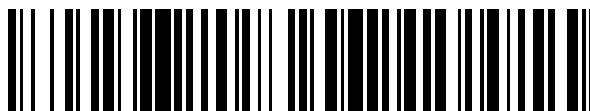


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 493**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007** **E 07730420 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2025681**

54 Título: **Péptidos sintéticos utilizados para el tratamiento de la piel y el uso de los mismos en composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas**

30 Prioridad:

31.03.2006 ES 200600846

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

13.04.2016

73 Titular/es:

LIPOTEC, S.A. (100.0%)
C/ Isaac Peral 15, Pol. Ind. Camí Ral
08550 Gavá, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

ALMIÑANA DOMENECH, NURIA;
VAN DEN NEST, WILL;
CARREÑO SERRAIMA, CRISTINA;
CEBRIÁN PUCHE, JOAN;
PASSERINI, ELENA y
PUIG MONTIEL, ARTURO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 493 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos sintéticos utilizados para el tratamiento de la piel y el uso de los mismos en composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a péptidos sintéticos que regulan la fibrillogénesis y a composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas que contienen dichos péptidos útiles en el tratamiento de la piel, preferentemente para el tratamiento de aquellas afecciones de la piel que requieren una regulación de la fibrillogénesis tal como el tratamiento de la piel envejecida (bien sea envejecimiento intrínseco debido al paso del tiempo y a factores genéticos, o extrínseco debido a la exposición prolongada al sol y/o a contaminantes ambientales tales como la radiación ultravioleta (UV) de la luz solar, los contaminantes químicos, el humo de los cigarrillos y la polución), o como coadyuvantes en los procesos de cicatrización para suavizar el aspecto de las cicatrices.

Antecedentes de la invención

- 15 La piel está formada por dos capas: la epidermis y la dermis. La capa más externa es la epidermis, que está compuesta en su mayor parte por queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans, y su función básica es retener el agua del cuerpo, actuar como mecanismo de barrera frente a agentes químicos dañinos así como frente a organismos patógenos y llevar a cabo los procesos de renovación celular. La capa más interna, la dermis, formada por fibroblastos, adipocitos y macrófagos, está unida fuertemente a la epidermis a través de la membrana basal, y contiene numerosas terminaciones nerviosas que proporcionan las sensaciones del tacto y la temperatura. Alberga también los folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, glándulas apocrinas y vasos sanguíneos, y una de sus funciones principales es mantener la elasticidad y el aspecto de la piel.

- 20 La dermis también incluye la matriz extracelular, formada por un conjunto de proteínas extracelulares (proteínas fibrosas, glucoproteínas y proteoglucanos) cuya función clave es la de mantener la estructura de la piel, y el correcto funcionamiento y desarrollo de los tejidos depende de que su formación y regulación sea correcta [Wiberg C., Klatt A.R., Wagener R., Paulsson M., Bateman J.F., Heinegard D. y Morgelin M. (2003) "Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan" J. Biol. Chem. 278, 37698-37704]. Las dos proteínas fibrosas más importantes de la matriz extracelular son el colágeno y la elastina, responsables de las propiedades mecánicas de los tejidos, tales como la capacidad de resistir la tracción, compresión, extensibilidad y torsión. Los proteoglucanos tienen una función estructural y metabólica, mientras que las glucoproteínas, junto con los proteoglucanos, sirven de puentes de unión entre los componentes de la matriz y las células [Aumailley M. y Gayraud B. (1998) "Structure and biological activity of the extracellular matrix" J. Mol. Med. 76, 253-265; Culav E.M., Clark C.H. y Merrilees M.J. (1999) "Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy" Phys. Ther. 79, 308-319; Scott J.E. (2003) "Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model" J. Physiol. 553, 335-343].

Colágeno

- 35 Los colágenos son una familia de proteínas fibrosas de la matriz extracelular que constituyen el 25 % del total de la masa proteica en mamíferos. Se han clasificado en más de 20 familias, todas con características individuales que cumplen funciones específicas en distintos tejidos.

- 40 La característica principal del colágeno es su estructura helicoidal formada por asociación de tres cadenas polipeptídicas, ricas en glicina y prolina. Las alteraciones en su composición de aminoácidos provocan una disfunción y pérdida de sus propiedades mecánicas [Culav E.M., Clark C.H. y Merrilees M.J. (1999) "Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy" Phys. Ther. 79, 308-319]. Estas cadenas polipeptídicas pueden asociarse entre sí formando las fibrillas, que tienen un diámetro de 10-300 nm y una longitud de hasta varios cientos de micrómetros en tejidos maduros. Estas fibrillas a menudo se agregan en estructuras mayores, tal como haces de cables, que pueden verse por microscopía electrónica como fibras de colágeno de varios micrómetros de diámetro. A este proceso se le conoce como fibrillogénesis [Aumailley M. y Gayraud B. (1998) "Structure and biological activity of the extracellular matrix" J. Mol. Med. 76, 253-265]. No todos los colágenos tienen la capacidad de formar fibrillas; sólo los colágenos tipo I, II, III, V y XI, a los que se conoce como colágenos fibrilares.

- 45 La dermis de un adulto está formada básicamente por los colágenos fibrilares de tipo I (el 80-90 %), III, y V. En general, las fibras de colágeno de tipo I presentan un diámetro mayor, una característica que se correlaciona con su capacidad de soportar una mayor carga mecánica. El colágeno de tipo II desempeña un papel en la extensibilidad del tejido, y con el paso de los años lo reemplazan moléculas de colágeno de tipo I, un proceso que es parcialmente responsable de que las pieles maduras sean menos extensibles que las infantiles. El colágeno de tipo V se asocia con los de tipo I y III regulando el diámetro de las fibrillas ["The Biology of the Skin", Freinkel R.K. y Woodley D.T., eds. The Parthenon Publishing Group, 2001; Culav E.M., Clark C.H. y Merrilees M.J. (1999) "Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy" Phys. Ther. 79, 308-319].

Las mutaciones en la molécula de colágeno o en las moléculas implicadas en la fibrillogénesis del colágeno pueden conducir a un colágeno desestructurado, como el que se encuentra en patologías tales como el síndrome de Ehlers-

Danlos [Ameys L. y Young M.G. (2002) "Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel *in vivo* models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy and corneal diseases" *Glycobiology* 12, 107R-116R]. Asimismo, la exposición prolongada a los rayos UV puede dañar la arquitectura del colágeno y provocar su sustitución por un colágeno menos estructurado con el posterior adelgazamiento de la piel y la formación de arrugas. Por último, el daño a la arquitectura del colágeno puede dar lugar a la deposición de colágeno desorganizado durante los procesos de reparación, como se produce en los procesos de cirrosis hepática, fibrosis pulmonar o formación de cicatrices dérmicas. Por lo tanto, la regulación de la organización del colágeno puede ser potencialmente útil no sólo para tratamientos cosméticos o dermofarmacéuticos, sino también para tratar diversas afecciones clínicas.

Proteoglucanos

Los proteoglucanos constituyen uno de los componentes principales de la matriz extracelular y se caracterizan por tener un núcleo proteico unido covalentemente a carbohidratos llamados glucosaminoglucanos (GAG). Están implicados en muchos de los procesos celulares que se producen mediante interacciones moleculares en la superficie de las células, tales como las interacciones célula-matriz extracelular, célula-célula y receptor-ligando, ya que se unen ávidamente a proteínas, y son muy abundantes en estas regiones [Perrimon N. y Bernfield M. (2001) "Cellular functions of proteoglycans- an overview" *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 65-67]. Los proteoglucanos actúan como organizadores de los tejidos, facilitan el crecimiento celular y la maduración de tejidos especializados, desempeñan un papel imprescindible como filtros biológicos y regulan la actividad de los factores de crecimiento [Iozzo R.V. (1998) "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function" *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609-652; Ruoslahti E. (1989) "Proteoglycans in cell regulation" *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13372].

Los GAG son polímeros formados por repeticiones de disacáridos, en general un aminoazúcar acetilado (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina) alternando con ácido urónico (glucuronato o iduronato), y presentan un índice elevado de grupos sulfato, excepto el ácido hialurónico. Debido a su elevado contenido en grupos ácidos, están cargados negativamente y tienden a atraer cationes tales como el Na^+ y, al ser osmóticamente activos, atraen agua y permiten mantener la hidratación de los tejidos. Los GAG más comunes son ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato [Sugahara K. y Kitagawa H. (2000) "Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans" *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 518-527; Zamfir A., Seidler D.G., Kresse H. y Peter-Katalinic J. (2003) "Structural investigation of chondroitin/dermatan sulfated oligosaccharides from human skin fibroblast decorin" *Glycobiology* 13, 733-742].

Un tipo de proteoglucanos son los así llamados "proteoglucanos ricos en leucina", que no interactúan con ácido hialurónico y están implicados en la estructuración de las matrices extracelulares, en la modulación de la actividad de factores de crecimiento así como en la regulación de las propiedades del crecimiento de las células [Iozzo R.V. (1997) "The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth" *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 141-174]. Aunque los distintos proteoglucanos ricos en leucina presentan características estructurales comunes, difieren claramente en su regulación genética, en su patrón de expresión así como en sus interacciones funcionales [Ramamurthy P., Hocking A.M. y McQuillan D.J. (1996) "Recombinant decorin glycoforms. Purification and structure" *J. Biol. Chem.* 271, 19578-19584].

