

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 072**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/08	(2006.01) A61Q 1/14	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01) A61Q 17/04	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 8/66	(2006.01) A61Q 19/04	(2006.01)
A61K 31/7076	(2006.01) A61Q 19/06	(2006.01)
A61K 38/06	(2006.01)	
A61K 38/08	(2006.01)	
A61K 38/34	(2006.01)	
A61K 38/43	(2006.01)	
A61K 38/57	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2003** **PCT/FR2003/003883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2004** **WO04060393**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2003** **E 03814486 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 1581177**

54 Título: **Bioactivador metabólico cutáneo**

30 Prioridad:

30.12.2002 FR 0216871
30.12.2002 FR 0216872
30.12.2002 FR 0216873
30.12.2002 FR 0216874

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2018

73 Titular/es:

THOREL, JEAN-NOËL (100.0%)
3 RUE LA ROCHELLE
F-75014 PARIS, FR

72 Inventor/es:

THOREL, JEAN-NOEL y
REDZINIAK, GÉRARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 668 072 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

Bioactivador metabólico cutáneo

5 La presente solicitud se refiere en general a las composiciones cosméticas.

La presente solicitud tiene por objeto aplicar por vía cosmética un nuevo concepto de viabilidad y/o estimulación celular cutánea designado mediante el concepto de bioactividad metabólica. Más particularmente, la invención se refiere a un bioactivador metabólico cutáneo.

10 El modo de vida del individuo, el entorno agresivo y la evolución cronobiológica degenerativa tienen como resultado que las funciones biológicas y facultades vitales de los tejidos cutáneos se debiliten con el tiempo. Por lo tanto, parece esencial restablecer o mantener un buen funcionamiento metabólico y catabólico de las células de la piel (queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, fibroblastos, etc...) para que interactúen con su entorno, con energía exógena y con la información funcional.

15 El documento DE4139639 se refiere a extractos acuosos sintéticos de órganos utilizados en la preparación de composiciones cosméticas y para la activación del metabolismo celular. Estos extractos comprenden, entre otros, un derivado de ácido nucleico tal como ATP-Mg. Estos extractos comprenden también al menos un aminoácido y un derivado peptídico definidos y considerados como esenciales para la actividad del extracto sintético de órganos. Se indica que otros aminoácidos pueden estar presentes en la composición que incluye L-carnosina, sin, no obstante, relacionar la presencia de estos aminoácidos opcionales a algún efecto.

20 El documento FR 2 668 365 desvela que la carnosina posee una actividad antioxidante, cicatrizante y antiinflamatoria y puede asociarse a un ácido graso para mejorar su penetración cutánea.

25 El documento Matura *et al.*, (1992, *Chemical abstracts, American Chemical Society*, Colombus, US, vol. 117, página 436) desvelan composiciones cosméticas para tratar la rugosidad de la piel que comprende carnosinas, mucopolisacáridos, péptidos y o lecitina.

30 La presente solicitud tiene por objeto en consecuencia aumentar o corregir, por supuesto, las capacidades vitales de la piel, por la conjunción de un aporte exógeno de energía y la estimulación de mensajes intercelulares. La sinergia entre este aporte y esta estimulación permite que la piel reaccione contra cualquier agresión o anomalía, y esto mediante la activación de los mecanismos metabólicos pre-existentes en la piel (moleculares, celulares, tisulares), y mediante la optimización, llegado el caso, de la interacción entre la piel y el o los activo(s) cosmético(s) proporcionado(s) por los cuidados o tratamientos dermocutáneos.

35 Con este fin, la presente invención propone una composición cosmética que comprende un sistema bioactivo que asocia, por una parte, una forma estable en solución acuosa de ATP (adenosín trifosfato) en forma de una sal de sodio de ATP, con opcionalmente Gp4G (diguanosina tetrafosfato) o Ap4A (diadenosina tetrafosfato), y por otra parte, al menos un péptido biomimético que imita un polipéptido cutáneo o una proteína cutánea, o una biomolécula agonista o antagonista a dicho péptido o a dicha proteína, dicho dipéptido biomimético es β -alanil-L-histidina.

40 Por "composición cosmética", se entiende cualquier composición que tiene por función mantener, restaurar o mejorar el aspecto de las partes superficiales del cuerpo humano, principalmente la piel y cualquiera que sea el modo de administración de dicha composición, a saber, por vía externa tópica o por vía interna oral.

Por "precursor de ATP", se entiende Gp₄G (o diguanosina tetrafosfato) o Ap₄A (diadenosina tetrafosfato).

45 Por "dipéptido biomimético", se entiende un péptido constituido por dos aminoácidos, que imita un péptido cutáneo o una proteína cutánea, o una biomolécula agonista o antagonista a dicho péptido o a dicha proteína, en el que o en la que desempeña un papel o se implica en una biosíntesis cutánea o en la transferencia de una información cutánea.

50 Por "imitar" o "mimetismo", se entiende la característica según la cual el péptido considerado ejerce *in vitro*, y en particular en una composición según la invención, un efecto biológico similar a o próximo de una función biológica *in vivo* (por ejemplo en la piel) de una biomolécula de referencia (por ejemplo péptido o proteína).

55 Por "péptido", a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se entiende tanto una secuencia de varios aminoácidos no sustituidos, como una secuencia de los mismos aminoácidos, algunos de los cuales, por ejemplo, el aminoácido N-terminal y/o el aminoácido C-terminal están sustituidos con un grupo o sustituyente, funcional o no.

60 Estos péptidos se pueden obtener ya sea por síntesis química convencional (en fase sólida o en fase homogénea líquida), o por síntesis enzimática (Kullman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 8234) a partir de los aminoácidos constitutivos o sus derivados.

