



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 317 741**

⑫ Número de solicitud: 200601662

⑮ Int. Cl.:

**A61K 8/44** (2006.01)

**A61Q 17/04** (2006.01)

**A61K 31/196** (2006.01)

**A61P 17/18** (2006.01)

**A61K 36/04** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.06.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.04.2009**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Málaga  
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)  
29590 Campanillas, Málaga, ES**

⑱ Inventor/es: **López Figueroa, Félix;  
Aguilera Arjona, José;  
Coba Luque, Francisca de la y  
Korbee Peinado, Nathalie**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Composición para protección solar a base de extractos de algas y líquenes.**

㉑ Resumen:

Composición para protección solar a base de extractos de algas y líquenes.

La presente invención se encuadra en el sector biotecnológico y describe el potencial uso como sustancias antioxidantes de aminoácidos tipo micospolina (MAAs), concretamente de *Porphyra-334* aislado del alga roja *Porphyra leucosticta* y de *mycosporine-gly* aislado del líquen marino *Lichina pygmaea*, además de su aplicación en la preparación de composiciones para protección solar.

ES 2 317 741 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición para protección solar a base de extractos de algas y líquenes.

## 5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector biotecnológico y describe el potencial uso como sustancias antioxidantes de extractos purificados de determinados metabolitos secundarios denominados aminoácidos tipo micosporina (MAAs) aislados de algas rojas y líquenes marinos además de su posible aplicación en productos para protección solar.

## 10 Estado de la técnica

La radiación ultravioleta (UV) tanto procedente del sol como de fuentes artificiales es potencialmente nociva para los organismos a varios niveles. En humanos, la radiación UVB (longitud de onda = 280-315 nm) es responsable de la producción de eritema actínico, quemaduras solares y carcinogénesis además de estar directamente relacionada con procesos de inmunosupresión mientras que la radiación UVA (longitud de onda=315-400 nm) es la responsable del bronceado inmediato de la piel, del fotoenvejecimiento y la fotosensibilización cutánea. La radiación UVA es capaz de reaccionar con moléculas de oxígeno para dar lugar a oxígeno singlete y anión superóxido, capaces ambos de inducir lesiones de las membranas celulares, desnaturalización proteica y roturas en los enlaces de ADN (Black, H. S., 1993, In: J. Fuchs and L. Packer -eds.- Oxidative stress in Dermatology, Marcel Dekker, New York pp. 243-269).

Las respuestas fotobiológicas a la radiación UV dependen de la energía del flujo de fotones incidente y de la eficacia relativa de la energía fotónica para producir un efecto biológico determinado. La capacidad de absorción depende de la naturaleza de las moléculas, siendo las más absorbentes las que contienen *grupos cromóforos*, como son las proteínas de la queratina, los dobles enlaces de los compuestos orgánicos insaturados, anillos bencénicos, melanina, lipoproteínas, purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos, etc.

El *espectro de acción* de cada molécula es único, ya que viene fijado por la configuración electrónica de sus átomos y determina las longitudes de onda absorbidas por una molécula que inducen una respuesta fotobiológica específica e indica cuales de dichas longitudes de onda son más aptas para producir un efecto biológico (Rundel R. D., 1983, *Physiol. Plant.* 58: 360-366). Un espectro de acción no es más que una función que refleja el efecto de una determinada longitud de onda sobre una variable biológica, ya sea a nivel molecular (el daño en ADN) o a nivel de organismo (el crecimiento de las plantas). Cuando el espectro de radiación espectral de emisión del sol o de cualquier fuente de emisión artificial se multiplica por el espectro biológico en unidades relativas se obtiene el espectro de radiación biológicamente efectiva, es decir, aquellas longitudes de onda que potencialmente son las responsables de causar un efecto determinado. En la actualidad se conocen numerosos espectros de acción que describen alteraciones y anomalías relacionadas con la radiación UV, como es el caso de patologías cutáneas como el eritema (McKinlay A.F. & Diffey B.L., 1987, CIE Research Note, CIE-Journal, 6: 17-22), daño en ADN (Setlow, R.B., 1974, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 3363-3366), fotocarcinogénesis (De Gruijl F.R., Sterenborg H.J.C.M., Forbes P.D., Davies R.E., Cole C., Kelfkens G., van Weelden H., Slaper H. & van der Leun J.C., 1993, *Cancer Res.* 53: 53-60), inmunosupresión (De Fabo E.C. & Noonan F.P., 1983, *J. Exp. Med.* 158: 84-98), inmunosupresión sistémica (De Fabo E.C. & Kripke M.L., 1980, *Photochem Photobiol* 32:183), fotoisomerización del cis-urocánico (Gibbs N.K., Norval M., Traynor N.J., Wolf M., Johnson B.E. & Crosby J., 1993, *Photochem Photobiol* 57: 584-590), formación de radicales oxidantes como el oxígeno singlete (Hanson K.M. & Simon J.D., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 95:10576-10578), elastosis (Wulf H.D., Poulsen T., Davies R.E. & Urbach F., 1989, *Photodermatology* 6: 44-51) y fotoenvejecimiento (Bisset, D.L., Hannon, D.P. & Orr, T.V., 1989, *Photochem. Photobiol.* 50: 763-769).

Los espectros de acción son una herramienta fundamental en campos como la fotobiología y medicina ya que permite incluso correlacionar causas/efectos en los mecanismos que desencadenan una patología.

La disminución de la capa de ozono detectada en estas últimas décadas junto a mayores exposiciones a la radiación UV por causas laborales, estéticas, ocio, etc., han incrementado los efectos nocivos en la salud humana de la radiación UV y se ha producido un incremento de la incidencia de cáncer de piel.

En el mercado existen muchos protectores solares que se presentan como eficaces frente a las radiaciones UVA y UVB. El efecto protector de los filtros está bien establecido en lo que respecta a radiación UVB, se utiliza el factor de protección solar (FPS), tomándose como marcador oficial únicamente la protección frente al eritema actínico (quemadura solar). Sin embargo, respecto a la radiación UVA, a pesar de que muchos productos reivindican protección contra la misma, no existe un sistema estandarizado de evaluación y, por lo tanto, es difícil discernir el nivel de prevención que otorgan. Es más, un problema de muchos de los filtros solares del mercado, de origen sintético, es que provocan reacciones de fotosensibilidad en algunos individuos.

Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs), presentes en multitud de organismos acuáticos, son compuestos que tienen una estructura química caracterizada por un anillo de ciclohexenona o ciclohexenimina con aminoácidos o aminoalcoholes incorporados en dichos anillos. Estas moléculas, debido a su estructura química, son eficaces como filtros de la radiación ultravioleta entre 300 y 350 nm. Los MAAs disipan térmicamente, de modo muy eficiente, la energía absorbida procedente de la radiación UV sin producir residuos de la fotólisis de las moléculas. Todo ello, unido a la alta fotoestabilidad *in vitro* (Conde, F. R., Churio, M. S. & Previtali, C. M., 2000, *J Photochem. Photobiol.* 56:139-

144; Conde, F. R., Churio, M. S. & Previtali, C. M., 2004, *Photochemical and Photobiological Sciences* 3: 960-967) e *in vivo* (Adams, N. L. & Shick, J. M., 2001, *Mar. Biol.* 138:267-280) son atributos de un buen fotoprotector frente a la radiación UV.

5 En algas rojas, los MAAs pueden además tener actividad antioxidante, inicialmente se demostró *in vitro* en *mycosporine-gly* (Dunlap, W. C. & Yamamoto, Y., 1995, *Comp. Biochem. Physiol. B* 112:105-114). Nakayama y colaboradores (1999) encontraron que el usijirene aislado del alga roja *Porphyra yezoensis* tenía una alta actividad antioxidante (Nakayama, R., Tamura, Y., Kikuzaki, H. & Nakatani, N., 1999, *J Am. Oil Chem. Soc.* 76: 649-653). Esta propiedad podría estar también relacionada con la capacidad de los MAAs extraídos de *Porphyra yezoensis* para bloquear la producción de fotodímeros de timina (Misonou T., Saitoh J., Oshiba S., Tokitomo Y., Maegawa M., Inoue Y., Hori H. & Sakurai T., 2003, *Mar. Biotechnol.* 5: 194-200). Además, ciertos MAAs son capaces de secuestrar radicales libres hidrosolubles e inhibir en un alto porcentaje la peroxidación lipídica y la formación de radicales superóxido (P200502161, P200502162). Una gran parte de los organismos acuáticos vegetales contienen aminoácidos tipo micosporina. Los aminoácidos tipo micosporina que se encuentran en algunos animales marinos son obtenidos a partir de la dieta. Existe una gran variedad en lo que respecta al contenido de cada uno de ellos en especies diferentes, siendo las algas rojas y los líquenes los que presentan concentraciones más altas en la mayoría de los casos. El alga roja *Porphyra leucosticta* presenta del orden de 3-6 mg/gPS del MAA *porphyra-334* mientras que el liquen *Lichina pygmaea* del orden de 1-1.5 mg/gPS de *mycosporine-gly*.

20 Un cierto número de trabajos han evaluado la capacidad fotoprotectora de extractos de plantas, cianobacterias, líquenes, etc., que contenían sustancias capaces de absorber la radiación UV. Concretamente extractos del liquen *Collema* inhibían la formación de dímeros de timina y presentaban resultados positivos en ensayos de supervivencia de queratinocitos humanos (WO 03/020236 A2).

25 Otros autores han mezclado MAAs tales como *mycosporine-gly*, *palythine*, *asterina-330*, *palythanol*, *palythene*, *porphyra-334*, *mycosporine-gly-valine*, *shinorine* y *MAA-357* provenientes de organismos marinos antárticos consiguiendo emulsiones hidro-oleosas con factores de protección solar de al menos 2 pero calculado a través de cambios en la eficiencia del fotosistema II en cultivos de cianobacterias, a través de la fluorescencia de la clorofila,  $F_v/F_m$  (WO 00/24369). Dichas composiciones son reivindicadas comprendiendo, además de un MAA, al menos un *carrier*, un carotenoide o derivado con actividad protectora frente a la radiación solar, y un compuesto polifenólico o derivado también con dicha actividad. De forma similar, el documento WO 02/39974 reivindica composiciones para el cuidado personal que comprenden un MAA seleccionado del grupo *palythine*, *palythine serine*, *palythanol*, *asterina*, *mycosporine-2-glycine*, *shinorine*, *porphyra-334*, *N-methyl mycosporine serine*, *N-methyl mycosporine threonine*, *mycosporine-glycine valine*, *palythenic acid*, *usijirene* y *palythene*; y el uso de dicho MAA en combinación con un agente fotoprotector adicional para la preparación de composiciones para protección frente a radiación UV.

En el presente documento se presentan formulaciones que incluyen extractos de dos aminoácidos tipo micosporina concretos, *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, obtenidos con un alto grado de pureza a partir de *Porphyra leucosticta* y *Lichina pygmaea*, respectivamente, y que se pueden formular juntos o por separado. El potencial fotoprotector de estas cremas se compara con otra formulación que contiene el mismo porcentaje de filtros solares que la crema mezcla de *porphyra-334* + *mycosporine-gly* pero formulada a partir de dos filtros usados como estándares por el método COLIPA y que se encuentran con frecuencia en fotoprotectores comerciales: octilmetoxicinamato (OMC), con máximos de absorción en el ultravioleta B, y butilmetoxidibenzoilmetano (BMDM), que protege en la región del UVA. El Factor de Protección Solar (FPS) se calcula a partir del espectro de acción del eritema utilizando el método Diffey (*in vitro*) que permite calcular potenciales de protección no sólo de patologías relacionadas con la radiación UVB sino también aquellas relacionadas básicamente con la radiación UVA, como son la formación de oxígeno singlete desencadenante de los procesos de fotoenvejecimiento.

Por primera vez se presenta una composición fotoprotectora compuesta exclusivamente por extractos de dos moléculas con alto nivel de purificación, que presenta valores de protección mejorados a si se formulan por separado, y cuyo potencial fotoprotector ante importantes patologías causadas o agravadas por la radiación UV es comparable a cremas que incluyen filtros solares comerciales. A diferencia de los documentos WO 00/24369 y WO 02/39974, considerados los más próximos en el estado de la técnica, las características de los MAAs purificados y de las composiciones que los incluyen y que se presentan en el actual documento hacen prescindible (aunque no excluye la posibilidad) la inclusión adicional de otros agentes fotoprotectores, algo especificado de forma explícita en los referidos documentos. Por otra parte, los MAAs referidos en el presente documento difieren del grupo de MAAs contemplado en el documento WO 02/39974, puesto que *mycosporine-glycine* y *mycosporine-2-glycine* no son estrictamente el mismo compuesto.