Los proteoglucanos de la piel incluyen versicano, decorina, biglucano y ácido hialurónico. Estas moléculas se localizan en áreas específicas de la piel. Así, la decorina está en asociación con las fibras dérmicas [Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D. y Robey P.G. (1990) "Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues" *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1549-1563], el biglucano se encuentra en queratinocitos diferenciadores en la epidermis y en el endotelio vascular [Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D. y Robey P.G. (1990) "Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues" *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1549-1563] y el versicano se detecta en la lámina basal de la epidermis y en asociación con las fibras de la red elástica de la dermis, así como en las glándulas sudoríparas y en el recubrimiento del folículo piloso [Zimmermann D.R., Dours-Zimmermann M.T., Schubert M. y Bruckner-Tuderman L. (1994) "Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis" *J. Cell Biol.* 124, 817-825]. Otros estudios indican que el versicano no está presente en el epitelio de la piel adulta, aunque sí está presente en los tejidos conectivos adyacentes a estas áreas, incluyendo la dermis, y en el recubrimiento de los folículos pilosos [Carrino D.A., Sorrell J.M. y Caplan A.I. (2000) "Age-related changes in the proteoglycans of human skin" *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 91-101].

Decorina

La decorina se considera que es uno de los proteoglucanos clave en la regulación de la estructuración y función de muchos de los elementos de la matriz extracelular. La decorina se une a factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$), a otras proteínas de la matriz extracelular tal como la fibronectina y la trombospodina, a receptores de membrana celular (receptor de endocitosis de la decorina), y también puede interferir de forma directa sobre el ciclo celular a través de la inducción de p21, un inhibidor potente de la cinasa dependiente de ciclina (CDK) [Stander M., Naumann U., Wick W. y Weller M. (1999) "Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth" *Cell Tissue Res.*

296, 221-227].

Muchos de los estudios sobre la interacción de la decorina son respecto a la unión al colágeno de tipo I, aunque se sabe que también interaccionan con otros colágenos tales como los tipos II, III y VI. Aunque se considera que el principal factor que influye en la formación de las fibrillas de colágeno *in vivo* es la propia estructura del colágeno, hay distintas moléculas, tales como la decorina, que pueden regular y ajustar este proceso. La decorina retrasa y hace difícil la formación de las fibrillas, provoca una consecuente reducción de los diámetros promedio de las fibrillas y fuerza a las fibras de colágeno a adoptar una distribución espacial regular [Danielson K.G., Fazzio A., Cohen I., Cannizzaro L.A., Eichstetter L. y Iozzo R.V. (1993) "The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23" *Genomics* 15, 146-160]. Este proceso está mediado por el núcleo proteico del proteoglicano, y requiere que conserve su estructura terciaria [Svensson L., Heinegard D. y Oldberg A. (1995) "Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5" *J. Biol. Chem.* 270, 20712-20716; Keene D.R., Ridgway C.C. y Iozzo R.V. (1998) "Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin" *J. Histochem. Cytochem.* 46, 215-220]. Existe evidencia de que la triple hélice del colágeno de tipo I tiene un sitio de unión a decorina específico [Keene D.R., Ridgway C.C. y Iozzo R.V. (1998) "Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin" *J. Histochem. Cytochem.* 46, 215-220] y de que existen interacciones adicionales con moléculas de dermatán sulfato [Kresse H., Liszio C., Schonherr E. y Fisher L.W. (1997) "Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen" *J. Biol. Chem.* 272, 18404-18410]. La decorina se une a dos moléculas paralelas adyacentes de colágeno de la fibrilla, ayudando a estabilizar la fibrilla y orientar la fibrillogénesis. Al estar unida a la superficie de las fibrillas de colágeno, la interacción lateral entre las triples hélices de colágeno se hace más difícil, ya que actúa de espaciador, y el diámetro de las fibrillas disminuye, controlando así las dimensiones de las fibrillas, en concreto la uniformidad de su diámetro y la distancia regular entre ellas, permitiéndole así mantener la forma del tejido [Tenni R., Viola M., Welser F., Sini P., Giudici C., Rossi A. y Tira M.E. (2002) "Interaction of decorin with CNBr peptides from collagens I and II. Evidence for multiple binding sites and essential lysyl residues in collagen" *Eur. J. Biochem.* 269, 1428-1437; Scott J.E. (1996) "Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen" *Biochemistry* 35, 8795-8799].

La importancia de estas interacciones de decorina con el colágeno también se ha demostrado *in vivo* mediante los ratones transgénicos que no tienen el gen de la decorina y, por tanto, no producen decorina en su organismo. Estos animales son viables, pero presentan una piel muy frágil, con la dermis muy delgada, con una fuerza elástica reducida y resistencia a la tracción reducida, y su análisis histopatológico muestra que sus fibrillas de colágeno tienen diámetros irregulares a lo largo de las fibrillas debido a agregaciones laterales incontroladas [Kresse H., Liszio C., Schonherr E. y Fisher L.W. (1997) "Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen" *J. Biol. Chem.* 272, 18404-18410; Danielson K.G., Baribault H., Holmes D.F., Graham H., Kadler K.E. y Iozzo R.V. (1997) "Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility" *J. Cell. Biol.* 136, 729-743; Keene D.R., Ridgway C.C. y Iozzo R.V. (1998) "Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin" *J. Histochem. Cytochem.* 46, 215-220]. Esta observación concuerda con el hecho ampliamente aceptado de que la fuerza de la piel se correlaciona directamente con la organización general, el contenido y las propiedades físicas de la red de colágeno fibrilar [Dombi G.W., Haut R.C. y Sullivan W.G. (1993) "Correlation of high-speed tensile strength with collagen content in control and lathyrus rat skin" *J. Surg. Res.* 54, 21-28]. Además, dichos animales transgénicos también tienen una degradación de colágeno aumentada, lo que contribuye a la poca calidad de su piel [Schaefer L., Macakova K., Raslik I., Micegova M., Gröne H.-J., Schönher E., Robenek H., Echtermeyer F.G., Grässel S., Bruckner P., Schaefer R.M., Iozzo R.V. y Kresse H. (2002) "Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction" *Am. J. Pathol.* 160, 1181-1191]. Se pueden observar también una organización irregular de las fibrillas de colágeno en distintas patologías humanas que conducen a fenotipos con la piel frágil, lo que sugiere que la alteración de los procesos de fibrillogénesis es suficiente para provocar una piel frágil y una estructura desorganizada de la matriz, y por consiguiente los individuos que tienen un proceso de fibrillogénesis desregulado tienen una mayor incidencia de lesiones así como de procesos de cicatrización anormales [Keene D.R., Ridgway C.C. y Iozzo R.V. (1998) "Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin" *J. Histochem. Cytochem.* 46, 215-220; Iozzo R.V. (1999) "The biology of the small leucine-rich proteoglycans" *J. Biol. Chem.* 274, 18843-18846].

La decorina no sólo interacciona con las fibras de colágeno, sino que también interacciona con otras proteínas estructurales. Esto es debido presumiblemente a su estructura tridimensional en forma de herradura, donde las repeticiones de las regiones ricas en leucina se disponen de forma paralela, siendo necesarias sólo algunas repeticiones para su unión a un ligando [Schonherr E., Broszat M., Brandan E., Bruckner P. y Kresse H. (1998) "Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen" *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 241-248]. De los resultados de estudios de dinámica molecular realizados se deduce que la cara cóncava de la herradura de la decorina tiene una abertura con un ángulo suficiente para dar cabida a una triple hélice, con un diámetro de aproximadamente 2 nm, que es ligeramente superior al diámetro de una molécula de colágeno (1,5 nm), mientras que los brazos de la herradura tienen un grosor similar a la molécula de colágeno [Kresse H., Liszio C., Schonherr E. y Fisher L.W. (1997) "Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen" *J. Biol. Chem.* 272, 18404-18410; Scott J.E.

(1996) "Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen" *Biochemistry* 35, 8795-8799].

Los estudios estructurales teóricos realizados consideran la hipótesis que son las regiones Lys¹³⁰-Arg¹³³ y Arg²⁷²-His²⁷⁵ de la decorina las responsables de la unión a colágeno, concretamente a la región Asp⁸⁵⁷-Arg-Gly-Glu⁸⁶⁰ [Kresse H., Liszio C., Schonherr E. y Fisher L.W. (1997) "Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen" *J. Biol. Chem.* 272, 18404-18410]. Las dos regiones de la decorina se encuentran una en cada brazo de la herradura, aproximadamente equidistantes de los extremos de la molécula, en sentido antiparalelo. Sin embargo, el hecho de que la decorina adopte una forma de herradura hace que la secuencia lineal rote 180° de un brazo de la herradura al otro, estando realmente los dos fragmentos en disposición paralela. Por lo tanto, se consigue una complementariedad de cargas de los restos de las cadenas laterales implicados en la interacción [-,+,-,0,-] para colágeno y [+,-,0,+] para los fragmentos de decorina, que parece ser crítica para estabilizar la interacción entre las dos moléculas [Scott J.E. (1996) "Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen" *Biochemistry* 35, 8795-8799].

Envejecimiento

La piel experimenta cambios dramáticos con la edad, que incluyen cambios en su morfología, fisiología y en sus propiedades mecánicas. La piel de los bebés es lisa y suave, con una capa gruesa de grasa y una capa protectora muy fina de queratina, mientras que la piel de los ancianos es muy delgada y presenta muchas arrugas, con una capa de grasa muy pequeña. La matriz extracelular también experimenta cambios con la edad, y estos contribuyen al grupo de cambios de las propiedades físicas de la piel relacionados con el envejecimiento [Wiberg C., Klatt A.R., Wagener R., Paulsson M., Bateman J.F., Heinegard D. y Morgelin M. (2003) "Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan" *J. Biol. Chem.* 278, 37698-37704]. La exposición prolongada al sol y a los contaminantes ambientales acelera el proceso de envejecimiento de la piel, ya que la exposición a los rayos UV inhibe la síntesis de colágeno y fibronectina en fibroblastos y cataliza la degradación del colágeno estimulando la síntesis de las enzimas que lo degradan (metaloproteasas de matriz). Se han descrito cambios en las moléculas de colágeno de tipo I, que son los componentes principales de la matriz extracelular de la dermis [Hunzelmann N., Ueberham U., Eckes B., Hermann K. y Krieg T. (1997) "Transforming growth factor-beta reverses deficient expression of type (I) collagen in cultured fibroblasts of a patient with metageria" *Biochim. Biophys. Acta.* 1360, 64-70].