65

Estos péptidos también se pueden obtener por fermentación de una cepa de bacterias modificada o no por ingeniería genética, para producir las secuencias deseadas o sus diversos fragmentos.

Finalmente, estos péptidos pueden ser obtenidos por extracción de proteínas de origen animal o vegetal, preferentemente vegetal, seguido de una hidrólisis controlada que libera los péptidos en cuestión. Muchas proteínas que se encuentran en las plantas son susceptibles de contener secuencias interesantes en su estructura. La hidrólisis escatimada permite liberar estos fragmentos peptídicos.

Según la invención, el sistema bioactivo retenido en la composición cosmética potencia uno o varios principios activos, presentes en esta última.

Gracias a la invención, el sistema bioactivo que caracteriza esta última permite a la vez restaurar y/o mantener la actividad natural de la epidermis. Esto es particularmente cierto si la composición cosmética contiene más nutrientes que la piel, y/o una fase acuosa que asegura la viabilidad de las células cutáneas.

La presente invención presenta los siguientes modos de ejecución:

- la forma estable de ATP es una sal de sodio, por ejemplo, una sal disódica de ATP,
- el péptido biomimético es histidina- β -alanil (imita la superóxido dismutasa)
- el péptido biomimético es un dipéptido;

La cantidad eficaz de activo(s) opcionalmente presente(s) en una composición según la invención corresponde a la cantidad necesaria para obtener el resultado deseado, y las composiciones según la invención dependen del uso para el que están destinadas estas composiciones.

Una primera categoría comprende las composiciones cosméticas destinadas a ser aplicadas en una piel sana, con el fin de mejorar la estética y la comodidad. Una piel sana puede ser definida como exenta de patologías, pero sin estar en perfecto estado. Esta piel puede mostrar signos de sequedad, signos de irritación, arrugas asociadas con el envejecimiento cronológico o actínico, zonas de hiper-secreción de sebo, hiper o hipo-pigmentación. Además, la piel sana puede necesitar una fotoprotección temporal o permanente con el fin de resistir mejor la luz solar.

Otra categoría comprende las composiciones destinadas a aplicarse en las pieles debilitadas por enfermedad o medicamentos, ya sea de forma preventiva o bajo un tratamiento vinculado a los tratamientos médicos.

Las composiciones cosméticas según la presente invención pueden comprender además al menos un activo cosmético seleccionado entre antioxidantes, agentes anti-radicales libres, α -hidroxiácidos, vitaminas, filtros o protectores solares, repelentes contra insectos, antiinflamatorios.

Por supuesto, el experto en la materia seleccionará este o estos activos opcionales, y/o sus cantidades, de manera que las propiedades ventajosas del sistema bioactivo según la invención no sean, o sustancialmente no sean, alteradas por la o las agregaciones consideradas. Preferentemente, una sinergia entre el sistema bioactivo según la invención, y el o los activos considerados, se buscará.

Las composiciones de la invención pueden prepararse según las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, en particular las destinadas a la preparación de emulsiones de tipo aceite en agua (Ac/A) o agua en aceite (A/Ac).

Estas composiciones pueden presentarse en particular en forma de emulsión, simple o compleja: doble (Ac/A o A/Ac) o triple (A/Ac/A o Ac/A/Ac), tal como una crema, una leche, un gel o un gel-crema; polvo, bastoncillo sólido, y opcionalmente ser acondicionadas en aerosol y presentarse en forma de espuma o pulverización.

Cuando la composición cosmética según la invención se utiliza para la protección o el cuidado de la epidermis humana, o como composición antisolar, puede presentarse en forma de suspensión o dispersión en disolventes o cuerpos grasos, en forma de dispersión vesicular no iónica, o en forma de emulsión, preferentemente de tipo aceite en agua, tal como una crema o una leche, en forma de pomada, gel, gel-crema, bastoncillo sólido, polvo, barra, espuma, aerosol o pulverización.

Cuando la composición cosmética según la invención se utiliza para la protección del cabello, puede presentarse en forma de champú, loción, gel, emulsión, dispersión vesicular no iónica, y constituir por ejemplo una composición para enjuague para aplicar antes o después del champú, antes o después del tinte o decoloración, antes, durante o después de la permanente o alisado; esta composición también puede presentarse en forma de una loción o un gel para cabello o tratante, una loción o un gel para el peinado con cepillo y secador o marcado del cabello, una composición de permanente o alisado, tinte o decoloración del cabello.

Cuando la composición se utiliza como producto de maquillaje de uñas, pestañas, cejas o piel, tal como una crema de tratamiento de la epidermis, base, barra de labios, sombra de ojos, colorete, rímel o delineador de ojos, también

llamado "eye liner", puede presentarse en forma sólida o pastosa, anhidra o acuosa, como emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, dispersiones vesiculares no iónicas o también suspensiones.

Para las composiciones según la invención, el pH será fisiológico, comprendido entre 4 y 7. Cuando se aplica tópicamente, la composición comprende al menos un ATP y, opcionalmente un precursor, conjugados con al menos un péptido biomimético, puede aplicarse al rostro, cuello, cuero cabelludo, mucosas, uñas, cuerpo, pecho, pies, piernas, o cualquier otra parte del cuerpo.

Las composiciones de la invención pueden comprender además adyuvantes cosméticos convencionales seleccionados especialmente entre cuerpos grasos, disolventes orgánicos distintos de los utilizados específicamente en el contexto de la presente invención, emulsionantes, espesantes iónicos o no iónicos, suavizantes, opacificantes, estabilizantes, emolientes, siliconas, agentes antiespumantes, agentes hidratantes, vitaminas, perfumes, conservantes, tensioactivos, cargas, polímeros, propulsores, agentes alcalinizantes o acidificantes, tintes u otros ingredientes habitualmente utilizados en cosmética, en particular para la fabricación de composiciones en forma de emulsiones. A modo de ejemplo, las composiciones según la invención comprenden agentes filtrantes o reflectores, en el caso de productos destinados a ser utilizados en el entorno externo y bajo el sol.