La presente patente comprende una formulación en crema compuesta por una mezcla de extractos de los aminoácidos tipo micosporina, *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, en un porcentaje de 4.1% y 2.9% respectivamente, que presenta unos excelentes resultados *in vitro* frente a la protección de diferentes efectos nocivos provocados por la radiación UV.

### Descripción detallada de la invención

65 Los solicitantes han comprobado que tras la purificación de extractos de los aminoácidos tipo micosporina *porphyra-334* extraído del alga *P. leucosticta* y *mycosporine-gly* extraído del liquen *L. pygmaea*, y su presentación combinada en formulación cosmética destinada a su aplicación tópica en piel, estos MAAs ejercen una acción físico-química de

filtro, al absorber la radiación en un amplio espectro de longitudes de onda (300-400 nm) y limitando la cantidad de radiación UV que alcanza la piel, además de poseer un alto potencial de secuestro de radicales libres hidrosolubles y radicales superóxido, e inhibir la peroxidación lipídica (P200502161, P200502162). Sus propiedades de absorción confieren al preparado un gran potencial *in vitro* para la prevención de cáncer de piel y demás patologías asociadas a la exposición a la radiación ultravioleta como las quemaduras, inflamación e irritación de la piel. Se presenta una formulación de origen natural capaz de ofrecer protección efectiva frente a la producción de eritema, daño en ADN, fotocarcinogénesis, inmunosupresión local y sistémica, fotoisomerización del cis-urocánico, formación de radicales oxidantes como el oxígeno singlete, elastosis y fotoenvejecimiento.

Se presenta como una excelente alternativa de origen natural a los filtros químicos que actualmente se encuentran en el mercado.

### Descripción de los dibujos

Figura 1. Estructura química de los MAAs *mycosporine-gly* (A) y *porphyra-334* (B) aislados del liquen marino *Lichina pygmaea* y del alga roja *Porphyra leucosticta*, respectivamente.

Figura 2. Fotografía del rectángulo en la espalda donde se aplicó uniformemente la crema evaluada tras la exposición a una radiación equivalente a 6.5, 8 y 9.5 MEDs tras 24 horas después de la aplicación.

Figura 3. Espectros relativos de absorción de las diferentes formulaciones con máximos de absorción a 334 nm para la formulación 1 (conteniendo como MAA sólo *porphyra-334*, simbolizada como “P-334”), 308 nm para la formulación 2 (conteniendo como MAA sólo *mycosporine-gly*, simbolizada como “M-gly”) y amplios espectros en la región del UV (con máximo de absorción a 320 nm) para la formulación 3 que contiene una mezcla de ambas MAAs (*porphyra-334* y *mycosporine-gly*, simbolizada como “Mezcla”) y formulación 4 que corresponde a la crema de referencia (compuesta por una mezcla de filtros químicos, octilmetoxicinamato y butilmetoxidibenzoilmetano, utilizados como filtros de referencia de potencial de fotoprotección por la asociación COLIPA, y simbolizada como “Referencia”).

Figura 4. Espectro de transmitancia en % de las 4 formulaciones así como de la fórmula base empleada en las mismas (combinación de Neo PCL y propilenglicol). Las formulaciones 2 (conteniendo como MAA sólo *mycosporine-gly*, simbolizada como “M-gly”), 3 (contiene una mezcla de ambas MAAs, *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, simbolizada como “Mezcla”) y 4 (compuesta por una mezcla de filtros químicos, octilmetoxicinamato y butilmetoxidibenzoilmetano, utilizados como filtros de referencia de potencial de fotoprotección por la asociación COLIPA, y simbolizada como “Referencia”) presentan valores de transmitancia similares en la región del UVB mientras que la formulación 1 (conteniendo como MAA sólo *porphyra-334*, simbolizada como “P-334”) presenta valores más altos, sobre todo en la región más eritematogénica.

Figura 5. Factor de protección solar monocromático (eritema) para las 4 formulaciones. Las formulaciones 2, 3 y 4 presentan valores en torno a 12 en la región del UVB mientras que la formulación 1 es menos efectiva.

### Modos de realización de la invención

La presente invención se refiere a una nueva composición a base de extractos y concentrados purificados obtenidos a partir del alga marina *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis (familia Bangiaceae, Orden Bangiales, Clase Bangiophyceae, *Phylum Rhodophyta*) y del liquen *Lichina pygmaea* (Lightf.) C. Agardh (familia Lichinaceae, Orden Lichinales, *Phylum Fungi*), con acción de filtro de radiación ultravioleta destinado a su aplicación tópica.

En una realización preferida, dicha composición contiene una mezcla de extractos de los aminoácidos tipo micoporina, *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, en un porcentaje de 4.1% y 2.9% respectivamente destinada para uso tópico con un alto potencial como agente protector de la piel contra las agresiones provocadas por la radiación solar (UVA y UVB).

#### *Purificación de porphyra-334 y mycosporine-gly a escala preparativa*

- La extracción a escala preparativa se realizó extrayendo 60-80 g de peso fresco del material biológico en 1 L de metanol al 20% (v/v) e incubándose en un baño termostático a 45°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó el extracto a 14000 rpm durante 15 minutos y se evaporó el metanol de la muestra usando rotoevaporación al vacío para concentrar el extracto.
- La purificación se realizó en tres pasos consecutivos en los que se combinaron técnicas cromatográficas de absorción mediante la aplicación de carbono activo, precipitación de polisacáridos tras añadir a la muestra metanol 100% y separación final mediante cromatografía de intercambio iónico (resina Dowex 50 W x 8-100). Para la elución de *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, se utilizó agua bidestilada, con un pH ligeramente alcalino (pH 7.2). Tras el proceso de purificación, se obtuvieron soluciones acuosas de MAAs con alto grado de pureza.

Los MAAs se identificaron y cuantificaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el análisis se empleó como fase estacionaria la columna C<sub>8</sub> (Sphereclone™, Phenomenex, Alemania) de tamaño 250

x 4.6 mm, empaquetada con micropartículas porosas de silica de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro con superficie derivatizada con una cadena alifática de 8 átomos de carbono (octadecil silano). La fase móvil empleada fue metanol al 2.5% (v/v) con un 0.1% de ácido acético (v/v) bombeada isocráticamente a una velocidad de flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. La detección y cuantificación se realizó con un detector de fotodiodos UV-visible (Photodiode Array Detector Waters 996).