La industria cosmética ha realizado importantes esfuerzos para contrarrestar esta pérdida de la funcionalidad de los componentes de la matriz extracelular con la edad. El balance entre la producción y la degradación de biomoléculas imprescindibles de la piel (por ejemplo el colágeno) tiende, con la edad, hacia los procesos de degradación, y esto conduce a un adelgazamiento y desorganización progresivos de la dermis, lo que provoca flacidez en la dermis con la posterior formación de arrugas. A nivel microscópico, el colágeno de la piel envejecida (tanto piel envejecida cronológicamente -pieles maduras- como piel envejecida por exposición prolongada al sol o a los contaminantes ambientales) se caracteriza por tener fibrillas gruesas organizadas de manera similar a haces de cables, que no están tan alineadas como en la piel joven [Oikarinen A. (1990) "The aging of the skin: chronoaging versus photoaging" *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7, 3-4]. Por lo tanto, los procedimientos que permitan una mejor organización de las fibras de colágeno tendrán un potencial efecto beneficioso sobre la piel madura o sobre la piel envejecida, permitiéndoles recuperar parcialmente las propiedades mecánicas (elasticidad, flexibilidad y firmeza) que perdieron con la edad o la exposición al sol y/o a los contaminantes ambientales y que tengan un mejor aspecto, con menor presencia de arrugas y más tersa.

Además del colágeno, la matriz extracelular dérmica también contiene proteoglucanos que están implicados en las propiedades de los tejidos y que se ven alterados con el envejecimiento. Entre ellos, la decorina se cataboliza en un fragmento que se conoce como decorunt, que corresponde a una versión de la decorina que carece del fragmento carboxilo terminal. Las pieles de origen fetal, sin embargo, no tienen niveles detectables de decorunt, mientras que los niveles máximos de decorunt se determinan a partir de los 30 años, que es la edad a partir de la cual se empiezan a manifestar los signos del envejecimiento. La capacidad de decorunt para unirse a una molécula de colágeno es 100 veces menor que la de la decorina por sola, un factor que se correlaciona con el hecho de que decorunt carece justamente de una de las regiones de la decorina que es imprescindible para la unión al colágeno [Wiberg C., Klatt A.R., Wagener R., Paulsson M., Bateman J.F., Heinegard D. y Morgelin M. (2003) "Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan" *J. Biol. Chem.* 278, 37698-37704]. Sabiendo que la decorina influye en los procesos de fibrillogénesis del colágeno y regula el diámetro de las fibrillas, la presencia de decorunt puede tener un efecto importante sobre la elasticidad y las diferencias morfológicas entre las fibras de colágeno de la piel joven y las de la piel envejecida [Carrino D.A., Sorrell J.M. y Caplan A.I. (2000) "Age-related changes in the proteoglycans of human skin" *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 91-101]. También se ha demostrado que la síntesis de decorina está disminuida en la piel envejecida por la exposición prolongada al sol o a los contaminantes ambientales [Bernstein E.F., Fisher L.W., Li K., LeBaron R.G., Tan E.M. y Uitto J. (1995) "Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. Comparison by immunohistochemical and northern analyses" *Lab. Invest.* 72, 662-669], por lo tanto este tipo de piel tiene una desorganización del colágeno. Por lo tanto, la disminución del contenido de decorina funcional de la piel envejecida, se deba ya sea a la edad o a la exposición prolongada al sol y a los contaminantes ambientales,

está relacionada de forma directa con la formación de una red de colágeno fibrilar desestructurada, que conduce a una piel frágil, menos elástica y con menos resistencia a la tracción.

Cicatrización

La curación de heridas en los adultos es un complicado proceso reparativo. El proceso de curación comienza con la incorporación de una diversidad de células especializadas para su traslado al sitio de la herida, e implica la deposición de matriz extracelular y membrana basal, angiogénesis, actividad selectiva de proteasa y reepitelización. Un componente importante del proceso de curación en los mamíferos adultos es la estimulación de fibroblastos para generar la matriz extracelular. Esta matriz extracelular es un componente principal del tejido conectivo que se desarrolla para reparar la zona de la herida.

El tejido conectivo que se forma durante el proceso de curación tiene a menudo una naturaleza fibrosa. Una cicatriz es una estructura morfológica anormal resultante de una lesión o herida previa (tal como, por ejemplo, una incisión, una escisión o un trauma), y está formada de un tejido conectivo que es, de forma predominante, una matriz de colágeno de los tipos I y II y fibronectina. En la piel la cicatriz consta de fibras de colágeno en una organización anormal, así como de una deposición de colágeno en exceso. En los mamíferos, cuando la cicatriz se eleva sobre la piel, presentando un aspecto abultado, se debe al hecho de que contienen colágeno en exceso dispuesto de manera irregular, y se clasifican como cicatrices hipertróficas. Un queloide es otra forma de cicatrización patológica que no solamente se eleva sobre la superficie de la piel, sino que se extiende también hasta más allá de los límites de la lesión original, y también tiene una cantidad excesiva de tejido conectivo que está organizado de manera anormal, formando de forma predominante bandas vorticiales de tejido conectivo. Un análisis del contenido de decorina en cicatrices hipertróficas muestra que su concentración es de sólo el 25 % de la encontrada en tejidos sanos [Scott P.G., Dodd C.M., Ghahary A., Shen J. y Tredget E.E. (1998) "Fibroblasts from post-burn hypertrophic scar tissue synthesize less decorin than normal dermal fibroblasts" Clin. Sci. (Lond). 94, 541-547], un hecho que explica la organización irregular del colágeno presente en las cicatrices hipertróficas.

Asimismo, se han detectado formas truncadas de decorina en cicatrices hipertróficas [Honda T., Matsunaga E., Katagiri K., y Shinkai H. (1986) "The proteoglycans in hypertrophic scar" J. Dermatol. 13, 326-333; Garg H.G., Lippay E.W., Burd D.A.R y Neame P.J. (1990) "Purification and characterization of iduronic acid-rich and glucuronic acid-rich proteoglycans implicated in human post-burn keloid scar" Carbohydr. Res. 207, 295-305], y se ha demostrado que estas formas truncadas no son capaces de regular la formación de fibrillas de colágeno en un ensayo de fibrillogénesis [Carrino D.A., Önerfjord P., Sandy J.D., CS-Szabo G., Scott P.G., Sorrell J.M., Heinegard D. y Caplan A.I. (2003) "Age related changes in the proteoglycans of human skin" J. Biol. Chem. 278, 17566-17572].

La presencia de cicatrices en la piel es un factor que la mayoría de los seres humanos no aceptan estéticamente. El sector médico ha realizado importantes esfuerzos en desarrollar procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos, tal como las artroscopias o las laparoscopias, que no sólo disminuyen los riesgos de complicaciones postquirúrgicas sino que también tienen la ventaja de dejar cicatrices de tamaños muy pequeños o apenas visibles. A pesar de estos esfuerzos, la mayoría de las intervenciones quirúrgicas continúan llevándose a cabo mediante cirugía abierta, de modo que el control del correcto proceso de cicatrización continúa siendo una cuestión de vital importancia. Evitar la formación de cicatrices hipertróficas y/o queloides, que tiene un colágeno organizado de forma irregular, es uno de los objetivos del sector cosmético y del dermofarmacéutico. Por lo tanto, los procedimientos que permitan una mejor organización de las fibras de colágeno tendrán un potencial efecto beneficioso sobre las cicatrices, permitiéndoles suavizar su apariencia.

Por lo tanto, las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas que contengan moléculas que imiten la actividad de la decorina mediante la interacción con las fibrillas o las fibras de colágeno, regulando el proceso de fibrillogénesis, son candidatas potenciales para su uso como productos antienvjecimiento con el fin de aumentar la elasticidad, firmeza, estructuración y flexibilidad de la piel, o como coadyuvantes en tratamientos postquirúrgicos con el fin de suavizar la apariencia de las cicatrices.

Existen distintas patentes con una aplicación cosmética o dermofarmacéutica que mencionan la decorina para el tratamiento o prevención del envejecimiento, así como para suavizar la apariencia de las cicatrices. La solicitud de patente US2003/0124152 describe el uso de la decorina en composiciones cosméticas o dermatológicas para el tratamiento del envejecimiento intrínseco (debido al paso del tiempo y a factores genéticos) o extrínseco (debido a la exposición prolongada al sol o a contaminantes ambientales tales como la radiación ultravioleta (UV), los contaminantes químicos, el humo de los cigarrillos y la polución). La patente US5.510.328 describe el uso de la decorina en composiciones farmacéuticas para reducir o inhibir la contracción de las heridas, y la patente US6.509.314 describe el uso de la decorina para la prevenir o reducir la cicatrización de las heridas. Existen otras patentes que describen extractos o compuestos vegetales que estimulan la síntesis de decorina endógena, tal como, por ejemplo, los descritos en las patentes JP2004051508, FR2834462, EP1367988, US6.551.602, US6.455.057, US6.440.434, US6.423.325, US6.287.553 y US6.042.841. En la bibliografía se han publicado trabajos de investigación centrados en la búsqueda de los dominios de unión de decorina a colágeno, que describen algunos péptidos sintéticos que son capaces de unirse al colágeno, y que potencialmente podrían tener la misma actividad que la decorina, pero todas las secuencias corresponden a fragmentos de la decorina nativa [Vides V.M., Laschinger C.A., Arora P.D., Lee W., Hakkinen L., Larjava H., Sodek J. y McCulloch C.A. (2005) "Collagen phagocytosis by

fibroblasts is regulated by decorin" J. Biol. Chem. 280, 23103-23113; Schonherr E., Broszat M., Brandan E., Bruckner P. y Kresse H. (1998) "Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen" Arch. Biochem. Biophys. 355, 241-248]. Sin embargo, no existe actualmente ninguna referencia al uso de péptidos no contenidos en la secuencia nativa de la decorina que imiten la acción de la decorina en su unión al colágeno, regulando la fibrillogénesis y ayudando a mantener una red de colágeno estructurada.