Los cuerpos grasos pueden estar constituidos por un aceite o una cera o sus mezclas, y comprenden igualmente ácidos grasos, alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos. Los aceites pueden seleccionarse entre aceites animales, vegetales, minerales o de síntesis, y en particular entre aceite de vaselina, aceite de parafina, aceites de silicona volátiles o no, isoparafinas, poliolefinas, aceites fluorados y perfluorados. Del mismo modo, las ceras pueden seleccionarse entre ceras animales, fósiles, vegetales, minerales o de síntesis, conocidos en sí.

Entre los aceites polares, se puede citar el aceite conocido bajo la denominación "Finsolv TN", trimelitato de tridecilo, isononanoato de isononilo, miristato de isopropilo, decapirill carbonato, benzoatos e hidroxibenzoatos de alcohol de Guerbet, como el producto denominado "Hallbrite BHB" de la sociedad CP Hall Company.

A título indicativo, para las formulaciones antisolares conformes a la invención, que presentan un soporte de tipo emulsión aceite en agua, la fase acuosa (que comprende en particular los filtros hidrófilos) representa generalmente de 50 a 95 % en peso, preferentemente 70 a 90 % en peso, con relación al conjunto de la formulación, la fase aceitosa (que comprende particularmente los filtros lipófilos) de 5 a 50 % en peso, preferentemente de 10 a 30 % en peso, con relación al conjunto de la formulación, y el o los (co)emulsionante(s) de 0,5 a 20 % en peso, preferentemente de 2 a 10 % en peso, con relación al conjunto de la formulación.

En particular, las composiciones según la presente invención pueden obtenerse en forma de una composición anhidra que presenta las propiedades de transparencia y translucidez notables.

La presente solicitud describe también el uso de una composición cosmética según la presente invención, para la fabricación de un producto de cuidado de la piel, un producto de maquillaje de la piel, labios y/o faneras, antisolar y una composición dermatológica de cuidado y/o tratamiento de la piel.

La composición según la invención puede presentarse en forma de una composición tintada dermatológica o de cuidado, de materias queratinicas como la piel, labios y/o faneras, en forma de una composición de protección solar o de higiene corporal, especialmente en forma de un producto desodorante o desmaquillante, en forma de barra. Se puede utilizar especialmente como una base de cuidado para la piel, faneras o labios (bálsamos de labios, que protegen los labios del frío y/o del sol y/o del viento, crema reparadora para la piel, uñas o cabello).

La composición de la invención también puede presentarse en forma de un producto coloreado de maquillaje para la piel, en particular una base, que presenta opcionalmente propiedades de cuidado o de tratamiento, rubor, un colorete o sombra de ojos, un producto antiojeras, un delineador de ojos, un producto de maquillaje del cuerpo; maquillaje de labios como una barra de labios, que presenta opcionalmente propiedades de cuidado o de tratamiento; maquillaje de faneras como uñas, pestañas, en particular en forma de un rímel, cejas y cabello, especialmente en forma de lápiz. En particular, la composición de la invención puede ser un producto cosmético que contiene, además del sistema bioactivo, activos cosméticos y/o dermatológicos.

Una composición cosmética según la invención puede comprender además nácares, pigmentos, o nanopigmentos (tamaño medio de partículas primarias: generalmente entre 5 nm y 100 nm, preferentemente entre 10 nm y 50 nm) de óxidos metálicos recubiertos o no, como por ejemplo nanopigmentos de óxidos de titanio (amorfo o cristalizado en forma de rutilo y/o anatasa), hierro, cinc, circonio o cerio y sus mezclas, que son todos agentes fotoprotectores UV bien conocidos en sí. Los agentes de recubrimiento convencionales son, por otra parte, alúmina y/o estearato de aluminio. Tales nanopigmentos de óxidos metálicos recubiertos o no recubiertos, se describen en particular en las solicitudes de patente EP-A-0518772 y EP-A-0518773.

Por supuesto, la composición de la invención debe ser cosmética o dermatológicamente aceptable, a saber, contener un medio fisiológicamente aceptable, no tóxico y susceptible de aplicarse a la piel, faneras o labios de

seres humanos. Por "cosméticamente aceptable", se entiende en la invención, una composición de aspecto, olfato y tacto agradables.

ENSAYOS

Ensayo n.º 1 (fuera de la invención)

Se evalúa la actividad bioestimulante del péptido L-citrulil-L-arginina, asociado o no a ATP en forma de sal disódica, en el metabolismo celular de los queratinocitos humanos normales.

1. Principio

El procedimiento consiste en medir la tasa de ATP en un cultivo de fibroblastos en medio empobrecido en suero (2 %) en comparación con:

- un medio enriquecido en citrulil-arginina, en concentraciones variables,
- un medio enriquecido en ATP, en concentraciones variables,
- un medio enriquecido en citrulil-arginina y ATP, en concentraciones variables.

El fin de este ensayo es evaluar el efecto activador de la mezcla estudiado, asociado o no a ATP disódico, frente a la síntesis de ATP por queratinocitos humanos normales.

2. Método

▫ Cultivo celular

El ensayo se realiza en un cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos normales, sembrados a la densidad de 10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos.

▫ L-citrulil-L-arginina

Con el fin de determinar las concentraciones aplicables en el contexto del ensayo, se realiza una prueba previa de viabilidad celular en los queratinocitos humanos normales.

La L-citrulil-L-arginina se solubiliza en agua, y la concentración final se establece en 0,1 %.

6 diluciones de L-citrulil-L-arginina de 10^{-4} % a 10^{-2} % se ponen en contacto con las células durante 24 h y 48 h. Una condición que contiene agua se realiza como control.

