

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 910**

51 Int. Cl.:

C07D 407/04 (2006.01)

C07D 319/06 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2016 PCT/EP2016/056365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2016 E 16717565 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3274347**

54 Título: **Compuestos que presentan actividad antioxidante contra radicales libres y actividad anti-inflamatoria, y las correspondientes composiciones farmacéuticas o cosméticas para cuidado de la piel**

30 Prioridad:

26.03.2015 IT UB20150342

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

28.04.2021

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via P. Palagi 2
20129 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;
BENEDUSI, ANNA;
MARZANI, BARBARA y
BARONI, SERGIO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 821 910 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos que presentan actividad antioxidante contra radicales libres y actividad anti-inflamatoria, y las correspondientes composiciones farmacéuticas o cosméticas para cuidado de la piel

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos que presentan actividad antioxidante frente a radicales libres junto con actividad anti-inflamatoria, siendo útiles dichos compuestos como ingredientes activos para la preparación de composiciones farmacéuticas dermatológicas o cosméticas para el cuidado de la piel.

Antecedentes de la invención

10 La función primaria de la piel es constituir una barrera física y química entre el entorno externo y el entorno interno del cuerpo, protegiendo al último frente a estímulos dañinos tales como traumas, agentes patogénicos o irritantes, a menudo a través de una respuesta inflamatoria. De hecho, puesto que la inflamación ayuda a eliminar células dañadas para evitar un mayor daño al tejido, se considera un mecanismo de protección contra organismos patogénicos y otros agentes dañinos.

15 La intensidad y la duración de la respuesta inflamatoria depende del contexto y del tipo de estímulo; normalmente, las primeras etapas de la respuesta inflamatoria forman parte de la denominada respuesta inmune innata.

20 En la piel, la producción de radicales libres ROS (Especies de Oxígeno Reactivas, del inglés "Reactive Oxygen Species") a nivel cutáneo es un mecanismo fisiológico que forma parte del metabolismo celular normal, tal como la respiración mitocondrial. Además, los radicales libres ROS pueden formarse después de una exposición a estímulos ambientales y posterior reacción del sistema inmune. Los ROS normalmente son neutralizados por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, manteniendo de este modo un equilibrio entre oxidante/antioxidante con la homeostasis de tejidos.

25 Sin embargo, niveles excesivos de ROS debidos a una elevada producción por estímulo o a una insuficiente actividad antioxidante conducen al denominado estrés oxidativo, con efectos perjudiciales a través de la modificación oxidativa y el daño funcional y estructural en biomoléculas, tales como lípidos, proteínas y ADN; o a través de la desregulación de rutas de señalización celular, con la activación de cascadas de señalización descendentes que conducen a una liberación alterada de citocinas, dando como resultado una exacerbación de la inflamación.

30 El estrés oxidativo es una afección fisiológica en la que se produce un desequilibrio entre las concentraciones de especies de oxígeno reactivas (ROS) y antioxidantes. Una acumulación excesiva de ROS conduce, como se dice, a daño celular, que puede dar como resultado el desarrollo de muchas enfermedades graves: cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. En condiciones fisiológicas normales, la generación celular de ROS se compensa por la acción de enzimas antioxidantes celulares y otras moléculas redox. Debido a sus efectos potencialmente dañinos, el exceso de ROS debe ser eliminado rápidamente de las células a través de mecanismos de defensa antioxidantes. Por tanto, los compuestos con propiedades antioxidantes son moléculas hidrofílicas y lipofílicas capaces de metabolizar y eliminar ROS.

35 En la mayoría de los casos, la inflamación cutánea puede considerarse inicialmente un proceso de protección que se desarrolla para limitar el daño procedente de una lesión o infección. Sin embargo, la piel también puede someterse a respuestas inflamatorias excesivas dando como resultado la aparición de inflamación crónica, auto-inflamación y autoinmunidad. La inflamación aguda de la piel se puede desarrollar tras una exposición a dosis elevadas de radiación UV (por ejemplo, en quemaduras solares), por contacto con alérgenos o irritantes químicos. Sin embargo, la inflamación crónica de la piel es resultado de una respuesta inflamatoria demasiado sostenida que eventualmente afecta de forma grave a la salud de la piel.

40 Por ejemplo, en la dermatitis alérgica de contacto la relación entre ROS y el proceso inflamatorio fue descrito por Esser et al., Contact Sensitizers Induces Skin Inflammation via ROS Production and Hyaluronic Acid Degradation, www.plosone.org, volumen 7 / Número 7 / e41340, 2012. Los datos obtenidos identifican un mecanismo indirecto de sensibilización que induce la respuesta innata inflamatoria que implica la degradación de la matriz extracelular ECM debido a una degradación de ácido hialurónico por parte de las ROS.

