr Pro Ile Asp Leu Val
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> artificia1

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 16

Tyr Pro Met Asp Leu Val
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> artificia1

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 17

Tyr Pro Leu Asp Ile Val
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> artificia1

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 18

Tyr Pro Ile Asp Ile Val
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> artificia1

<220>
<223> dérivé de rubiscolin-6

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25

<400> 19

Tyr Pro Met Asp Ile Val
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 20

Tyr Pro Ile Asp Leu Val
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 21

Tyr Pro Ile Asp Met Val
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 22

Tyr Pro Ile Asp Ile Ile
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 23

Tyr Pro Met Asp Ile Ile
1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

CH 706 322 A2

B1320FR SEQ LIST.ST25

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 24

Tyr Pro Met Asp Leu
1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> artificia1

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 25

Tyr Pro Ile Asp Leu
1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> artificia1

<220>

<223> dérivé de rubiscolin-6

<400> 26

Tyr Pro Met Asp Ile
1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> artificia1

<220>

<223> DPDPE

<400> 27

Asp Pro Asp Pro Glu
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> artificia1

<220>

<223> Rubiscolin-5

<400> 28

Tyr Pro Leu Asp Leu
1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> artificia1

B1320FR SEQ LIST.ST25

<220>
<223> Rubiscolin-4
<400> 29
Tyr Pro Leu Asp
1

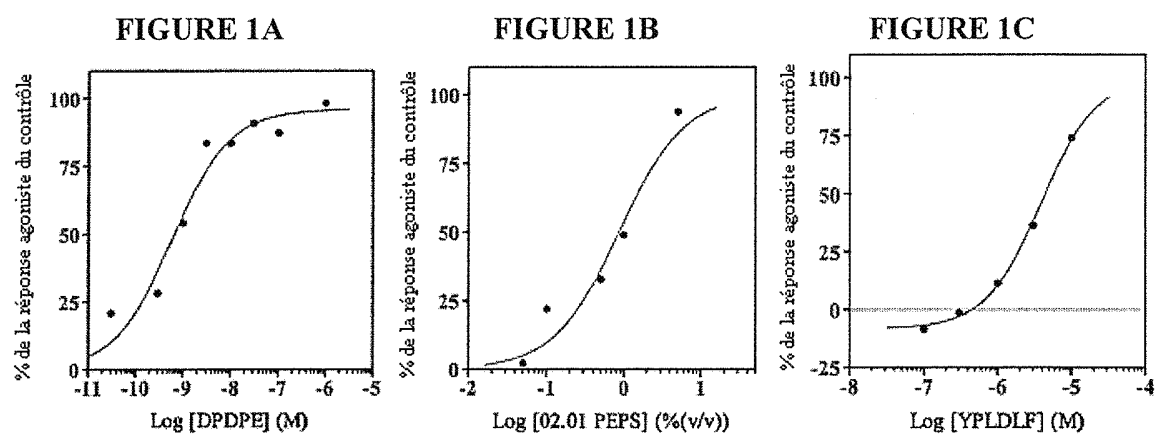


FIGURE 2

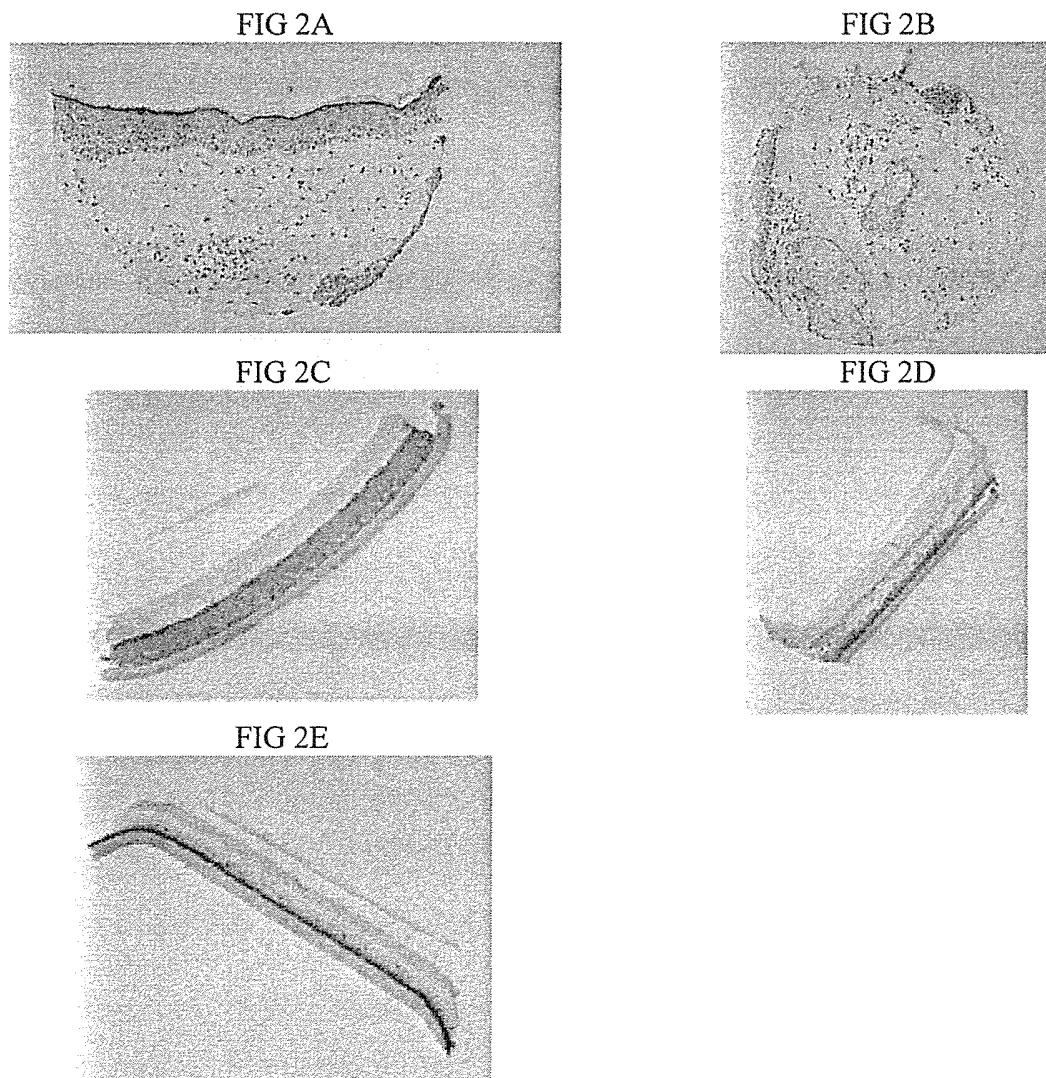


FIGURE 3A

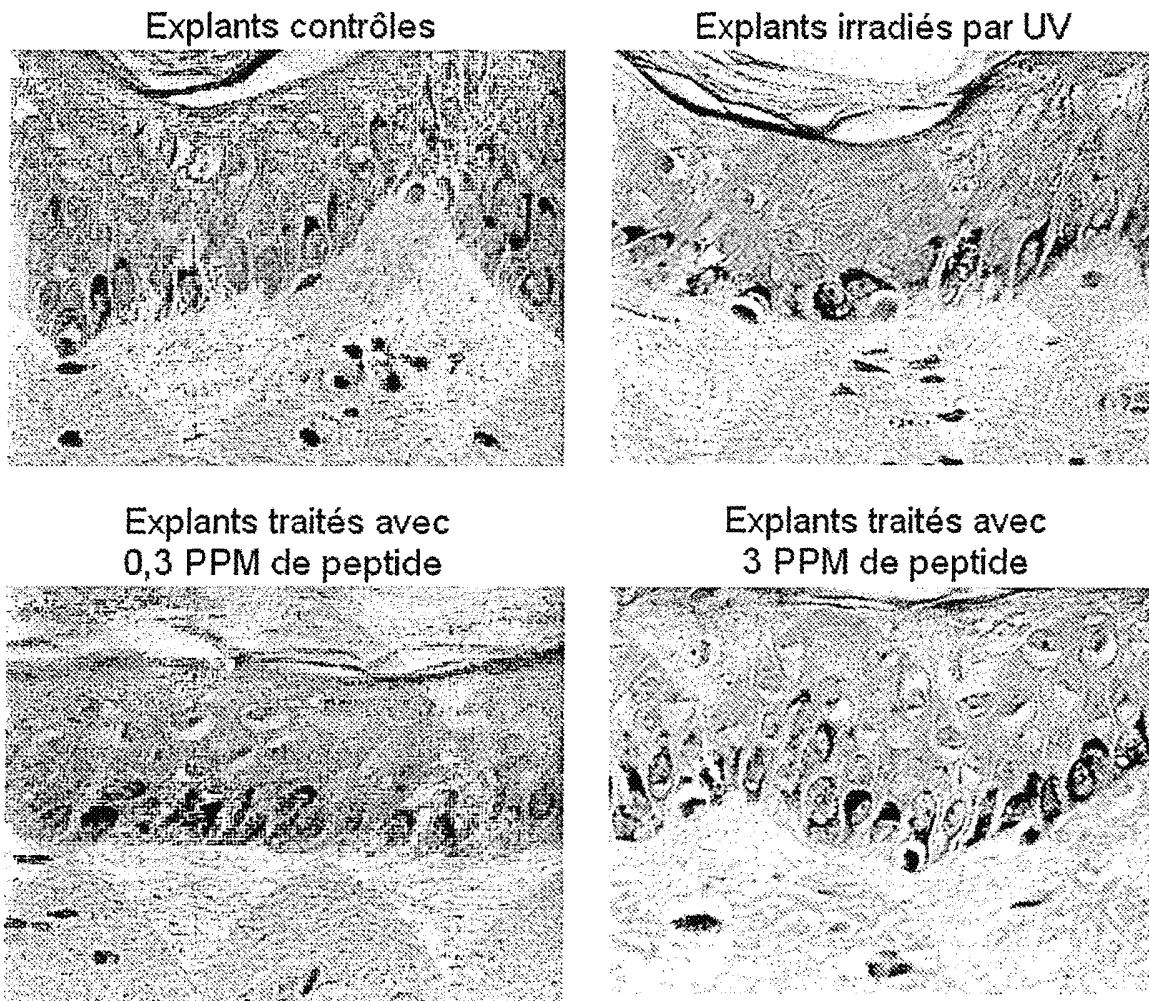


FIGURE 3B

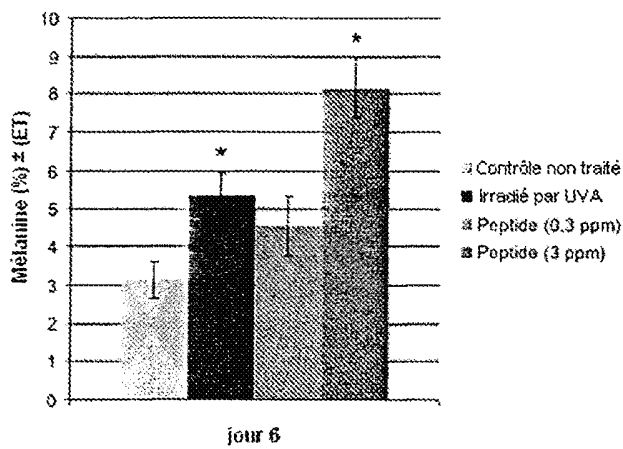


FIGURE 3C

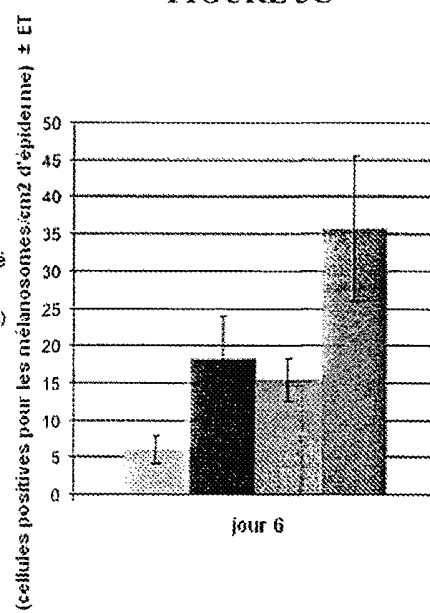


FIGURE 4A

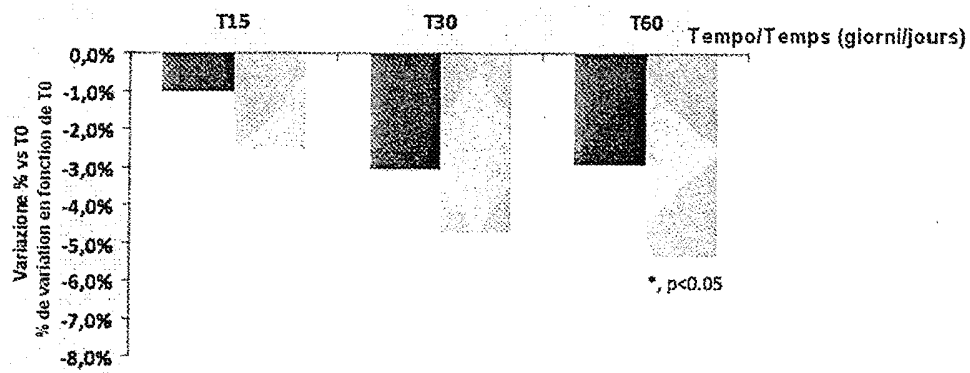


FIGURE 4B

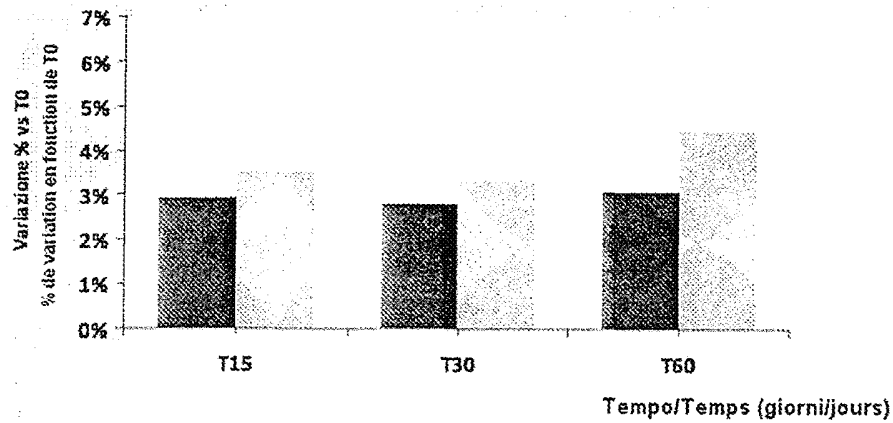


FIGURE 4C

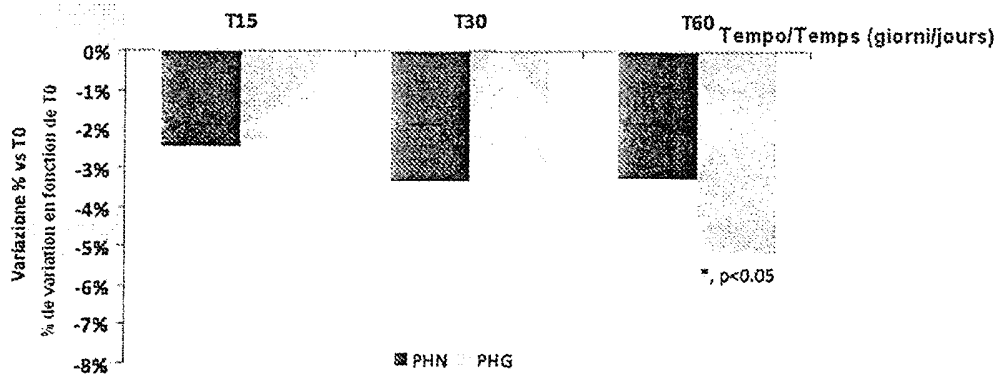


FIGURE 4D