Para el ensayo, la L-citrulil-L-arginina se someterá a ensayo con las 2 concentraciones más altas que permiten el mantenimiento de la viabilidad celular a una tasa superior a 80 % tras un contacto de 48 h, 0,0001 % y 0,01 %.

▫ Irradiación UV B

Los queratinocitos, sembrados en placas de 6 pocillos a la densidad de 105 células/pocillo se cultivan en medio convencional (Epilife Sigma) durante 48 h. Antes de la irradiación, el medio de cultivo se elimina, las células se enjuagan con tampón TFS y 1 ml del mismo se deja en contacto con las células durante la irradiación. Los queratinocitos se someten a una irradiación UV B (312 nm) de 20 mJ/cm^2 . Una condición no irradiada idéntica se realiza en paralelo.

Tras la irradiación (y en el paralelo no irradiado), el TFS se elimina y las células se colocan en diferentes condiciones estudiadas:

- Control de agua en el medio de cultivo
- L-citrulil-L-arginina a 0,001 % en el medio de cultivo
- L-citrulil-L-arginina a 0,01 % en el medio de cultivo.

Cada condición se realiza por triplicado.

Tras un contacto de 24 h o 48 h tras la irradiación, se recuperan los sobrenadantes de cultivo acondicionados. La tasa de endotelina-1 secretada por los queratinocitos se mide en 100 µl de sobrenadante por una técnica de dosificación ELISA (R&D Systems, Abingdon, R.U.). Los niveles de endotelina-1 se calculan gracias a la curva convencional preparada con endotelina-1 humana sintetizada. Los resultados se expresan en pg de endotelina-1 normalizaron a la concentración de proteínas (pg ET-1/mg de proteínas).

3. Resultados

La aplicación de L-citrulil-L-arginina durante 24 h a la concentración más baja ensayada (0,0001 %) provoca un aumento de la secreción basal de endotelina-1 por los queratinocitos (condición no irradiada), de 20 % con respecto al control AGUA. En la concentración superior (0,01 %), este efecto activador es mucho más pronunciado: 70 %.

La irradiación UV B provoca una estimulación del 50 % de la secreción de endotelina-1 por los queratinocitos en la condición control AGUA. Tras un contacto de 24 h con L-citrulil-L-arginina a 0,0001 %, la secreción de endotelina-1 se aumenta un 6 % con respecto al control AGUA irradiado. A 0,001 %, el efecto activador de L-citrulil-L-arginina se aumenta considerablemente: 28 %.

La aplicación de L-citrulil-L-arginina durante 48 h a la concentración más baja ensayada (0,0001 %) provoca un aumento de la secreción basal de endotelina-1 por los queratinocitos (condición no irradiada) de 26 % en relación con el control AGUA. En la concentración superior: 0,01 %, este efecto activador es mucho más pronunciado: 82 %.

La irradiación UV B provoca una estimulación del 40 % de la secreción de endotelina-1 por los queratinocitos en la condición control AGUA. Tras un contacto de 48 h con L-citrulil-L-arginina a 0,0001 %, la secreción de endotelina-1 se aumenta un 4 % con respecto al control AGUA irradiado. A 0,01 %, el efecto activador de L-citrulil-L-arginina se aumenta considerablemente: 63 %.

4. Conclusión

En las condiciones experimentales así definidas, para las diluciones y el tiempo de incubaciones seleccionadas, se puede apreciar que:

La L-citrulil-L-arginina, con la concentración de 0,01 %, ejerce un importante efecto activador en la secreción de endotelina-1 por los queratinocitos humanos normales.

En presencia de ATP al 0,01 %, el efecto estimulador se estimula al 20 %. Tiene un efecto sinérgico entre las moléculas de ATP y del péptido L-citrulil-L-arginina.

Los mismos estudios realizados con ATP solo no muestran ningún efecto sobre la síntesis de endotelina-1.

Ensayo n.º 2 (según la invención)

Se estudia el efecto de la combinación de ATP + dipéptidos en el crecimiento de fibroblastos humanos normales.

Los productos estudiados son:

- ATP, en forma de sal disódica,
- β -alanil-L-histidina (carnosina),
- citrulil-arginina (exsialgina).

1. Objetivo del estudio

El objetivo de este ensayo es evaluar el efecto de la asociación ATP + péptidos añadida a un medio de cultivo sobre el crecimiento de una línea inmortalizada de fibroblastos humanos, las células HaCaT.

En este estudio, 2 péptidos son al mismo tiempo y/o de forma concomitante asociados a ATP: β -alanil-L-histidina (Dragoco) y L-citrulil-L-arginina (Exsymol).

El estudio se realiza en un cultivo efectuado en el medio de cultivo convencional de células HaCaT, DMEM (SIGMA) en presencia de suero fetal bovino (SFB) al 2 o 10 %.

2. Técnicas

Las células HaCaT se siembran a baja densidad en placas de 96 pocillos en el medio convencional (DMEM + 10 % de SFB) y se dejan crecer durante 24 h después de la siembra en este medio.

Al 2º día, las células se colocan en las diferentes condiciones estudiadas.

Las concentraciones a ensayar en ATP, β -alanil-L-histidina (carnosina) y L-citrulil-L-arginina (exsialgina) se determinan después de estudios preliminares de citotoxicidad.

Se realiza:

- una condición control: medio de cultivo sólo + SFB
- una condición β -alanil-L-histidina sólo a 0,5 %
- una condición L-citrulil-L-arginina sólo en 0,5 %
- una condición ATP sólo a 1 μ g/ml
- una condición ATP (1 μ g/ml) + β -alanil-L-histidina (0,5 %)
- una condición ATP (1 μ g/ml) + L-citrulil-L-arginina (0,5 %)
- una condición ATP (1 μ g/ml) β -alanil-L-histidina (0,5 %) + L-citrulil-L-arginina (0,5 %).