#### Preparado de una crema para uso tópico

Una vez que se obtuvieron los extractos purificados en fase acuosa de *porphyra-334* y *mycosporine-gly*, se procedió a elaborar el producto cosmético de la presente invención. Para el preparado de la crema solar se empleó como fórmula base la combinación de Neo PCL y propilenglicol además de un extracto acuoso que contenía los distintos filtros solares. Las proporciones entre los tres componentes fueron 4:1:14 (en % peso/volumen para Neo PCL, % volumen/volumen para propilenglicol y para extracto acuoso), y 19.6% p/v, 4.9% v/v, y 68.6% v/v en la composición o formulación final, respectivamente. La formulación se realizó a una temperatura de 60°C. Las composiciones eran químicamente estables y resistentes a la fotodegradación, de fácil absorción por la piel y capaces de crear una película continua y uniforme. Se fabrican cuatro formulaciones, dos de ellas contienen los MAA's, *porphyra-334* y *mycosporine-gly* en porcentajes aproximados del 5% en el extracto acuoso, otra contiene una mezcla de ambos MAA's presentándose como mayoritaria la *porphyra-334* (4.1% en el extracto acuoso). Por último y como referencia se utilizó una formulación compuesta por una mezcla de filtros químicos, octilmetoxicinamato y butilmetoxidibenzoilmetano, utilizados como filtros de referencia de potencial de fotoprotección por la asociación COLIPA (*European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*), con máximos de absorción en el ultravioleta B y ultravioleta A respectivamente (2.65 y 4.46% en el extracto acuoso). El volumen final de cada composición (formulaciones 1 a 4), atendiendo a los porcentajes de cada componente en la misma indicados más arriba, fue de 250  $\mu\text{L}$  en las realizaciones preferidas especificadas, no siendo relevante dicho volumen final y sí las proporciones de los componentes en la misma y entre ellos mismos. Los porcentajes indicados para cada MAA corresponde a la concentración de los mismos en el extracto acuoso comprendido en la composición o formulación.

#### Formulación 1 (*porphyra-334*)

|                     |   |
|---------------------|---|
| Neo PCL             | 50 mg   |
| Propilenglicol      | 12.5 $\mu\text{L}$                                  |
| Extracto acuoso     | 175 $\mu\text{L}$ (al 5.6% de <i>porphyra-334</i> ) |
| Máximo de absorción | 334 nm  |

#### Formulación 2 (*mycosporine-gly*)

|                     |  |
|---------------------|--|
| Neo PCL             | 50 mg  |
| Propilenglicol      | 12.5 $\mu\text{L}$                                     |
| Extracto acuoso     | 175 $\mu\text{L}$ (al 5.1% de <i>mycosporine-gly</i> ) |
| Máximo de absorción | 308 nm   |

#### Formulación 3 (mezcla de *porphyra-334* y *mycosporine-gly*)

|                     |  |
|---------------------|--|
| Neo PCL             | 50 mg  |
| Propilenglicol      | 12.5 $\mu\text{L}$   |
| Extracto acuoso     | 175 $\mu\text{L}$ (al 4.1% de <i>porphyra-334</i> y 2.9% de <i>mycosporine-gly</i> ) |
| Máximo de absorción | 320 nm   |

#### Formulación 4 (referencia)

|                     |  |
|---------------------|--|
| Neo PCL             | 50 mg  |
| Propilenglicol      | 12.5 $\mu\text{L}$   |
| Extracto acuoso     | 175 $\mu\text{L}$ (al 2.65% de octilmetoxicinamato y al 4.46% de butilmetoxidibenzoilmetano) |
| Máximo de absorción | Banda ancha con máximos de absorción a 310 y 360 nm.   |

## ES 2 317 741 A1

### Potencial fotoprotector *in vitro* del preparado para uso tópico

Una vez preparadas las diferentes formulaciones se procedió a la estimación del potencial fotoprotector *in vitro* de cada una de ellas mediante el protocolo de Diffey y Robson (Diffey, B.L. & Robson, J. (1989). J. Soc. Cosmet. Chem. 40: 127-133). Este método es un protocolo estandarizado por la asociación COLIPA para el cálculo del factor de protección solar de una solución *in vitro*, el cual nos da la capacidad de fotoprotección de dicha solución contra el potencial de producción de eritema actínico del sol. El fotoprotector (formulación conteniendo sustancias absorbentes o dispersantes de radiación UV) se aplica sobre el soporte adhesivo a una concentración de 2 microlitros por centímetro cuadrado ( $\mu\text{L cm}^{-2}$ ). La luz procedente de una fuente de arco de xenón se hace incidir sobre la superficie del adhesivo, sobre la cual se habrá aplicado o no la formulación conteniendo las sustancias absorbentes. El protocolo seguido para el análisis de las diferentes formulaciones fue el siguiente:

Sobre un portaobjetos de cristal de cuarzo de 2 mm de grosor se colocó una cinta adhesiva (Transpore 3M), la cual simula la superficie epidérmica de la piel humana. El portaobjetos se colocó sobre una balanza analítica y con una jeringa de 1 mL se aplicaron  $2 \text{ mg cm}^{-2}$  del producto a evaluar distribuyéndolo en pequeñas gotas a lo largo de toda la superficie. El producto fue distribuido sobre la superficie del portaobjetos con el dedo provisto de un dedal de goma, mediante un suave movimiento circular durante aproximadamente 30 segundos y se dejó secar durante 20 minutos para permitir la rotura de la emulsión. A continuación se efectuó la lectura. Previamente se preparó una muestra de referencia (portaobjetos de cuarzo con la cinta Transpore 3M sin producto) para utilizarlo como línea de base.

Una vez obtenidos los espectros de transmitancia a la luz UV de la referencia, muestras y el espectro de emisión del simulador solar se calculó el factor de protección solar monocromático (FPSM) para cada longitud de onda según la siguiente fórmula:

$$\text{FPSM}(\lambda) = \frac{E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot d\lambda}{E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot T_{\lambda} \cdot d\lambda}$$

Donde:

$E_{\lambda}$  = Espectro eritemático (McKinlay A.F. & Diffey B.L. (1987). CIE Research Note, CIE-Journal, 6: 17-22)

$S_{\lambda}$  = Espectro de irradiación solar

$T_{\lambda}$  = Espectro de transmitancia de la muestra

El cálculo del factor de protección solar (FPS) para toda la banda de UV con efecto eritemático se realizó de la misma forma pero en vez de utilizar cada longitud de onda de forma pero integrando los valores entre 280-400 nm. Finalmente dicho FPS se expresó matemáticamente por la razón del tiempo de irradiación necesario para alcanzar el umbral eritemático sin filtros ultravioleta.