El primer inventor de la presente invención ha determinado que los péptidos sintéticos de la invención son eficaces en la regulación de la fibrillogénesis, imitando así la función de la decorina. La secuencia de los péptidos de la invención no está contenida en la secuencia nativa de la decorina, por lo tanto pueden considerarse como péptidos miméticos de la actividad de la decorina. En la bibliografía se ha postulado que para su unión a colágeno, y por consiguiente la regulación de la fibrillogénesis, las secuencias peptídicas deben tener cuatro aminoácidos con un patrón de cargas [+,-,0,+] [Scott J.E. (1996) "Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen" Biochemistry 35, 8795-8799], de modo que exista una complementariedad de cargas con el fragmento Asp⁸⁵⁷-Arg-Gly-Glu⁸⁶⁰ del colágeno que permita estabilizar la interacción. El primer inventor de la presente invención ha determinado que no todas las secuencias que cumplen dicha complementariedad de cargas que postula Scott son capaces de regular la fibrillogénesis. Aunque el péptido sintético RELH, que corresponde a la secuencia 272-275 de la decorina cumple el patrón de cargas y es capaz de regular la fibrillogénesis, los péptidos His-Asp-Ala-Arg, Orn-Asp-Nva-His, His-Asp-Ile-His, también cumplen el patrón de cargas pero no tienen efecto sobre la fibrillogénesis. Por lo tanto, el cumplimiento del patrón de cargas [+,-,0,+] que postula Scott no es un requisito suficiente para la regulación de la fibrillogénesis por parte de los péptidos que lo cumplan. De manera sorprendente, los estudios realizados por el primer inventor de la presente invención han establecido que la regulación de la fibrillogénesis está determinada por las secuencias peptídicas que tienen de un resto del aminoácido citrulina junto un patrón de cargas [+,-,0], tal como, por ejemplo, las secuencias Lys-Asp-Ile-Cit o Lys-Asp-Val-Cit. La patente RU2.181.728 describe un péptido sintético de 10 aminoácidos unido por medio de un puente disulfuro a un péptido de 12 aminoácidos que tiene una secuencia que incluye la secuencia Lys-Glu-Leu-Cit, que es a base de la molécula de interleucina 8 y estimula la migración de neutrófilos. A pesar del hecho de que dicho péptido cumple el patrón de cargas [+,-,0] y tiene un resto de citrulina contiguo, no está incluido dentro de la familia de los péptidos de la presente invención, ya que tiene un total de 22 aminoácidos. Además, dicha patente no proporciona ningún indicio ni sugiere que el péptido descrito sea capaz de inhibir la fibrillogénesis.

La solicitud internacional WO2006/008392 desvela el uso cosmético de por lo menos un tipo de tetrapéptido Ac-N-Ser-Asp-Lys-Pro natural o uno de los análogos del mismo, en la forma de un agente antienvjecimiento y reestructurante de la piel.

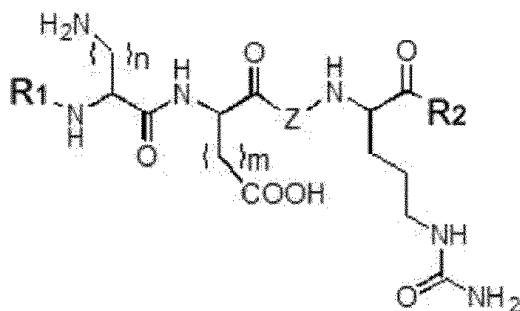
Por lo tanto, no existe indicio en el estado de la técnica de que la citrulina sea un resto necesario para la regulación de la fibrillogénesis, por lo tanto un experto en la materia no podría deducir la naturaleza de los péptidos que regulan la fibrillogénesis.

Por lo tanto, los péptidos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de las afecciones de la piel que requieran una regulación de la fibrillogénesis, tal como el tratamiento de pieles envejecidas (ya sea debido a la edad o debido a la exposición al sol y/o a los contaminantes ambientales) o como coadyuvantes en los procesos de cicatrización para suavizar el aspecto de las cicatrices.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una solución simple, eficaz y sin riesgos para el tratamiento de las afecciones de la piel que requieren una regulación de la fibrillogénesis, tal como el envejecimiento o la cicatrización, que comprende la aplicación sobre la piel de una composición cosmética o dermofarmacéutica que contiene, por lo menos, un péptido de fórmula general (I). En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se refiere a la reducción, retraso y/o prevención de los signos de envejecimiento o a la suavización del aspecto de las cicatrices. El término "envejecimiento" se refiere a los cambios que experimenta la piel con la edad (cronoenvejecimiento) o debido a la exposición al sol (fotoenvejecimiento) o a agentes ambientales tales como el humo del tabaco, las condiciones climáticas extremas de frío o viento, los contaminantes químicos o la polución, e incluye todos los cambios externos visibles así como los perceptibles mediante el tacto, tal como, por ejemplo, y sin limitación, el desarrollo de discontinuidades en la piel tales como arrugas, líneas finas, grietas, irregularidades o rugosidades, aumento del tamaño de los poros, pérdida de la elasticidad, pérdida de la firmeza, pérdida de la tersura, pérdida de la capacidad de recuperación de la deformación, flacidez de la piel tal como la flacidez de las mejillas, la aparición de bolsas bajo los ojos o la aparición de papada, entre otros, cambios en el color de la piel tal como manchas, enrojecimiento, ojeras o aparición de zonas hiperpigmentadas tales como manchas de la edad o pecas, entre otros, diferenciación anómala, hiperqueratinización, elastosis, queratosis, pérdida de pelo, pérdida de la estructuración del colágeno y otros cambios histológicos del estrato córneo, de la dermis, de la epidermis, del sistema vascular (por ejemplo, la aparición de venas de araña o telangiectasias) o de los tejidos próximos a la piel entre otros.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un péptido capaz de regular la fibrillogénesis, de acuerdo con fórmula general (I):



(I)

5 sus estereoisómeros y mezclas de los mismos, que pueden ser racémicas o no, y las sales cosméticamente o dermatofarmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

Z se selecciona del grupo que consiste en alanilo, *α*-isoleucilo, glicilo, isoleucilo, isoserilo, isovalilo, leucilo, norleucilo, norvalilo, prolilo, serilo, treonilo, *α*-otreonilo o valilo;
n y m pueden variar independientemente uno del otro entre 1 y 5;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en H o grupo alquilo, arilo, aralquilo o acilo; y

10 R₂ se selecciona del grupo que consiste en amino, hidroxilo o tiol, sustituidos o no con grupos alifáticos o cíclicos.

Las estructuras preferentes de los péptidos mostradas en la fórmula general (I) son aquellas en las que:

Z puede ser: isoleucilo, treonilo o valilo;

R₁ puede ser: H o acilo de C₂ a C₂₄ lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado; y

15 R₂ puede ser: amino o hidroxilo, sustituidos o no con grupos alifáticos de C₁ a C₂₄ lineales, ramificados o cíclicos, saturados o insaturados.

Los péptidos de la presente invención pueden existir como estereoisómeros o mezclas de estereoisómeros; por ejemplo, los aminoácidos que los componen pueden tener configuración L-, D-, o pueden ser racémicos independientemente uno de otro. Por lo tanto, es posible obtener mezclas isoméricas así como racematos o mezclas diastereoisoméricas, o diastereoisómeros o enantiómeros puros, dependiendo del número de carbonos asimétricos y de qué isómeros o mezclas isoméricas estén presentes.

Las estructuras preferentes de los péptidos de fórmula general (I) son isómeros puros, es decir, enantiómeros o diastereoisómeros.

En el contexto de la presente invención, la expresión "aminoácidos no codificados" se refiere a los aminoácidos que no codifica el código genético, naturales o no, tal como por ejemplo, y sin limitación, citrulina, ornitina, sarcosina, desmosina, norvalina, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 6-aminohexanoico, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, ácido 2-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, 4-clorofenilalanina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico, cicloserina, carnitina, cistina, penicilamina, ácido piroglutámico, tienilalanina, hidroxiprolina, *α*-isoleucina, *α*-otreonina, ácido isonipecótico, isoserina, fenilglicina, estatina, β-alanina, norleucina, N-metilaminoácidos, β-aminoácidos o γ-aminoácidos, entre otros, así como sus derivados. Se puede encontrar una lista de los aminoácidos no naturales en el artículo "Unusual amino acids in peptide synthesis" de D.C. Roberts y F. Vellaccio, en The Peptides, Vol. 5 (1983), Capítulo VI, Gross E. and Meienhofer J., Eds., Academic Press, Nueva York, USA, o en los catálogos comerciales de las empresas especializadas del sector, como por ejemplo NeoMPS, Bachem, Novabiochem, Sigma-Aldrich, Peptides International, Advanced ChemTech, Chem-Impex, Maybridge Chemical, Chirotech Technology, Peninsula Laboratories o RSP Amino Acid Analogues entre otras.

En el contexto de la presente invención, la expresión "grupo alifático" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o cíclico.

La expresión "grupo hidrocarburo" se utiliza en la presente invención para abarcar, por ejemplo, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo.

La expresión "grupo alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que incluye, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, isobutilo, *t*-butilo, heptilo, dodecilo, hexadecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo, 2-metilbutilo, 5-metilhexilo.