Estas condiciones diferentes se realizan en DMEM al 2 % y en 10 % de SFB.

Cada condición se realiza por triplicado. Los medios no se renuevan durante el experimento.

La densidad celular se evalúa 24 h después de la siembra de células, antes de ponerse en contacto con diferentes condiciones de estudio (= T0), a continuación, el crecimiento de células HaCaT se evalúa al 2º, 5º y 7º día de cultivo mediante el método de conversión de WST-1 (lectura a 450 nm).

3. Resultados

El crecimiento celular es objetivado por la medición de la viabilidad celular en diferentes momentos del experimento. Los resultados obtenidos presentan el porcentaje de viabilidad celular calculado con respecto a la densidad celular inicial en T0 para la cual se considera que tiene una densidad celular igual a 100 %. Los efectos de los diferentes productos sobre el crecimiento celular se analizan en momentos diferentes de experimentación en comparación con el control no tratado al mismo tiempo de experimentación.

➤ Después de 2 días de cultivo, se observa una ausencia de crecimiento con mantenimiento de la viabilidad celular para la condición de control en comparación con el control T0, que se explica por el paso en medio empobrecido en factor de crecimiento (SFB al 2 %).

- La adición de β -alanil-L-histidina sólo a la concentración de 0,5 % estimula significativamente el crecimiento celular (+22 % en comparación con el control no tratado). En una concentración de 0,1 %, no se observa ningún efecto sobre el crecimiento.
- La adición de ATP sólo disminuye significativamente la viabilidad celular.
- La adición de ATP a β -alanil-L-histidina provoca una supresión del efecto inhibitor de ATP sobre la viabilidad celular y estimula la misma más allá del nivel obtenido con β -alanil-L-histidina sólo, y esto para las 2 concentraciones ensayadas.
- La adición de L-citrulil-L-arginina sólo a una concentración de 0,1 y 0,5 % no estimula el crecimiento celular (+ 5 %) con respecto al control no tratado.

➤ Después de 5 días de cultivo, se observa una ligera disminución de la viabilidad celular en relación al T0 debido al mantenimiento del cultivo en medio empobrecido en factor de crecimiento.

- Se encuentra el efecto de estimulación sobre el crecimiento celular de β -alanil-L-histidina en la concentración de 0,5 % (+12 %).
- La adición de ATP sólo disminuye significativamente la viabilidad celular, efecto que desaparece después de la adición de β -alanil-L-histidina al 0,5 %.
- La L-citrulil-L-arginina sólo no siempre estimula el crecimiento celular, cualquiera que sea la concentración utilizada.

4. Conclusión

En las condiciones experimentales así definidas y en las concentraciones ensayadas, parece que la adición de ATP sólo disminuye significativamente la viabilidad de los fibroblastos humanos normales después de 2 a 5 días de contacto (-5 a -10 %).

La asociación ATP + β -alanil-L-histidina anula el efecto inhibitor de ATP sobre la viabilidad celular y estimula la misma más allá del nivel obtenido con β -alanil-L-histidina sólo, que ejerce un efecto de estimulación del crecimiento celular en la concentración de 0,5 %.

La asociación ATP + L-citrulil-L-arginina no ejerce ningún efecto de estimulación del crecimiento celular, independientemente de la concentración utilizada.

Ensayo n.º 3 (fuera de la invención)

1. Cultivo de células

5 Los cultivos de melanocitos humanos normales (MHN) se realizan a partir de prepucios de niños y recién nacidos con fimosis. Los melanocitos obtenidos a partir de fragmentos de piel se colocan en el medio MCDB 153 (Sigma St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con 30 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (EPB) (Life Technologies, Paisley, Inglaterra), 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Dominica Dutscher, Brumath, Francia), 16 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma), 5 µg/ml de insulina y 1,1 µM de hidrocortisona (Sigma). Los cultivos se mantienen en una incubadora a 37 °C y bajo una atmósfera que contiene 5 % de CO₂. Los cultivos puros de melanocitos se obtienen al cabo de 2 a 3 semanas.

2. Tiempo de contacto, irradiación de las células y preparación de los portaobjetos

15 Todas las composiciones ensayadas se solubilizan en DMSO en las concentraciones máximas permitidas. Los ensayos preliminares se efectúan para determinar las concentraciones subtóxicas en los queratinocitos. La concentración final de DMSO es siempre inferior a 2 %.

20 Los melanocitos se ponen en contacto con el producto durante 30 min a 37 °C, y luego se irradian con UVA. Las irradiaciones UVA se generan por un irradiador UV Bio-Sun (Vilbert Lourmat, Marne la Vallée). Este aparato está equipado con lámparas monocromáticas que emiten a una longitud de onda de 312 nm y/o 365 nm. Las lámparas liberan una energía calculada, por medio de un radiómetro de tipo RMW-365/312. Las energías liberadas son de 0,8 J/cm² para los UVA. El ensayo denominado "cometas" se realiza inmediatamente tras la exposición. Dos tipos de controles se incluyen en estos experimentos:

25 - Controles negativos: melanocitos no tratados pero irradiados con rayos UVA; melanocitos tratados durante 30 min con la composición ensayada, pero no irradiados.
- Control positivo: melanocitos no tratados pero irradiados.

30 Después del tratamiento con una mezcla de tripsina/EDTA (0,05 %/0,02 %) durante 2 a 3 minutos, los cultivos se recuperan por centrifugación y se colocan en tampón TFS sin Ca⁺⁺ y sin Mg⁺⁺ (Sigma). Después de una segunda centrifugación, las células (4,5-5,0 x 10⁴ células) se colocan en suspensión en 0,5 % de agarosa de bajo punto de fusión, BPF (Sigma). La mezcla se deposita directamente sobre los portaobjetos de microscopio recubiertos con una pre-capa de agarosa (1,6 %) secada, durante la noche a temperatura ambiente y recién pre-recubierta con una segunda capa de agarosa (0,8 %).