45 También es sabido que la inflamación cutánea conduce a una alteración de la función básica de la barrera cutánea que, en un círculo vicioso, exagera la propia condición inflamatoria y la producción de ROS. La permeabilidad de una barrera cutánea defectuosa permite la penetración en la piel de alérgenos ambientales, dando como resultado la aparición de respuesta inmunológica y del proceso inflamatorio.

50 En particular, la alteración de la función de barrera es un evento angular en varias alteraciones y enfermedades de la piel, tal como piel sensible, alergias (dermatitis alérgica e irritativa), formas de eczema, dermatitis atópica, soriasis.

Estudios recientes han demostrado que tanto los factores ambientales, tal como la radiación UV, como el estrés psicológico son factores que pueden alterar la homeostasis y la permeabilidad de la piel.

En particular, estudios publicados como el de Altemus et al., Stress-Induced Changes in Skin Barrier Function in Healthy Women, The Journal of Investigative Dermatology, Vol. 117, nº 2, 2001, o el de Denda et al., Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis, American Journal of Physiology, Vol. 278 nº 2, 2000, apoyan el concepto de que el estrés psicológico desempeña un papel determinante tanto en la aparición como en la gravedad de enfermedades cutáneas tales como la soriasis y la dermatitis atópica.

El documento WO 2006/017726A1 describe glicósidos polisulfatados y sales de los mismos, y un método para prevenir o tratar síntomas de enfermedades inflamatorias agudas o crónicas de las vías respiratorias, incluyendo el asma. En él se describe, entre otros, el compuesto 2,4-O-benciliden-D-glucitol.

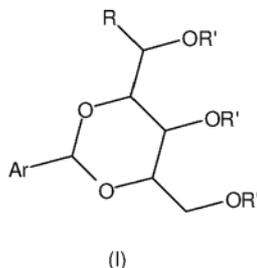
El documento DE 25 26 312 describe cetales cíclicos como anti-inflamatorios en preparaciones cosméticas.

El documento EP0345362, propiedad del mismo solicitante, describe compuestos activos, a saber, 2,4-monofurfuriliden-sorbitol y el tetra-éter relacionado 2,4-monofurfuriliden-1,3,5,6-O-tetra-alquil-sorbitol, que presenta una acción de prevención de la formación de radicales libres endógenos y exógenos, siendo por ello útil en composiciones cosméticas para compensar el envejecimiento cutáneo prematuro debido a la acción de los propios radicales libres. Sin embargo, no se describe ninguna actividad anti-inflamatoria para dichos compuestos, ni se presentan datos experimentales que puedan relacionarse con la función de barrera cutánea o que puedan demostrar otras actividades.

El objetivo de la presente invención es proponer compuestos que presentan actividad antioxidante contra ROS junto con una actividad anti-inflamatoria, en particular capaces de mantener y restaurar la función de barrera de la piel, cuando es comprometida, y que son adecuados para uso farmacéutico dermatológico o para uso cosmético para la salud y el cuidado de la piel.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se ha descubierto ahora que dichas acciones combinadas se obtienen de forma efectiva con un compuesto que tiene la fórmula general (I):



donde R = H, CH₂-OH, CH₂-O-CO-CH₃, CH₂-O-CO-Ph (Ph = fenilo)

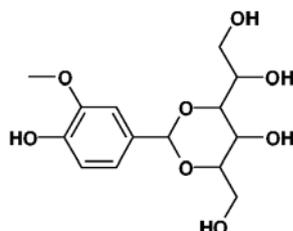
R' = H, CH₂-O-CO-CH₃, CH₂-O-CO-Ph (Ph = fenilo)

Ar = fenilo, 3-metoxi-4-hidroxi fenilo, 2-furilo;

para uso farmacéutico como principio activo en el campo dermatológico cuando se administra tópicamente sobre la piel o el cuero cabelludo para preservar o restaurar la función de barrera cutánea de la piel implicada, junto con una actividad anti-inflamatoria y una actividad antioxidante contra radicales libres.

Los compuestos preferidos para el uso definido anteriormente son sorbitilbenzal y sorbitilvanilinal.

Un compuesto de fórmula (I) según la invención es como se indica a continuación:



Sorbitilvanilinal

La invención también se refiere a una composición farmacéutica para uso como se ha definido en las reivindicaciones 3 o 4.