Como se indica en los antecedentes de la invención, el uso del FPS, el cual solo nos da idea de la acción eritemática de la radiación ultravioleta, no proporciona datos a nivel de protección de otros efectos biológicos, aunque simule el potencial dañino del sol para algunos de ellos como el caso del potencial fotocarcinogénico de la radiación solar. Por ello se ha establecido la capacidad de fotoprotección de las formulaciones a base de extractos purificados de micospolina para un total de 7 efectos biológicos en los que se ha determinado su espectro de acción y descritos en la literatura del campo de la fotobiología. En la tabla 1 se representan los efectos biológicos para los que se han establecido los factores de protección solar y a los que denominamos factor de protección de efecto biológico (FAPEB). El FAPEB puede entenderse como el número de veces que puede permanecer una persona expuesta al sol comparada con una persona sin protección en la piel antes de que experimente el proceso biológico en cuestión.

Como se observa en la figura 3, *porphyra-334* presentó un máximo de absorción en la banda del ultravioleta A (334 nm) mientras que el máximo de *mycosporine-gly* se situó a 310 nm (UVB). La formulación que contiene una mezcla de ambas presentó una banda ancha de absorción que abarca hasta los 360 nm y cuyo máximo de absorción se situó a 320 nm. El factor de protección solar monocromático (FPSM) para el eritema (figura 5) para la formulación 1 presentó valores máximos de 8 para longitudes de onda en torno a 350 nm (UVA) mientras que las formulaciones 2, 3 y 4 presentaron un FPSM más alto (12) a longitudes de onda más eritematógenas, manteniéndose este valor constante hasta los 350 nm para la formulación 1 y 365 nm para la formulación 2. Al integrar el FPSM entre 300 nm y 400 nm se obtiene el FAPEB para toda la región del ultravioleta que ofrecen las distintas formulaciones en crema, valores que vienen recogidos en la tabla 1 (los valores representan la media y desviación típica -SD- de 4 réplicas; letras diferentes indican diferencias significativas entre las formulaciones para cada uno de los efectos biológicos). Los resultados mostrados en la tabla 1 se presentan como valor medio y la desviación estándar de al menos 4 réplicas. La significación estadística de las medias fue contrastada mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey (Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1986) Editorial Reverté 362 pp). El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

TABLA 1

| EFECTO BIOLÓGICO                             | FAPEB             |                    |                       |                    |
|--|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|  | P-334             | M-Gly              | Mezcla                | Referencia         |
| <b>Eritema</b>                               | $4.53 \pm 1.58^a$ | $6.47 \pm 1^{a,b}$ | $8.37 \pm 2.12^{b,c}$ | $9.54 \pm 1.53^c$  |
| <b>Daño ADN</b>                              | $4.17 \pm 1.55^a$ | $9.27 \pm 1.98^b$  | $10.18 \pm 2.99^b$    | $9.71 \pm 1.58^b$  |
| <b>Cáncer Piel No Melanómico</b>             | $4.60 \pm 1.63^a$ | $7.55 \pm 1.31^b$  | $8.74 \pm 2.24^b$     | $9.5 \pm 1.49^b$   |
| <b>Inmunosupresión Sistémica</b>             | $5.63 \pm 2.23^a$ | $9.73 \pm 2.17^b$  | $10.72 \pm 2.99^b$    | $10.41 \pm 1.68^b$ |
| <b>Inmunosupresión</b>                       | $5.74 \pm 1.90^a$ | $9.54 \pm 2.07^b$  | $10.61 \pm 2.87^b$    | $10.27 \pm 1.70^b$ |
| <b>Fotoisomerización del Ácido urocánico</b> | $7.06 \pm 3.04^a$ | $9.23 \pm 1.88^a$  | $10.56 \pm 2.84^a$    | $10.13 \pm 1.73^a$ |
| <b>Formación de oxígeno singlete</b>         | $6.51 \pm 2.25^a$ | $2.62 \pm 0.18^b$  | $6.45 \pm 1.69^a$     | $9.74 \pm 1.89^d$  |

En lo referente al daño en el ADN, formación de cáncer de piel no melanómico e inmunosupresión local y sistémica, existe una clara diferencia entre la crema que incluye *porphyra-334* y el resto de formulaciones ( $p < 0.05$ ). La crema que contiene la mezcla de MAAs presenta FAPEBs similares a la formulación de referencia. En cuanto a la aparición de eritema, la formulación mezcla y la de referencia no difieren significativamente en el factor de protección, mientras que en la crema con *porphyra-334* es significativamente inferior ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la fotoisomerización del ácido urocánico no existen variaciones significativas entre las formulaciones, y en cuanto a la formación de oxígeno singlete, la formulación mezcla presenta FAPEBs similares a la de la *porphyra-334* y algo inferiores a la de la crema de referencia.

#### Ensayo in vivo del FPS de una crema con *porphyra-334* + *mycosporine-gly*

Para comprobar *in vivo* algunos de los resultados obtenidos se escogieron a tres voluntarios con un fototipo de piel II definido por DIN-5050, siendo la dosis mínima eritemática (MED) para este fototipo de  $250 \text{ J m}^{-2}$ . Se dibujó sobre la espalda un rectángulo de  $4.5 \times 2 \text{ cm}^2$  y se aplicó uniformemente 2 mL de crema por centímetro cuadrado siguiendo el método de la asociación COLIPA. Se dejó actuar durante 20 minutos y seguidamente la piel fue irradiada con un simulador solar ORIEL 2000 (ORIEL, USA). Se aplicó una radiación equivalente a 6.5, 8 y 9.5 MEDs y el eritema fue evaluado tras 24 horas. La dosis mínima de radiación eritemática fue de 8 MEDs (Figura 2). El FPS *in vitro* de la crema era aproximadamente de 8, dato que se corrobora con el ensayo *in vivo*.

#### Conclusiones

La formulación 3 se presenta como una crema para uso tópico creada a partir de sustancias de origen natural que ofrece protección elevada frente a numerosas lesiones y alteraciones causadas por la radiación ultravioleta.

## ES 2 317 741 A1

El uso de una crema que contiene la combinación de *porphyra-334* y *mycosporine-gly* permite la mejora en la capacidad fotoprotectora frente a la radiación solar en comparación con la formulación de ambas *MAAs* por separado.

La formulación 3 se presenta como una excelente alternativa de origen natural frente a los filtros químicos presentes en el mercado ya que a igual porcentaje de sustancias fotoprotectoras que la crema de referencia (~7%) ofrecen resultados similares *in vitro* e *in vivo* (eritema).