3. El ensayo de cometas (técnica de portaobjetos secos) y tratamiento enzimático

40 El protocolo del ensayo de cometas es el de De Méo *et al.*, [1] mediante la incorporación de la técnica de "portaobjetos secos" [2]. Los portaobjetos se colocan después de las irradiaciones en un baño de lisis (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 10, 1 % de sodio sarcosinato, 1 % de Triton X-100 y 10 % de DMSO). La lisis celular se efectúa a 4 °C durante 60 minutos, seguido de la desnaturalización del ADN a temperatura ambiente durante 20 min en una solución fuertemente alcalina (Na₂EDTA 1 mM y NaOH 300 mM, pH > 13,0). Después de la electroforesis (25 V, 300 mA) durante 20 min, los portaobjetos se neutralizan con tampón Tris-HCl (0,4 M; pH 7,4), y se deshidratan en etanol o metanol absoluto.

4. Observación microscópica y análisis de imágenes

50 Los portaobjetos se tiñen con una solución de bromuro de etidio (75 µl de 2 µg/ml) y se observan por medio de un microscopio de fluorescencia BH2-RFL (Olympus, Japón) equipado con un filtro dicróico 20BG-W (excitación: 515-560 nm; emisión: 590 nm) y con un objetivo Apo D-Plan 20x. El análisis de imágenes se efectúa con una cámara CCD monocromática de alta sensibilidad (Cohu 4912-5000) acoplada a una tarjeta de adquisición Matrox IP-8. El conjunto está controlado por el software Fenestra Komett (Kinetic Imaging, Liverpool, R.U., versión 3.1).

55 Se analiza un total de 100 células por muestra (50 células/portaobjetos). El parámetro utilizado es "ADN de cola", que se define como el porcentaje de ADN en la cola del "cometa". Para cada serie de experimentos, se incluyen un control negativo (células no irradiadas) y un control positivo (células irradiadas sin composición ensayada).

5. Análisis estadístico

60 Las regresiones no lineales basadas en una función χ^2 se calculan directamente a partir de las frecuencias de distribución de los TC (tiempo de cola) para cada muestra. De hecho, Bauer *et al.*, [3] han demostrado recientemente que estas distribuciones siguen una función χ^2 . Este método se basa en un análisis de la distribución según una ley de χ^2 .

El factor n (también denominado χ^2 TC) que representa el grado de libertad de la función se correlaciona directamente con el grado de lesión (TC medio). El factor n varía de 2 (células intactas) a 15 (células muy dañadas con una frecuencia de distribución gaussiana).

- 5 El grado de libertad (n) se puede utilizar como un indicador de lesión del ADN. Las frecuencias de distribución se calculan con la hoja de cálculo Excel 97 (Microsoft) y las regresiones no lineales se calculan con el software Table Curve 2D (Jandel Scientific, versión 5.0).

6. Referencias

- 10 [1]. De Méo M, M. Laget M, Castegnaro M, Duménil G. *Genotoxic activity of potassium permanganate acidic sodium. Mutation Res.* 1991; 260; 295-306.
- 15 [2]. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Annstrom G. *The cornet assay: mechanism and technical consideration. Mutation Res.* 1996; 363; 89-96.
- 20 [3]. Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO. *The distribution of the tail moments in single cell electrophoresis (cornet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution. Mutation Res.* 1998; 398: 101-110.

7. Grado de protección de las composiciones ensayadas

Se obtuvieron los resultados según la siguiente tabla.

Composición	OTC- χ^2	Grado de protección (%)
NI	2,08 $\pm$ 0,02	-
NI + ATP (4 mM)	2,08 $\pm$ 0,02	-
NI + Citru (4 mM)	2,06 $\pm$ 0,02	-
NI + ATP (4 mM) + Citru (4 mM)	2,07 $\pm$ 0,02	-
UVA	9,16 $\pm$ 0,32	0,00 %
UVA + ATP (4 mM)	6,31 $\pm$ 0,38	14,6 % (NS)
UVA + Citru (4 mM)	2,22 $\pm$ 0,20	67,7 %
UVA + ATP (4 mM) + Citru (4 mM)	2,11 $\pm$ 0,04	99,6 %

- 25 OTC χ^2 = tiempo de cola χ^2 : Grado de libertad de la función calculada por regresión no lineal de la frecuencia normalizada de distribución de los OTC. La probabilidad de los modelos en todos los casos es de $P < 0,001$.

NI: melanocitos no irradiados

- 30 NI + ATP: melanocitos no irradiados y tratados previamente con ATP (4 mM) durante 30 min

NI + Citru: melanocitos no irradiados y tratados previamente con citrullil-arginina (4 mM) durante 30 min

UVA: melanocitos irradiados con UVA (0,8 J/cm²)

UVA + ATP: melanocitos irradiados con rayos UVA (0,8 J/cm²) y tratados previamente con ATP (4 mM) durante 30 min

- 35 UVA + Citru: melanocitos irradiados con rayos UVA (0,8 J/cm²) y tratados previamente con citrullil-arginina (4 mM) durante 30 min

NS: diferencia no significativa entre UVA + Citru y UVA + ATP.

El grado de protección de citrullil-arginina es muy superior al de ATP. La sinergia entre la molécula de ATP y el péptido es muy clara.

- 40 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar por tanto el alcance.