La expresión “grupo alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarburo no saturado, lineal o ramificado, con uno o más enlaces dobles carbono-carbono, tales como el grupo vinilo.

La expresión “grupo alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarburo no saturado, lineal o ramificado con uno o más enlaces triple carbono-carbono.

- 5 La expresión “grupo cíclico” se refiere a un anillo hidrocarburo cerrado, que puede clasificarse como un grupo alicíclico, aromático o heterocíclico.

La expresión “grupo alicíclico” se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico con propiedades similares a grupos alifáticos.

La expresión “grupo aromático” o “grupo arilo” se refieren a un grupo hidrocarburo aromático mono o policíclico.

- 10 La expresión “grupo heterocíclico” se refiere a un anillo hidrocarburo cerrado, en el que uno o más de uno de los átomos del anillo es un elemento distinto del carbono (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.).

- 15 Dentro del ámbito de la presente invención están las sales cosméticamente o dermofarmacéuticamente aceptables de los péptidos de fórmula (I) proporcionados por esta invención. La expresión “sales cosméticamente o dermofarmacéuticamente aceptables” incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición de ácidos, bien sean orgánicos (tal como, por ejemplo, acetato, citrato, oleato, oxalato o gluconato) o inorgánicos (tal como, por ejemplo, cloruro, sulfato, borato o carbonato). La naturaleza de la sal no es crítica, siempre y cuando sea cosméticamente o farmacéuticamente aceptable. Las sales cosméticamente o farmacéuticamente aceptables de los péptidos de fórmula (I) pueden obtenerse por procedimientos convencionales, bien conocidos en el estado de la técnica.

- 20 La síntesis de los péptidos de fórmula general (I) puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales, conocidos en el estado de la técnica, tal como, por ejemplo, la adaptación de los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida [Stewart J.M. y Young J.D. (1984) “Solid Phase Peptide Synthesis”, 2nd edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois; Bodanzsky M. y Bodanzsky A. (1984) “The practice of Peptide Synthesis”, Springer Verlag, Nueva York; Lloyd-Williams P., Albericio F. y Giralt E. (1997) Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC, Boca Raton (FL, USA)], la síntesis en solución, una combinación de los procedimientos de síntesis en fase sólida y de síntesis en solución o procedimientos de síntesis enzimática [Kullmann W. (1980) “Proteases as catalysts for enzymatic syntheses of opioid peptides” J. Biol. Chem. 255, 8234-8238]. Los péptidos se pueden obtener también por la fermentación de una cepa bacteriana que esté modificada o no por ingeniería genética, con el objetivo de producir las secuencias deseadas.

- 30 Por ejemplo, un procedimiento de obtención de los péptidos de fórmula general (I) es aquel en el cual se hace reaccionar un fragmento del péptido de fórmula general (I) que tiene un grupo carboxilo libre o un derivado reactivo del mismo, con un fragmento complementario que tiene un grupo amino, con por lo menos un átomo de hidrógeno libre, con la posterior formación de un enlace tipo amida, y en el que los grupos funcionales de dichos fragmentos que no participan en la formación del enlace tipo amida, si los hubiera, están convenientemente protegidos con grupos protectores temporales o permanentes.

- 35 Otro ejemplo de un procedimiento de obtención de los péptidos de fórmula general (I) es aquel en el cual se hace reaccionar un fragmento del péptido de fórmula general (I) que tiene un grupo saliente, tal como, por ejemplo, el grupo tosilo, el grupo mesilo y grupos halógeno, entre otros, con un fragmento complementario que tiene un grupo amino con por lo menos un átomo de hidrógeno libre por medio de una reacción de sustitución nucleófila, y en el que los grupos funcionales de dichos fragmentos que no participan en la formación del enlace N-C, si los hubiera, están convenientemente protegidos, con grupos protectores temporales o permanentes. Ejemplos de grupos protectores, su inserción y su eliminación, pueden encontrarse descritos en la literatura [Greene T.W. (1981) “Protective groups in organic synthesis”, John Wiley & Sons, New York; Atherton B. y Sheppard R.C. (1989) “Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach”, IRL Oxford University Press]. La expresión “grupos protectores” incluye también a los soportes poliméricos empleados en la síntesis en fase sólida.

- 40 Cuando la síntesis se lleva cabo total o parcialmente en fase sólida, se pueden citar los siguientes como soportes sólidos a utilizar en el procedimiento de la invención: soportes fabricados de poliestireno, poliestireno injertado con polietilenglicol y similares, tal como, por ejemplo, resinas de *p*-metilbenzidrilamina (MBHA) [Matsueda G.R. y Stewart J.M. (1981) “A *p*-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides” Peptides 2, 45-50], resinas de 2-clorotritilo [Barlos K., Gatos D., Kallitsis J., Papaphotiu G., Sotiriou P., Wenqing Y. y Schäfer W. (1989) “Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einatz substituiertes triphenylmethyl-harze” Tetrahedron Lett. 30, 3943-3946; Barlos K., Gatos D., Kopolos S., Papaphotiu G., Schäfer W. y Wenqing Y. (1989) “Veresterung von partiell geschützten peptid-fragmenten mit harzen. Einsatz von 2-chlortritylchlorid zur synthese von Leu15 -gastrin I” Tetrahedron Lett. 30, 3947-3951], resinas TentaGel®, y similares, las cuales pueden incluir o no un espaciador inestable, tal como ácido 5-(4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi) valérico (PAL) [Albericio F., Kneib-Cordonier N., Biancalana S., Gera L., Masada R.I., Hudson D. y Barany G. (1990) “Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions” J. Org. Chem. 55, 3730-3743], ácido

2-[4-aminometil-(2,4-dimetoxifenil)] fenoxiacético (AM) [Rink H. (1987) "Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin" Tetrahedron Lett. 28, 3787-3790], Wang [Wang, S.S. (1973) "p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments" J. Am. Chem. Soc. 95, 1328-1333] y similares, que permiten la desprotección y la escisión simultánea del compuesto del soporte polimérico.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden formar parte de diversos tipos de composiciones para su aplicación externa en el cuerpo de un mamífero, preferentemente seres humanos. En este sentido, la invención proporciona una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende por lo menos un péptido de fórmula general (I). Dichas composiciones se pueden preparar por medio de procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia.

Los péptidos objeto de la presente invención tienen una solubilidad en agua variable, de acuerdo con la naturaleza de los grupos R_1 , R_2 , y Z y los valores de n y m . Aquellos que no sean solubles en agua pueden solubilizarse en disolventes convencionales cosméticamente o dermofarmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, etanol, propanol o isopropanol, propilenglicol, glicerina, butilenglicol o polietilenglicol o cualquier combinación de los mismos. Los péptidos también se pueden incorporar previamente en sistemas de suministro y/o sistemas de liberación sostenida cosméticos o farmacéuticos tales como liposomas, milipartículas, micropartículas y nanopartículas así como en esponjas, vesículas, micelas, miliesferas, microesferas y nanoesferas, lipoesferas, milicápsulas, microcápsulas y nanocápsulas, con el fin de conseguir una mayor penetración del principio activo. Asimismo, los péptidos de la presente invención también pueden adsorberse sobre polímeros orgánicos sólidos o soportes minerales tales como talco, bentonita, sílice, almidón o maltodextrina, entre otros.

Estas preparaciones pueden utilizarse en distintos tipos de formulaciones tal como, por ejemplo, cremas, emulsiones de aceite y/o silicona en agua, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de silicona en agua, emulsiones de agua en aceite y silicona, emulsiones de agua en aceite, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, linimentos, sueros, jabones, ungüentos, *mousses*, pomadas, barras, lápices o aerosoles, incluyendo las formulaciones de "dejar actuar" y las de "aclarar", y pueden también incorporarse por medio de técnicas conocidas para los expertos en la materia, a distintos tipos de accesorios sólidos tales como toallitas, hidrogeles, parches adhesivos (o no adhesivos) o mascarillas faciales, o pueden incorporarse a distintos productos de línea de maquillaje tales como correctores, bases de maquillaje, lociones o leches desmaquillantes, sombras de ojos y barras de labios, entre otros.

Los péptidos también pueden incorporarse a tejidos para la fabricación de prendas que estén en contacto directo con la piel del cuerpo, de modo que liberen los péptidos de la invención bien por biodegradación del sistema de anclaje al tejido, o bien por la fricción de la prenda con el cuerpo, por la humedad corporal, por el pH de la piel o por la temperatura corporal. Están descritos en la literatura y son conocidos en el estado de la técnica [Schaab C.K. (1986) "Impregnating Fabrics With Microcapsules", HAPPI May 1986; Nelson G. (2002) "Application of microencapsulation in textiles" Int. J. Pharm. 242, 55-62] ejemplos de prendas, tejidos y medios de inmovilización de los péptidos a los tejidos, que incluyen la microencapsulación. Las prendas preferentes son vendas, fajas, pantis, calcetines, bragas, sujetadores y bandas para los brazos y antebrazos.

La composición cosmética o farmacéutica objeto de la presente invención puede aplicarse en las zonas del cuerpo que requieran tratamiento por medio de inyección subcutánea, inyección intradérmica, envoltura de vapor o por medio de iontoforesis, con el fin de conseguir una mayor penetración del principio activo. Las zonas preferentes para la aplicación son rostro, cuello, antebrazos, pecho, glúteos, abdomen y muslos.