La combinación *porphyra-334* - *mycosporine-gly* por sí sola, o incorporada en determinados porcentajes en cremas fotoprotectoras con filtros químicos comerciales puede suponer un incentivo en la venta de estos productos, al incluir sustancias de origen natural.



# REIVINDICACIONES

1. Composición para protección solar que comprende un extracto acuoso con actividad fotoprotectora que consiste en un extracto purificado de *porphyra-334*, en un extracto purificado de *mycosporine-gly*, o en una mezcla de ambos extractos purificados.

2. Composición para protección solar según reivindicación anterior que comprende además un compuesto autoemulsionable y un alcohol.

3. Composición para protección solar según reivindicación anterior en la que el compuesto autoemulsionable es Neo PCL.

4. Composición para protección solar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el alcohol es propilenglicol.

5. Composición para protección solar según la reivindicación anterior que comprende Neo PCL al 19.6% p/v, propilenglicol al 4.9% v/v, y un extracto acuoso al 68.6% v/v que consiste en una mezcla de extractos purificados en fase acuosa de *porphyra-334* y de *mycosporine-gly* presentando dichos aminoácidos en una concentración comprendida en el rango 4.1-5.6% y en el rango 2.9-5.1%, respectivamente.

6. Composición para protección solar según la reivindicación anterior en la que el extracto acuoso que consiste en una mezcla de extractos purificados en fase acuosa de *porphyra-334* y de *mycosporine-gly* presenta dichos aminoácidos al 4.1% y al 2.9%, respectivamente; y que se **caracteriza** porque posee un máximo de absorción en la región ultravioleta (320 nm), y por presentar los siguientes valores de factor de protección de efecto biológico para toda la región del ultravioleta obtenidos al integrar el factor de protección solar monocromático entre 300 y 400 nm: 8 frente a eritema, 10 frente a daño de ADN, 8 frente a cáncer de piel no melanómico, 10 frente a inmunosupresión sistémica, 10 frente a inmunosupresión, 10 frente a fotoisomerización de cis-urocánico, y 6 frente a formación de oxígeno singlete.

7. Producto cosmético que comprende una composición cosmética para protección solar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

8. Uso de la composición para protección solar definida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un producto cosmético para la protección de la piel humana, del pelo humano o de cualquier superficie frente a la radiación solar.

9. Uso según la reivindicación anterior en la preparación de un producto cosmético para la prevención o reducción del desarrollo de melanomas.

Figura 1.

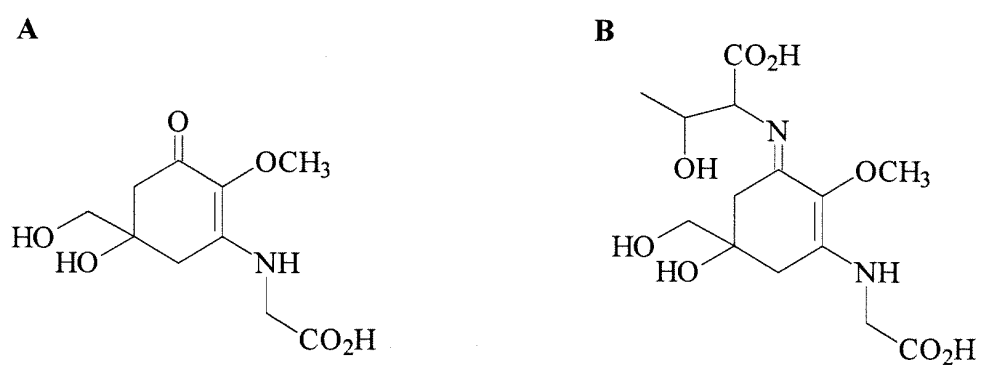


Figura 2.

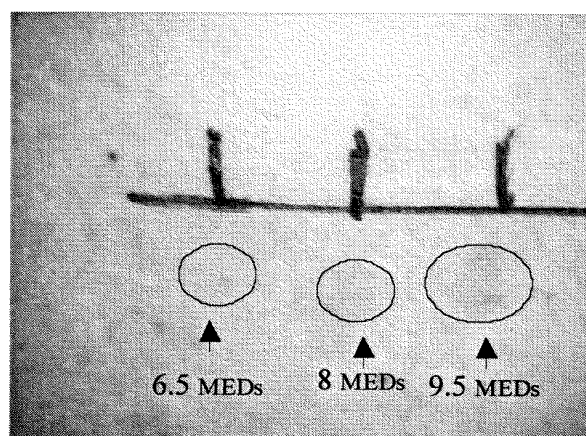


Figura 3.

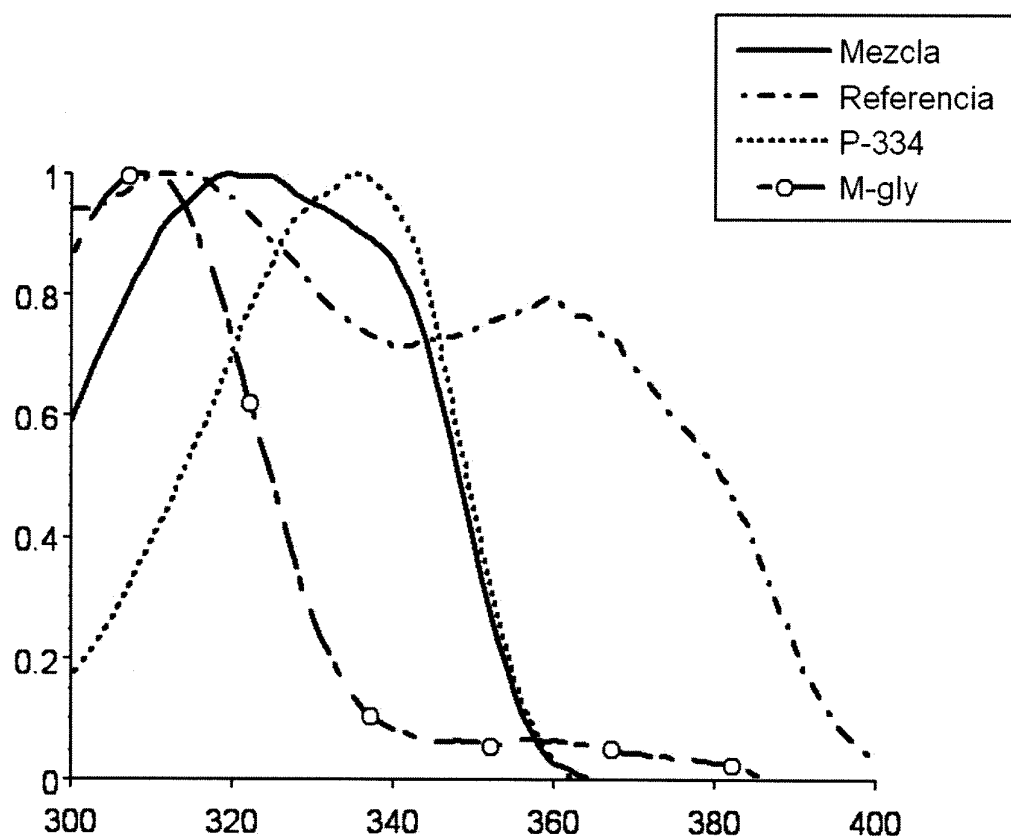


Figura 4.