Una composición de la invención se formula preferiblemente para administración tópica sobre la piel o el cuero cabelludo, y comprende dicho ingrediente activo en una cantidad preferiblemente en el rango de 0,001 a 2,0% p/p con respecto al peso de la composición.

Descripción detallada de la invención

5 A continuación se presentan ejemplos de composiciones adecuadas para uso dermatológico o para uso cosmético para la salud y el cuidado de la piel.

Las cantidades de los componentes, identificados por la nomenclatura INCI, se expresan como porcentajes en peso variables dentro de los rangos descritos.

Ejemplo 1

10 Suero para contrarrestar el envejecimiento de la piel.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Extracto glicólico de vino tinto	1 - 4
Metil gluceth-20	1 - 4
Sepiplus S	0,6 - 2,4
Euxyl PE9010	0,6 - 2,2
Glicerina	0,5 - 2
Oleth-20	0,5 - 2
Caprilil glicol	0,3 - 1,2
Natrlquest E 30	0,2 - 0,7
Oxynex ST Líquido	0,15 - 0,61
Perfume	0,13 - 0,51
Copolímero acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,08 - 0,3
Extracto de semillas de borraja	0,05 - 0,2
Sorbitil vanilinal	0,05 - 0,2
Catequina	0,015 - 0,061
Hialuronato sódico	0,01 - 0,04
Tocotrienol	0,01 - 0,04
Dimetilmetoxi cromanol	0,0005 - 0,002
Quercetina	0,0005 - 0,002
Rutina	0,0005 - 0,002
Soja fermentada	0,0005 - 0,002
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 2

Crema facial anti-envejecimiento anti-manchas SPF50.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Etil hexil metoxicinnamato	5 - 10
Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato	5 - 10
C12-15 Alquil benzoato	4 - 16
Di-n-butyl adipato	4 - 14
Etil hexil salicilato	3 - 5
Octocrileno	3 - 10
Dióxido de titanio (recubierto de sílice)	2 - 8
Abil care XL 80	2 - 7

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina	1 - 4,1
Dietil hexil butamido triazona	1 - 4,1
Propilen glicol	0,6 - 2,4
Steareth-21	0,6 - 2,4
Sílice	0,5 - 2
Fenoxietanol	0,3 - 1
Simdiol 68	0,3 - 1
Copolímero acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,15 - 0,61
Extracto de aceite de caléndula	0,1 - 0,41
Disolución ácido láctico 80%	0,08 - 0,3
Ácido beta-glicirrético 18	0,05 - 0,2
EDTA disódico dihidratado	0,03 - 0,1
Oxynex ST Líquido	0,03 - 0,1
Soja fermentada	0,03 - 0,1
Acetato de vitamina E	0,03 - 0,1
Sorbitil vanilinal	0,02 - 0,08
Hidróxido sódico	0,011 - 0,045
Ácido ferúlico	0,005 - 0,02
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 3

Crema anti-arrugas anti-envejecimiento.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Polímero reticulado C30-45 Alquil cetearil dimeticona	0,7 - 3,6
Ciclopentasiloxano	10 - 35
Polisilicona-11	2 - 8
1,3-Butilen glicol	1,5 - 5,8
Polímero reticulado HDI/trimetilol hexillactona	1,0 - 5,8
Polioxietilen (2) estearil éter	0,7 - 2,9
Copolímero acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,5 - 2,1
Ácido esteárico	0,5 - 1,9
Glicerina	0,5 - 1,9
Inositol	0,5 - 1,9
Steareth-21	0,5 - 1,9
Fenoxietanol	0,4 - 1
Polimetil metacrilato	0,4 - 1,7
Dicaprilil carbonato	0,4 - 1,6
Caprilil glicol	0,3 - 1,2
Extracto de semillas de borraja	0,2 - 1
Perfume	0,2 - 0,7
Dimeticona	0,5 - 5,0
Sílice	0,05 - 1,0
Diazolidinil Urea	0,12 - 0,49

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Avocadol	0,1 - 0,39
Betaína	0,05 - 0,19
Sorbitil benzal	0,05 - 0,19
Pantenol	0,05 - 0,19
Goma Xantana	0,04 - 0,17
Disolvina GL47-S	0,04 - 0,16
Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroxihidrocinnamato	0,02 - 0,1
Hialuronato sódico	0,02 - 0,1
Tocotrienol	0,01 - 0,039
Dimetilmetoxi cromanol	0,005 - 0,019
Rutina	0,0002 - 0,001
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 4 (no de la invención)

Crema BB (Blemish Balm).