Las composiciones mencionadas en la presente invención pueden contener ingredientes adicionales comúnmente utilizados en composiciones para el cuidado y tratamiento de la piel, tales como, por ejemplo, y sin limitación, agentes de emulsión, emolientes, disolventes orgánicos, acondicionadores de la piel tal como, por ejemplo, humectantes, alfa hidroxácidos, hidratantes, vitaminas, pigmentos o colorantes, polímeros gelificantes, espesantes, suavizantes, agentes antiarrugas, agentes capaces de reducir o tratar las bolsas bajo los ojos, agentes blanqueantes o despigmentantes, agentes exfoliantes, agentes antienvjecimiento, agentes anti radicales libres y/o agentes anti polución atmosférica, agentes inhibidores de la NO-sintasa, agentes antioxidantes, agentes antiglicación, agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o capaces de inhibir su degradación, tal como, por ejemplo, agentes estimulantes de la síntesis de colágeno, agentes estimulantes de la síntesis de elastina, agentes estimulantes de la síntesis de laminina, agentes estimulantes de la síntesis de decorina, agentes inhibidores de la degradación de colágeno, agentes inhibidores de la degradación de elastina, agentes estimulantes de la proliferación de fibroblastos, agentes estimulantes de la proliferación de queratinocitos, agentes estimulantes de la diferenciación de queratinocitos, agentes estimulantes de la síntesis de lípidos y de componentes del estrato córneo (ceramidas, ácidos grasos, etc.), agentes dermorrelajantes, agentes estimulantes de la síntesis de glicosaminoglucanos, agentes reafirmantes, agentes antiestrías, agentes calmantes, agentes antiinflamatorios, agentes que actúen sobre la circulación y/o la microcirculación capilar, agentes que actúen sobre el metabolismo de las células, agentes estimulantes y/o inhibidores de la síntesis de melanina, agentes que mejoren la unión dermo-epidérmica, agentes antimicrobianos, conservantes, perfumes, agentes quelantes, extractos vegetales, aceites esenciales, extractos marinos, agentes producidos mediante biofermentación, sales minerales, extractos celulares y filtros solares (agentes fotoprotectores orgánicos o minerales que son activos frente a los rayos ultravioletas A y B), entre otros, siempre que sean física y químicamente compatibles con el resto de los componentes de la

composición, y en especial con los péptidos de fórmula general (I) de la presente invención. La naturaleza de dichos ingredientes adicionales puede ser sintética o de origen natural, tal como, por ejemplo, extractos vegetales.

Asimismo, las composiciones de la presente invención pueden contener o se pueden coadministrar con compuestos analgésicos y/o compuestos antiinflamatorios con el fin de reducir la hinchazón y la irritación asociadas tanto a pieles sensibles como a los procesos de cicatrización, o para tratar las cicatrices hipertróficas o queloides. Entre dichos compuestos pueden destacarse compuestos de tipo esteroide tal como la hidrocortisona, compuesto de tipo no esteroide tal como el paracetamol o el ácido acetilsalicílico, o extractos naturales o aceites esenciales con actividad analgésica y antiinflamatoria intrínseca.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un péptido de acuerdo con la fórmula general (I), y además una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un extracto con actividad antiarrugas y/o antienvjecimiento tal como, por ejemplo, y sin limitación, los extractos de *Vitis vinifera*, *Rosa canina*, *Curcuma longa*, *Iris pallida*, *Theobroma cacao*, *Ginkgo biloba*, o *Dunaliella salina*, entre otros o, por otra parte, por lo menos un compuesto sintético, extracto o producto de biofermentación con actividad antiarrugas y/o antienvjecimiento como por ejemplo y sin limitación, Matrixyl® que comercializa Sederma, Vialox® o Syn-ake® que comercializa Pentapharm, Myoxinol™ que comercializa Cognis, Algisum C® o Hydroxyprolisilane CN® que comercializa Exsymol, Argireline®, Leuphasyl®, Aldenine® o Lipochroman® que comercializa Lipotec, Kollaren® que comercializa Institut Europeen de Biologie Cellulaire, Collaxyl® o Quintescine® que comercializa Vincience, antagonistas del canal de Ca²⁺ tal como sales de alverina, de manganeso o de magnesio, determinadas aminos secundarias o terciarias, retinol y sus derivados, idebenona y sus derivados, Coenzima Q10 y sus derivados, ácido boswélico y sus derivados, ácido gamma aminobutírico o agonistas de canales de cloruro, entre otros.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un péptido de acuerdo con la fórmula general (I), y además una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un extracto o combinación de extractos con actividad reafirmante, redensificante y/o reestructurante tal como, por ejemplo, y sin limitación, los extractos de *Malpighia puniceola*, *Cynara scolymus*, *Gossypium herbaceum*, *Aloe barbadensis*, *Panicum miliaceum*, *Morus nigra*, *Sesamum indicum*, *Glycine soja*, *Triticum vulgare*, Pronalen® Refirming HSC o Polyplan® Refirming que comercializa Provital, Lanablue® que comercializa Atrium, Pepha®-Nutrix que comercializa Pentapharm, o extractos vegetales que contengan isoflavonas tales como Phyto-Flavone® que comercializa Vichy, entre otros o, por otra parte, por lo menos un compuesto sintético, extracto o producto de biofermentación con actividad reafirmante, redensificante y/o reestructurante tal como, por ejemplo, y sin limitación, Biopeptide EL™, Biopeptide CL™, Vexel®, Matrixyl® o Bio-Bustyl™ que comercializa Sederma, Dermosaccharides® HC, Aglycal®, Cytokinol® LS o Firmiderm® LS9120 que comercializa Laboratoires Serobiologiques, Liftline®, Raffermine® o Ridulisse C® que comercializa Silab, Serilesine® que comercializa Lipotec, Ursolisome®, Basaline® o Collalift® que comercializa Coletica/Engelhard, Syn®-Coll que comercializa Pentapharm, Hydriame® que comercializa Atrium o IP2000® que comercializa Institut Europeen de Biologie Cellulaire entre otros.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un péptido de acuerdo con la fórmula general (I), y además una cantidad cosméticamente o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un extracto o combinación de extractos con actividad cicatrizante o reepitelizante o con eficacia como coadyuvantes en procesos de cicatrización o reepitelización tales como, por ejemplo, y sin limitación, los extractos de *Centella asiatica*, *Rosa moschata*, *Echinacea angustifolia*, *Symphytum officinal*, *Equisetum arvense*, *Hypericum perforatum*, *Mimosa tenuiflora*, *Aloe vera*, Polyplant® Epithelizing que comercializa Provital, Cytokinol® LS 9028 que comercializa Pentapharm o Delinei® que comercializa Coletica/Engelhard, entre otros, o por otra parte, por lo menos un compuesto sintético, extracto o producto de biofermentación con actividad cicatrizante o reepitelizante o con eficacia como coadyuvante en procesos de cicatrización o reepitelización, tal como, por ejemplo, y sin limitación, Antarcticine® que comercializa Lipotec, entre otros.

Los péptidos de fórmula general (I) se utilizan en las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas de la presente invención a concentraciones cosméticamente o farmacéuticamente eficaces para conseguir el efecto deseado; preferentemente entre el 0,000001 % (en peso) y el 20 % (en peso); más preferentemente entre el 0,00001 % (en peso) y el 10 % (en peso) e incluso más preferentemente entre el 0,0001 % (en peso) y el 5 % (en peso).

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de por lo menos un péptido de fórmula general (I) en la preparación de una composición cosmética o dermofarmacéutica para su aplicación en la piel, preferentemente para el tratamiento de aquellas condiciones de la piel que requieran una regulación de la fibrillogénesis, tal como el tratamiento de pieles envejecidas (bien sea debido a la edad o a la exposición al sol y/o a los contaminantes ambientales) o como coadyuvantes en los procesos de cicatrización para suavizar el aspecto de las cicatrices. Las aplicaciones preferentes son las aplicaciones en muslos, abdomen, glúteos, pecho, antebrazos, cuello y rostro, o sobre aquellas zonas del cuerpo que presenten cicatrices.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento cosmético o dermofarmacéutico para tratar aquellas afecciones de la piel que requieran una regulación de la fibrillogénesis, preferentemente la piel de los humanos, que comprende la administración de una cantidad eficaz de péptidos de fórmula general (I), preferentemente en forma de una composición cosmética o dermofarmacéutica que los contiene. La frecuencia de la aplicación sobre la piel puede variar extensamente, dependiendo de las necesidades de cada sujeto, sugiriéndose un intervalo de aplicación desde una vez al mes hasta 10 veces al día, preferentemente desde una vez a la semana hasta 4 veces al día, más preferentemente desde tres veces por semana hasta dos veces al día, e incluso más preferentemente una vez al día.

Un procedimiento cosmético o dermofarmacéutico preferente es aquel en el que el objeto de la regulación de la fibrillogénesis es reducir, retrasar y/o prevenir los signos de envejecimiento o suavizar el aspecto de las cicatrices.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento sirven son útiles para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitantes de la invención que se reivindica en el presente documento.

Metodología General

Síntesis química

Todos los procedimientos sintéticos se llevan a cabo en jeringas de polipropileno equipadas con discos de polietileno poroso. Todos los reactivos y disolventes son de calidad para síntesis y se utilizan sin ningún tratamiento adicional. Los disolventes y los reactivos solubles se eliminan por succión. La eliminación del grupo Fmoc se lleva a cabo con piperidina-DMF (2:8, v/v) (1 x 1 min, 1 x 5 min; resina 5 ml/g) [Lloyd-Williams, P., Albericio, F. y Giralt, E. (1997) "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins" CRC, Boca Raton (FL, USA)]. Los lavados entre las etapas de desprotección, acoplamiento, y, otra vez, desprotección se han llevado a cabo con DMF (3 x 1 min) utilizando cada vez 10 ml de disolvente/g de resina. Las reacciones de acoplamiento se han llevado a cabo con 3 ml de disolvente/g de resina. El control de los acoplamientos se llevó a cabo por medio de la prueba de la ninhidrina [Kaiser, E., Colescott R.L., Bossinger C.D. y Cook P.I. (1970) "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides" Anal. Biochem. 34, 595-598]. Todas las transformaciones sintéticas y los lavados se han llevado a cabo a 25 °C.