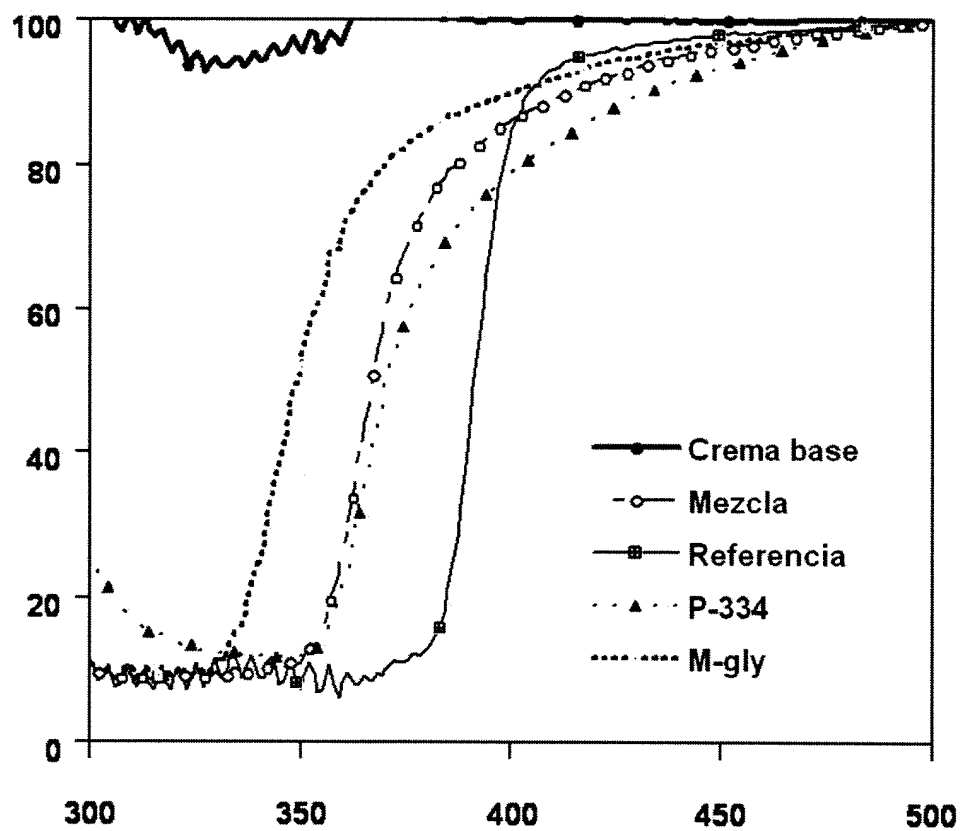
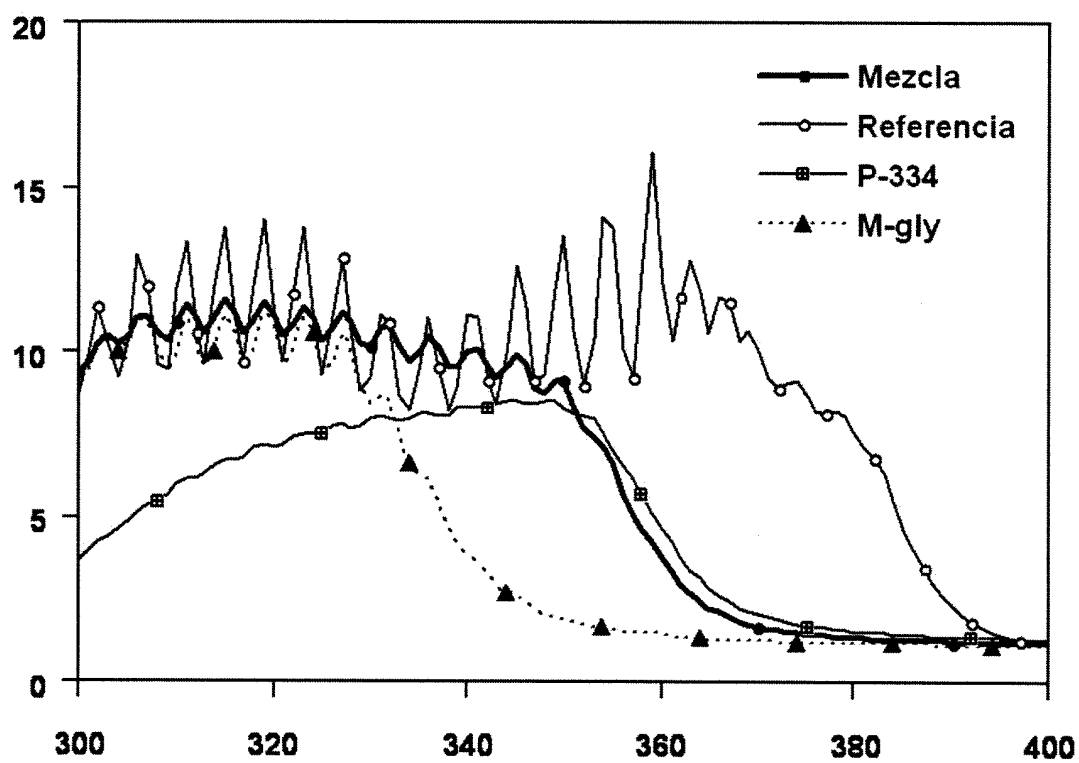


Figura 5.