Ejemplos

- 45 Ejemplo 1: Crema anti-arrugas (según la invención)

Estearato de sacarosa	0,5-6 %
Diestearato de sacarosa	0,5-6 %
ATP disódico	0,01-0,05 %
50 Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5-1 %
Triglicérido caprílico/cáprico	3-15 %
Triglicérido caprílico/cáprico/succínico	3-15 %
Ceramidas 3	0,05-1 %
Palmitato de ascorbilo	0,01-0,1 %
55 Acetato de tocoferilo	0,05-1 %
Urea	0,5-2 %

	Cloruro de calcio	0,05-0,5 %
	Cloruro de magnesio	0,05-0,5 %
	β -alanil-L-histidina (carnosina)	0,5-1 %
5	<i>Gly-His-Lys (polvo de péptido)</i>	10-5 ppm
	Serina	0,2-2 %
	Glicerina	0,5-3 %
	Ácido cítrico	0,1-0,5 %
	Citrato trisódico	0,5-1,5 %
10	Palmitato de vitamina A	0,1-0,5 %
	Fosfolípidos	0,1-0,4 %
	Superóxido dismutasa	0,5-2 %
	Hialuronato de sodio	0,5-3 %
	Sorbato de potasio	0,2-0,5 %
15	Goma de esclerocio	0,1-0,5 %
	Goma xantana	0,1-0,5 %
	Agua	csp.100 %
	Perfume	cs.
	Conservantes	cs.
20	Ejemplo 2: Leche hidratante (fuera de la invención)	
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,3-1 %
	Fosfolípidos	3 %
25	Ceramida 3	0,1 %
	Palmitato de vitamina A	0,15 %
	Estearato-20	0,2 %
	Estearato-2	1 a 3 %
	Metilparaben	0,25 %
30	Cloruro de calcio	0,01 %
	Cloruro de magnesio	0,01 %
	Agua	csp.100 %
	Alcohol cetosteárico	2 a 4 %A
	Miristato de miristilo	2 a 4 %
35	Miristato de isopropilo	4 %
	Glicerina	1 %
	L-citrulil-L-Arginina	0,1 a 2 %
	Dimeticona	0,5 %
	Alcoholes lanolínicos	0,5 %
40	Propilparaben	0,25 %
	Ejemplo 3: Crema hidratante (fuera de la invención)	
	ATP disódico	0,01-0,05 %
45	Oleato de sorbitán	3,5 %
	Polisorbato 80	2 a 4 %
	Aceite de germen de trigo	3 %
	Aceite de almendras dulces	5 %
	Miristato de isopropilo	12 %
50	Fosfolípidos	0,5 %
	Ceramidas 3	0,1 %
	Poliacrilamida e isoparafina C ₁₄₋₁₃ y laureth-7	2 a 3,5 %
	Palmitato de vitamina A	0,1 %
	Tocoferol	0,05 %
55	PCANa	0,5 %
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5 1 %
	Hialuronato de sodio	0,1 %
	Agua	csp.100 %
	L-citrulil-L-arginina	0,1 a 2 %
60	Conservantes	csp
	Perfume	csp

Ejemplo 4: Crema bronceadora solar protectora

	ATP disódico	0,01-0,05 %
	Metoxicinamato de octilo	6,00 %
5	(Neo Heliopant AV)	
	Butil-metoxidibenzoilmetano	3,00 %
	(Parsolt 1789)	
	Octil-triazona	2,00 %
	(Uvinul T150)	
10	Di-alquil tartrato C12-13	8,00 %A
	(Cosmacolt ETI)	
	Alcohol cetílico	0,50 %
	Dimeticona	0,50 %
	Coco caprilato/caprato	8,00 %
15	PVP/copolímero de eicoseno	2,00 %
	Cetil-fosfato de potasio	2,00 %
	Metil y propil-paraben	0,25 %
	EDTA disódico	0,10 %
	BHT	0,05 %
20	Carbómero	10,00 %
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5-1 %
	Alanil-l-histidina (carnosina)	0,8-1 %
	Propilenglicol	5,00 %
	Hidróxido de potasio	4,05 %
25	Ácido fenilbencimidazolsulfónico	2,00 %
	(Eusolex 232)	
	Acetato de tocoferilo	2,50 %
	Pantenol	1,00 %
	MSH (Ala-His-Lys-Phe-Tyr)	0,0001 a 0,00001 %
30	<i>Fotoliasa</i>	0,1 %
	Agua	csp.100 %
	Perfume	cs

Ejemplo 5: Crema solar fotoprotectora y reparadora (según la invención)

35	ATP disódico	0,01-0,05 %
	Etoxi-diglicol y pepino	8,00 %
	Di-alquil tartrato C12-13	
	(Cosmacolt ETI)	5,00 %
40	Metoxicinamato de octilo	
	(Parsoit MCX)	5,00 %
	Butil-metoxidibenzoilmetano	
	(Parsolt 1789)	2,00 %
	Dimeticona trimetilsilicatosilicato	3,00 %
45	Acetato de tocoferilo	0,20 %
	Diestearato de sacarosa	5,00 %
	Hexilenglicol	5,00 %
	Butil-, metil-, propil-paraben + fenoxietanol	0,40 %
	<i>L-citrulil-L-arginina agua</i>	0,1 a 2 %
50	csp.100 %	
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	1-1,5 %
	MSH (Ala-His-Lys-Phe Tyr)	0,0001 a 0,00001 %
	Endonucleasa	0,2 %
	Alanil-l-histidina (carnosina)	0,5-1 %
55	Perfume cs.	