El análisis cromatográfico por HPLC se llevó a cabo en un equipo Shimadzu (Kyoto, Japón) utilizando una columna de fase inversa termoelectratizada a 30 °C (250 x 4,0 mm, Kromasil C₈, 5 µm, Akzo Nobel, Suecia). La elución se llevó a cabo por medio de un gradiente de acetonitrilo (+TFA al 0,07 %) en agua (+TFA al 0,1 %) a un flujo de 1 ml/min, y la detección se llevó a cabo a 220 nm.

Abreviaturas:

Las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos siguen las reglas de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB especificadas en Eur. J. Biochem. (1984) 138, 9-37 y en J. Biol. Chem. (1989) 264, 633-673.

Ac, acetilo; AM, ácido 2-[4-aminometil-(2,4-dimetoxifenil)-fenoxiacético; Boc, *tert*-butiloxycarbonilo; Cit, citrulina; Dap, ácido 2,3-diaminopropiónico; DCM, diclorometano; DIEA, *N,N*-diisopropiletilamina; DIPCDI, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida; DMF, *N,N*-dimetilformamida; equiv, equivalentes; DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina; ES-MS, espectrometría de masas por electropulverización; Fmoc, fluorenilmetoxycarbonilo; GAG, glicosaminoglicanos; HOBt, 1-hidroxibenzotriazol; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; MBHA, resina *p*-metilbenzohidrilamina; MeCN, acetonitrilo; MeOH, metanol; VML, vesículas multilaminares; Nva, norvalina; Orn, ornitina; Palm, palmitoilo; *t*Bu, *tert*-butilo; TFA, ácido trifluoroacético; TGF-β, factor de crecimiento transformante β; THF, tetrahidrofurano; TIS, triisopropilsilano; VUL, vesículas unilaminares.

Ejemplo 1

Obtención de Palm-Dap-Glu-Ile-Cit-OH

Se incorporaron 3,5 g de Fmoc-L-Cit-OH (8,8 mmol, 1 equiv) disueltos en 55 ml de DCM a los que se han añadido 1,3 ml de DIEA (7,6 mmol, 0,86 equiv) a la resina de 2-clorotritilo (5,5 g, 8,8 mmol) seca. Se dejó en agitación durante 5 min, pasados los cuales se añadieron 2,5 ml de DIEA (14,6 mmol, 1,66 equiv). Se dejó reaccionar durante 40 minutos. Se bloquearon los grupos cloruro restantes mediante tratamiento con 4,4 ml de MeOH.

Se desprotegió el grupo Fmoc amino terminal como se describe en los procedimientos generales y se incorporaron a la peptidil-resina 7,77 g de Fmoc-L-Ile-OH (22 mmol, 2,5 equiv) en presencia de DIPCDI (3,39 ml, 22 mmol, 2,5 equiv) y HOBt (3,37 g, 22 mmol, 2,5 equiv) utilizando DMF como disolvente durante 1 h. La resina se lavó posteriormente como se describe en los procedimientos generales y se repitió el tratamiento de desprotección del grupo Fmoc para incorporar el siguiente aminoácido. Siguiendo los protocolos descritos se acoplaron secuencialmente 9,36 g de Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (22 mmol, 2,5 equiv) y 9,38 g de Fmoc-L-Dap(Boc)-OH (22 mmol,

2,5 equiv), en presencia, en cada acoplamiento, de 3,37 g de HOBt (22 mmol, 2,5 equiv) y 3,39 ml de DIPCDI (22 mmol, 2,5 equiv).

Se desprotegió el grupo Fmoc *N*-terminal como se describe en los procedimientos generales, y se incorporaron 22,5 g de ácido palmítico (88 mmol, 10 equiv) predisoluto en DMF (10 ml), en presencia de 13,55 g de HOBt (88 mmol, 10 equiv) y 13,55 ml de DIPCDI (88 mmol, 10 equiv). Se dejó reaccionar durante 15 horas, pasadas las cuales la resina se lavó con THF (5 x 1 min), DCM (5 x 1 min), DMF (5 x 1 min), MeOH (5 x 1 min), DMF (5 x 1 min), THF (5 x 1 min), DMF (5 x 1 min), DCM (4 x 1 min), éter (3 x 1 min), y se secó al vacío.

12,36 g de la peptidil-resina seca se trataron con 87 ml de TFA–TIS–H₂O (90:5:5) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se recogieron los filtrados en éter dietílico frío (700 ml), se filtró a través de una placa porosa y se lavó el precipitado 5 veces con éter (500 ml). El precipitado final se secó al vacío.

Ejemplo 2:

Síntesis de H-Lys-Asp-Val-Cit-NH₂

0,685 mg de la resina Fmoc-AM-MBHA con una funcionalización de 0,73 mmol/g (0,5 mmol) con piperidina-DMF de acuerdo con el protocolo general descrito, con el fin de eliminar el grupo Fmoc. A la resina desprotegida se incorporaron 0,99 g de Fmoc-L-Cit-OH (2,5 mmol, 5 equiv) en presencia de DIPCDI (385 µl, 2,5 mmol, 5 equiv) y HOBt (385 mg, 2,5 mmol, 5 equiv) utilizando DMF como disolvente durante 1 hora.

Posteriormente se lavó la resina como se describe en los procedimientos generales, y se repitió el tratamiento de desprotección del grupo Fmoc para incorporar el siguiente aminoácido. Siguiendo los protocolos descritos se acoplaron secuencialmente 0,85 g de Fmoc-L-Val-OH (2,5 mmol, 5 equiv), 1,03 g de Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH (2,5 mmol, 5 equiv) y 1,17 g de Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (2,5 mmol, 5 equiv) en presencia en cada acoplamiento de 385 mg de HOBt (2,5 mmol, 5 equiv) y 385 µl de DIPCDI (2,5 mmol, 5 equiv).

Se desprotegió el grupo Fmoc *N*-terminal como se describe en los procedimientos generales, se lavó con DMF (5 x 1 min), DCM (4 x 1 min), éter dietílico (4 x 1 min) y se seca al vacío.

1,17 g de la peptidil-resina secar se trataron con 15 ml de TFA–TIS–H₂O (90:5:5) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se recogieron los filtrados en éter dietílico frío (100 ml), se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm y se decantó la solución etérea. Se repitieron los lavados con éter 5 veces. El precipitado final se secó al vacío.

El análisis por HPLC en un gradiente del 5 al 95 % de MeCN (+TFA al 0,07 %) en H₂O (+TFA al 0,1 %) mostró una pureza mayor al 70 %. Su peso molecular se determinó mediante ES-MS [(M⁺H)⁺_{teórico} 517,59, (M⁺H)⁺_{exp} 517,7].

Ejemplo 3:

Obtención de Ac-Orn-Asp-Thr-Cit-NH-(CH₂)₉-CH₃

Se incorporaron 1,28 g de Fmoc-L-Cit-OH (3,23 mmol, 1 equiv) disueltos en 20 ml de DCM a los que se han añadido 500 µl de DIEA (2,9 mmol, 0,90 equiv) a la resina de 2-clorotritilo (2,0 g, 3,3 mmol) seca. Se dejó en agitación durante 5 minutos, pasados los cuales se añadió 1 ml de DIEA (5,9 mmol, 1,81 equiv). Se dejó reaccionar durante 40 minutos. Se bloquearon los grupos cloruro restantes mediante el tratamiento con 1,6 ml de MeOH.

Se desprotegió el grupo Fmoc amino terminal en 1 mmol de la aminoacil-resina, como se describe en los procedimientos generales, y se incorporaron 1,99 g de Fmoc-L-Thr(tBu)-OH (5 mmol, 5 equiv) en presencia de DIPCDI (770 µl, 5 mmol, 5 equiv) y HOBt (770 mg, 5 mmol, 5 equiv), utilizando DMF como disolvente durante 1 hora. Posteriormente la resina se lavó como se describe en los procedimientos generales, y se repitió el tratamiento de desprotección del grupo Fmoc para incorporar el siguiente aminoácido. Siguiendo los protocolos descritos se acoplaron secuencialmente 2,06 g de Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH (5 mmol, 5 equiv) y 2,27 g de Fmoc-L-Orn(Boc)-OH (5 mmol, 5 equiv) en presencia, en cada acoplamiento, de 770 mg de HOBt (5 mmol, 5 equiv) y 770 µl de DIPCDI (5 mmol, 5 equiv).

Se desprotegió el grupo Fmoc *N*-terminal como se describe en los procedimientos generales, se trató la peptidil-resina durante 30 min con 2,36 ml de anhídrido acético (25 mmol, 25 equiv) en presencia de 4,28 ml de DIEA (25 mmol, 25 equiv) utilizando DMF como disolvente, se lavó con DMF (5 x 1 min), DCM (4 x 1 min), éter dietílico (4 x 1 min) y se secó al vacío.