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 317 741

⑫ Nº de solicitud: 200601662

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 20.06.2006

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| E         | ES 2301294 A1 (UNIVERSIDAD DE MÁLAGA) 16.06.2008, reivindicaciones 1-3.   | 1,7-9                      |
| E         | ES 2301435 A1 (UNIVERSIDAD DE MÁLAGA) 16.06.2008, reivindicaciones 1-3.   | 1,7-9                      |
| X         | FR 2803201 A1 (GELYMA) 06.07.2001, reivindicaciones 1-3,26-29; página 6, líneas 17-20; página 9, líneas 10,16-25; ejemplo 5; página 15, líneas 1-7. | 1-9                        |
| X         | WO 0239974 A1 (NATURAL ENVIRONMENT RESEARCH COUNCIL) 23.05.2002, página 1, línea 1 - página 2, línea 7; tabla 1.                                    | 1-4,7-9                    |
| X         | US 6787147 B1 (HUNER et al.) 07.09.2004, columna 4, línea 30-59; columna 10, líneas 24-44; columna 11, líneas 45-54.                                | 1,7-9                      |
| X         | EP 1473028 A1 (MIBELLE AG) 03.11.2004, todo el documento.   | 1,7,8                      |
| A         | US 5788953 A (SOMLAYAI) 04.08.1998, ejemplo 5.  | 3                          |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.03.2009

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 8/44** (2006.01)  
**A61Q 17/04** (2006.01)  
**A61K 31/196** (2006.01)  
**A61P 17/18** (2006.01)  
*A61K 36/04* (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61Q, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.03.2009

**Declaración**

|  |                  |           |           |
|--|------------------|-----------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>                 | Reivindicaciones | 3,5,6     | <b>SÍ</b> |
|  | Reivindicaciones | 1,2,4,7-9 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva<br/>(Art. 8.1 LP 11/1986)</b> | Reivindicaciones |           | <b>SÍ</b> |
|  | Reivindicaciones | 1-9       | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.



**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01       | ES 2301294                          | 16-08-2008        |
| D02       | ES 23001293                         | 16-06-2008        |
| D03       | FR 2803201                          | 06-07-2001        |
| D04       | WO 0239974                          | 23-05-2002        |
| D05       | US 6787147                          | 07-09-2004        |
| D06       | EP 1473028                          | 03-11-2004        |
| D07       | US 5788953                          | 04-08-1998        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una composición para la protección solar que comprende un extracto acuoso de micosporina-glicina o de porfira-334 o una mezcla de ambos (reivindicación 1). El uso de la composición para preparar un producto cosmético protector frente a la radiación solar y para la prevención del melanoma también es objeto de la invención (reivindicaciones 8 y 9)

D1 y D2 reivindican el uso de composiciones cosméticas que contienen porfira-334 o micosporina-glicina para la prevención y el tratamiento de la fotocarcinogénesis, entre otras enfermedades relacionadas con las radiaciones solares.

Estos documentos, aunque publicados con posterioridad a la presentación de la solicitud en estudio, han sido presentados con anterioridad a la misma, y afectan a la novedad de las reivindicaciones 1,7-9 (art. 6.3 de la ley de patentes)

D3 describe la utilización de extractos hidrosoluble obtenidos de macroalgas rojas (entre ellas reivindica Polysiphonia lanosa y Porphyra tenera o crispata), para composiciones cosméticas y farmacéuticas con el objeto de proteger la piel de las radiaciones ultravioletas y de sus efectos. Los extractos son mezclas naturales de aminoácidos tipo micosporina entre los que figuran M-gly y porphyra-334 (página 11, ejemplo 5) con un máximo de absorción localizado entre los 300-360 nm, preferentemente 320 nm (página 6, líneas 12-20; figura 1), espectro muy parecido al de la formulación 3 de la solicitud. La composición cosmética que figura en la página 15, líneas 1-7, contiene además el alcohol propilenglicol y emulsionantes.

A la vista de este documento, las reivindicaciones 1,4,7,8 y 9 no tienen novedad.

D4 trata de composiciones para proteger la piel o el pelo de radiaciones ultravioletas que contienen aminoácidos tipo micosporina a modo de filtros solares. Estos compuestos se utilizan en una proporción del 0,05-10% sobre la composición total (página 8, líneas 19 a 20, reivindicación 5) y en combinación con otros compuestos orgánicos o inorgánicos con capacidad fotoprotectora. Entre los MAAs, porfira-334 se utiliza en multitud de formulaciones (ver ejemplos) y se protege su uso en la reivindicación 4. En la composición también se pueden utilizar autoemulgentes y alcoholes como el propilenglicol (página 10, línea 4, página 11, línea 29; ejemplos)

Teniendo en cuenta este documento, las reivindicaciones 1,2,4,7,8 y 9 no tienen novedad.

D5 divulga composiciones que protegen de la radiación solar que contienen compuestos naturales extraídos de cianobacterias, algas, hongos, plantas. Entre estos compuestos figuran los aminoácidos tipo micosporina, y en particular, se citan porphyra-334 y M-gly (columna 4, líneas 30-37; reivindicación 7) que se pueden utilizar solos o en una mezcla de ellos (columna 10, líneas 24-44), en forma de extracto acuoso y en cantidades que oscilan entre 0,5 a 5% (página 11, líneas 45-54).

A la vista de este documento las reivindicaciones 1,7,8 y 9 no tienen novedad.

En el documento D6 se reivindica el uso de MAAs para la protección frente a la lipooxidación producida por las radiaciones ultravioletas. Las formulaciones incluyen extracto del alga roja Porphyra umbilicalis que contiene porphyra-334.

Teniendo en cuenta este documento las reivindicaciones 1,7 y 8 no tienen novedad

Hoja adicional

Las composiciones de la reivindicaciones 3, 5 y 6, son nuevas ya que no han sido divulgadas en ningún documento del estado de la técnica.

Considerando el documento D3 como el más cercano del estado de la técnica, la diferencia entre las formulaciones de las reivindicaciones 5 y 6 de la solicitud y las del documento D3 es que en la solicitud se detalla un autoemulsionante diferentes y unas cantidades de MAAs precisas que no han sido divulgadas en D3. Sin embargo, se considera que la selección de estos los productos y estas proporciones son una de las muchas posibilidades que un experto en la materia podría elegir utilizando productos y cantidades normalmente usados en este campo técnico. De hecho, el autoemulsionante Neo PCL en concreto ya ha sido utilizado con anterioridad en este campo de la técnica (ver D7, ejemplo 5). La selección de las formulaciones de las reivindicaciones 3, 5 y 6 no proporcionan ningún efecto o propiedad inesperada en relación a las formulaciones de D3 ya que su espectro de absorción, y por lo tanto sus posibles efectos al utilizarse como protector solar son muy parecidos.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones 3, 5 y 6 carecen de actividad inventiva.