Ejemplo 6: Leche calmante fotorreparadora (fuera de la invención)

60	Aceite mineral	2,00 %
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5-1 %
	Di-alquil tartrato C12-13	4,00 %A
	(Cosmacolt ETI)	
	Estearato de octilo	3,00 %A
65	Isoamil-p-metoxicinamato	5,00 %
	(Parsolt MCX)	

	Butil-metoxidibenzoilmetano (Parsolt 1789)	1,00 %
	Diisoestearato de poligliceril-3	4,00 %A
	PEG-20 laurato de glicerilo	1,00 %
5	Carbómero	0,4 %
	Propilenglicol	2,00 %
	Conservantes	0,50 %
	Goma xantana	0,30 %
	Trietanolamina	0,85 %
10	Ácido fenilbencimidazol-sulfónico (Neo Heliopant Hydro)	2,5 %
	Acetil-tirosina	2,00 %
	alanil-I-histidina (carnosina)	0,5-1 %
	Gly-His-Lys (polvo de péptido)	10 a 5 ppm
15	Agua csp.100 %	
	Perfume	cs.
Ejemplo 7 Crema facial desensibilizante (fuera de la invención)		
20	Triglicérido caprílico/cáprico/succínico	1 a 10 %
	Palmitato de ascorbilo	0,01 a 0,1 %
	Estearato de glicerilo	1 a 5 %
	Ácido esteárico	1 a 5 %
	Acetato de tocoferol	0,1 a 1 %
25	Triglicérido caprílico/cáprico	1 a 15 %
	ATP disódico	0,01-0,05 %
	Piridoxina	0,01 0,05 %
	Ácido cítrico	0,1 a 0,5 %
	Gluconato de cinc	0,1 a 1 %
30	Citrato trisódico	1 a 2,5 %
	<i>L-citrulil-L-arginina</i>	0,1 a 2 %
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5-1 %
	Glicerina	1 a 4 %
35	Palmitato de vitamina A	0,01 a 1 %
	d-pantenol	0,1 a 1 %
	Ramnososa	0,1 a 1 %
	L-fucosa	0,01 a 1 %
	Lactoferrina/lactoperoxidasa	0,01 a 1 %
40	Superóxido dismutasa	0,01 a 1 %
	Poliacrilamida/isoparafina C13-14/laureth-7	0,2 a 1 %
	Agua	csp.100 %
Ejemplo 8: Loción corporal calmante (según la invención)		
45	Polímero de ácido acrílico	0,1-1,5 %
	Ácido glicirretínico	0,1-1 %
	Trietanolamina	0,1-2 %
	Butilenglicol	0,5-4 %
50	ATP disódico	0,01-0,05 %
	Palmitato de ascorbilo	0,01 a 0,1 %
	Acetato de tocoferol	0,1 a 1 %
	Piridoxina	0,01 a 0,05 %
	Ácido cítrico	0,1 a 0,5 %
55	Gluconato de cinc	0,1 a 1 %
	Citrato trisódico	1 a 2,5 %
	L-Arginina	0,1 a 2 %
	Palmitato de vitamina A	0,01 a 1 %
	d-pantenol	0,1-1 %
60	L-fucosa	0,01 a 1 %
	Lactoferrina/lactoperoxidasa	0,01 a 1 %
	Alanil-I-histidina (carnosina)	0,5-1 %

	<i>R-Gly-Gln-Pro-Arg</i>	15 a 20 ppm
	Superóxido dismutasa	0,01 a 1 %
	Sorbato potásico	0,1 a 0,6 %
	Conservantes	cs.
5	Agua	csp.100 %
Ejemplo 9: crema calmante para pieles grasas (fuera de la invención)		
	Propilenglicol	1-8 %
10	Monolaurato de sorbitán	0,5-5 %
	Dimeticona copoliol	0,1-5 %
	Ácido salicílico	0,1-0,5 %
	EDTA disódico	0,05-0,5 %
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	0,5-1 %
15	ATP disódico	0,01-0,05 %
	Gluconato de cinc	0,1 a 1 %
	Palmitato de ascorbilo	0,01 a 0,1 %
	Acetato de tocoferol	0,1 a 1 %
	Piridoxina	0,01 a 0,05 %
20	Ácido cítrico	0,1-0,5 %
	Cloruro de sodio	0,1-1,5 %
	Citrato trisódico	1 a 2,5 %
	L-Arginina	0,1 a 2 %
	Palmitato de vitamina A	0,01 a 1 %
25	d-pantenol	0,1 a 1 %
	Ramnosa	0,1 a 1 %
	L-fucosa	0,01 a 1 %
	Lactoferrina/lactoperoxidasa	0,01 a 1 %
30	<i>Gly-His-Lys (polvo de péptido)</i>	10-5 ppm
	Superóxido dismutasa	0,01 a 1 %
	Conservantes	cs.
	Agua	csp.100 %
35	Ejemplo 10: Loción desmaquillante (según la invención)	
	Diguanosina tetrafosfato (Gp4G)	1-2 %
	ATP disódico	0,1-0,5 %
40	Citrato trisódico	1 a 2,5 %
	Glicerina	0,5-3 %
	Hexilenglicol	4-5 %
	d-pantenol	0,1-1 %
	<i>Alanil-L-histidina (carnosina)</i>	0,5-1 %
45	Conservantes (metil parabeno y fenoxietanol)	cs.
	Agua	csp.100 %

REIVINDICACIONES

1. Composición cosmética que comprende un sistema bioactivo que asocia:

- 5 - por una parte, una forma estable en solución acuosa de ATP (adenosín trifosfato) en forma de una sal de sodio de ATP, en presencia opcionalmente de Gp₄G (diguanosina tetrafosfato) o Ap₄A (diadenosina tetrafosfato), y
- por otra parte, al menos un dipéptido biomimético que imita un polipéptido cutáneo o una proteína cutánea, una biomolécula agonista o antagonista a dicho polipéptido cutáneo o a dicha proteína cutánea, dicho dipéptido biomimético es β -alanil-L-histidina.

10

2. Composición según la reivindicación 1, *caracterizada por que* la sal de sodio de ATP es una sal disódica.