El péptido completamente protegido [Ac-L-Orn(Boc)-L-Asp(OtBu)-L-Thr(tBu)-L-Cit-OH] se obtuvo mediante el tratamiento de la peptidil-resina previamente desecada al vacío en presencia de KOH, con una solución del TFA al 3 % en DCM durante 5 minutos. Los filtrados se recogieron en éter dietílico frío y el tratamiento se repitió tres veces. Las soluciones etéreas se rotaevaporaron a sequedad a temperatura ambiente, el precipitado se resuspendió en MeCN al 50 % en H₂O, y se liofilizó. Se pesaron 279 mg del producto bruto obtenido (367 µmol) en un matraz esférico, se añadieron 350 mg de decilamina (3 equiv) y 30 ml de DMF anhidra. Se añadieron 120 µl de DIPCDI (2 equiv), y se dejó reaccionar con agitación magnética a 47 °C. Se controló la reacción por medio de HPLC por desaparición del producto inicial, completándose tras 24 horas. Se evaporó el disolvente a sequedad y se coevaporó

dos veces con DCM. El residuo obtenido [Ac-L-Orn(Boc)-L-Asp(OtBu)-L-Thr(tBu)-L-Cit-NH-(CH₂)₉-CH₃] se resuspendió en 50 ml de una mezcla de TFA-DCM-anisol (49:49:2) y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 250 ml de éter dietílico frío, se rotaevaporó el disolvente y se llevaron a cabo dos coevaporaciones adicionales con éter. El residuo se disolvió en una mezcla de MeCN al 50 % en H₂O y se liofilizó.

El análisis mediante HPLC en un gradiente del 5 al 95 % de MeCN (+TFA al 0,07 %) en H₂O (+TFA al 0,1 %) indicó una pureza superior al 70 %. Su peso molecular se determinó mediante ES-MS [(M+H)⁺_{teórico} 686,8, (M+H)⁺_{exp} 686,9].

Ejemplo 4:

A partir de un modelo de piel humana tridimensional EFT-200 (MatTek Corporation), se trataron los tejidos con H-Lys-Asp-Ile-Cit-NH₂ y con H-Lys-Asp-Val-Cit-NH₂ a una concentración de 0,1 mg/ml en medio de cultivo. Este se cambió diariamente durante 14 días, añadiendo péptido a la misma concentración en cada cambio. El día 14, los tejidos se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2 % y de glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4, durante por lo menos 2 horas a 4 °C. Después, se llevó a cabo la postfijación con tetraóxido de osmio al 1 % que contenía ferricianuro de potasio al 0,8 % durante 1 hora a 4 °C. Después, los tejidos se deshidrataron en alcoholes y se incluyeron lentamente en resina epoxi (Spurr). Se cortaron las muestras y se orientaron de forma correcta en el bloque, dejando que polimericen durante 48 horas a 60 °C. Posteriormente se seccionaron con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung) y los cortes obtenidos, una vez contrastados, se observaron con un Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol JEM 1010, determinando el diámetro de las fibras observadas con el programa AxioVision.AC (Carl Zeiss Vision).

El promedio de los diámetros de las fibrillas de colágeno observados fue de 6,825 nm para el tejido no tratado y de 5,774 nm para H-Lys-Asp-Val-Cit-NH₂ y de 5,791 nm para H-Lys-Asp-Ile-Cit-NH₂, lo que implica una reducción del diámetro de las fibras de colágeno del 15,5 % para el tejido tratado con H-Lys-Asp-Val-Cit-NH₂ y del 15,1 % para el tratado con H-Lys-Asp-Ile-Cit-NH₂.

Ejemplo 5:

Preparación de una composición cosmética conteniendo Palm-Lys-Asp-Ile-Cit-NH₂

La siguiente formulación se preparó según se describe en la presente invención:

En un reactor suficientemente grande se pesaron los componentes de la Fase A y se calentó la mezcla a 80 °C para fundir las ceras. En un recipiente adecuado para todo el contenido se pesaron los componentes de la Fase B y se calentaron a 70 °C. Se añadió lentamente la Fase A a la Fase B y en intensa agitación, y posteriormente se añadió la Fase C a la mezcla anterior en agitación. Una vez finalizada la adición, se dejó enfriar con agitación suave y, cuando la mezcla estaba a temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa de Palm-Lys-Asp-Ile-Cit-NH₂ y lecitina, se homogeneizó y corrigió el pH con trietanolamina si era necesario.

La crema que se obtiene tiene un pH entre 6 y 7 y una viscosidad de 10-15 Pa·s (6/50).

INGREDIENTE	% EN PESO
FASE A	
ACEITE MINERAL	8,0
ÁCIDO ESTEÁRICO	2,4
ALCOHOL CETEARÍLICO	1,6
CERA DE ABEJAS	0,8
FASE B	
GLICERINA	2,4
AGUA	63,4
FASE C	
CARBÓMERO	0,3
TRJETANOLAMINA	0,9
FASE D	
AGUA	15,0
Palm-Lys-Asp-Ile-Cit-NH ₂ (0,05 %)	5,0
LECITINA	0,4

Ejemplo 6:

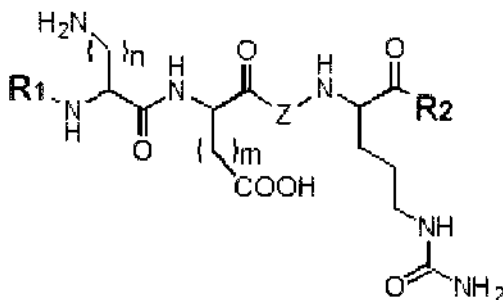
Preparación de liposomas conteniendo H-Lys-Asp-Val-Cit-NH₂

- 5 Se pesó dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y se disolvió en cloroformo. El disolvente se evaporó al vacío hasta obtener una fina capa de fosfolípidos, y esta capa se hidrató por tratamiento a 55 °C con una solución acuosa que contenía el péptido a la concentración deseada (conteniendo Phenonip[®]), obteniendo los liposomas VML. Los liposomas VUL se obtienen sumergiendo los liposomas VML en un baño de ultrasonido a 55 °C durante 8 ciclos de 2 minutos en intervalos de 5 min.

INGREDIENTE	% EN PESO
DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA	4,0
H-Lys-Asp-Val-Cit-NH ₂	0,2
PHENONIP [®]	0,5
AGUA	c.s.p. 100

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de fórmula general (I):



(I)

estereoisómeros del mismo, mezclas del mismo y sales cosméticamente y dermofarmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

Z se selecciona del grupo que consiste en alanilo, *α*-isoleucilo, glicilo, isoleucilo, isoserilo, isovalilo, leucilo, norleucilo, norvalilo, prolilo, serilo, treonilo, *α*-otreonilo o valilo;

n y m varían de forma independiente uno del otro entre 1 y 5;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en H o grupo alquilo, arilo, aralquilo o acilo;

y R₂ se selecciona del grupo que consiste en amino, hidroxilo o tiol, sustituido o no sustituido con grupos alifáticos o cíclicos.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Z es L-isoleucilo, L-treonilo o L-valilo.

3. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que Z es L-Ile, R₁ es H, acetilo o palmitoilo, m es 1, n es 4 y R₂ es amino o hidroxilo, sustituido o no sustituido con grupos metilo o etilo o hexilo o dodecilo o hexadecilo.

4. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que Z es L-Thr, R₁ es H, acetilo o palmitoilo, m es 1, n es 4 y R₂ es amino o hidroxilo, sustituido o no sustituido con grupos metilo o etilo o hexilo o dodecilo o hexadecilo.

5. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que Z es L-Val, R₁ es H, acetilo o palmitoilo, m es 1, n es 4 y R₂ es amino o hidroxilo, sustituido o no sustituido con grupos metilo o etilo o hexilo o dodecilo o hexadecilo.

6. Una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** dicha composición comprende por lo menos un excipiente o adyuvante cosmética o dermofarmacéuticamente aceptable.

7. La composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** el péptido de la fórmula general (I) está incorporado en un sistema de suministro o en un sistema de liberación sostenida que es cosmética o dermofarmacéuticamente aceptable, seleccionado del grupo que consiste en liposomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, vesículas, micelas, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, milipartículas, micropartículas y nanopartículas.

8. La composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** el péptido de la fórmula general (I) está absorbido en un polímero orgánico o soporte sólido mineral cosmética o dermofarmacéuticamente aceptable, seleccionado del grupo que consiste en talco, bentonita, sílice, almidón o maltodextrina.

9. La composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizada porque** dicha composición tiene una formulación seleccionada del grupo que consiste en cremas, emulsiones de aceite y silicona en agua, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de silicona en agua, emulsiones de agua en aceite y silicona, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de agua en silicona, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, linimentos, sueros, jabones, ungüentos, *mousses*, pomadas, barras, lápices y aerosoles.

10. Una composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz de por lo menos un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las

- reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** comprende una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz adicional de un agente activo seleccionado del grupo que consiste en un agente exfoliante, un agente humectante, un agente despigmentante o blanqueante, un agente propigmentante, un agente antiestrías, un agente antiarrugas, un agente antioxidante, un agente antiglicación, un inhibidor de la NO-sintasa, un agente antienvjecimiento, un agente capaz de reducir o eliminar las bolsas bajo los ojos, un agente que estimula la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o previene su degradación, un agente que estimula la proliferación de queratinocitos, un agente que estimula la proliferación de fibroblastos, un agente que estimula la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, un agente que estimula la diferenciación de queratinocitos, un agente que mejora la unión dermo-epidérmica, un agente dermorrelajante, un agente reafirmante, un agente antipolución atmosférica y/o anti radicales libres, un agente que actúa sobre la circulación y/o la microcirculación capilar, un agente calmante, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente que actúa sobre el metabolismo celular, vitaminas, un agente fotoprotector orgánico o mineral que es activo frente a los rayos ultravioleta A y/o B, o mezclas de los mismos.
- 5 11. Uso de un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la preparación de una composición cosmética o dermofarmacéutica para el tratamiento de la piel de seres humanos.
- 10 12. Uso de un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la preparación de una composición cosmética o dermofarmacéutica para el tratamiento de aquellas afecciones de la piel de mamíferos que requieren una regulación de la fibrillogénesis.
- 15 13. Uso de un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la preparación de una composición cosmética o dermofarmacéutica que reduce o retrasa los signos de envejecimiento.
- 20 14. Uso de un péptido de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la preparación de una composición cosmética o dermofarmacéutica que suaviza el aspecto de las cicatrices.