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Octocrileno	3 - 12
CI 77891	3 - 10
Etil hexil salicilato	3 - 5
Isododecano	2 - 9
Alcohol cetearílico	2 - 8
Glicerina	2 - 8
C12-13 Alquil lactato	1,5 - 6
Butil metoxidibenzoilmetano	1,3 - 5
Polimetilsilsesquioxano	1,3 - 5
Gliceril estearato	0,8 - 3
Fenoxietanol	0,5 - 1
Etilhexilglicerina	0,5 - 1,9
Dietilhexil siringuildenmalonato	0,5 - 1,9
CI 77492	0,5 - 1,8
Alcohol bencílico	0,4 - 1
Ceteareth-4	0,3 - 1
Cetearyl sulfato sódico	0,3 - 1
CI 77491	0,15 - 0,6
Dihidroacetato sódico	0,15 - 0,4
Goma xantana	0,15 - 0,6
CI 77499	0,1 - 0,4
Galactoarabinano	0,1 - 0,4
Triglicérido caprílico/cáprico	0,05 - 0,2
Ácido dihidroacético	0,05 - 0,2
Extracto de <i>Physalis angulata</i>	0,013 - 0,051
Hialuronato sódico	0,01 - 0,04
Tocoferol	0,0001 - 0,0004

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Sorbitil furfural tetraacetato	0,005 - 0,021
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 5 (no de la invención)

Crema de noche para contrarrestar el envejecimiento de la piel.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Protelan ENS	2 - 10
Fanco VB	2 - 8
Butilen glicol dicaprilato/dicaprato	1,5 - 5,9
Butilen glicol cocoato	0,5 - 2,7
C12-15 Alquil benzoato	1,5 - 5,9
Dimeticona	1,5 - 5,9
Alcohol isoestearílico	0,5 - 2,5
Optiphen	0,7 - 3
Aquaxyl	0,5 - 2
Betaína	0,5 - 2
Alcohol cetearílico	0,5 - 2
Etilcelulosa	0,05 - 0,15
Alcohol cetílico	0,5 - 2
Glicerina	0,5 - 2
Copolímero acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,2 - 1
Extracto de semillas de altramuz blanco	0,2 - 1
Expresión gatulina	0,2 - 1
Insaponificables de aceite de <i>Olea europaea</i>	0,2 - 1
Dihidrato de trehalosa	0,2 - 1
Acetato de vitamina E	0,2 - 1
Polímero reticulado de acrilatos/C10-30 alquil acrilato	0,15 - 0,59
Perfume	0,1 - 0,4
Alcohol diclorobencílico	0,07 - 0,15
Xilitil furfural	0,05 - 0,2
Reforcyl	0,05 - 0,2
Extracto de semilla de <i>Triticum vulgare</i>	0,05 - 0,2
Alantoína	0,02 - 0,1
EDTA disódico dihidratado	0,02 - 0,1
Polisacárido de semilla de <i>Tamarindus indica</i>	0,02 - 0,1
Pantenol	0,01 - 0,04
Aperoxid TLA	0,005 - 0,02
Hialuronato sódico	0,005 - 0,02
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 6 (no de la invención)

Desodorante antitranspirante.

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Disolución de clorhidrato de aluminio al 50%	20 - 80
Alcohol etílico	5 - 19
Propilheptil caprilato	3 - 13
Gliceril estearato	2 - 6
Polisorbato 60	1,1 - 4,3
Sorbitán estearato	0,8 - 3,2
Agua de Hamamelis concentrada	0,04 - 0,17
Xilitil furfural	0,03 - 0,11
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 7

Limpiador para acné cutáneo.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Cocoil glutamato disódico	1 - 4
Decil glucósido	3 - 12
Protelan AG 8 (27%)	3 - 11
Metil cocoil taurato sódico	3 - 11
Oxetal VD 92	2 - 7
Cocoil glutamato sódico	0,1 - 3
Antil 127	0,8 - 3,1
Ácido cítrico	0,6 - 2,3
Fenoxietanol	0,4 - 1,0
Perfume	0,4 - 1,6
Glicéridos de oliva PEG-10	0,3 - 1
Diazolidinil Urea	0,13 - 0,50
Glicirrizinato amónico	0,05 - 0,21
Pantenol	0,05 - 0,21
Zinc PCA	0,05 - 0,21
Ácido octadecatrienoico 50%	0,01 - 0,041
Butil hidroxianisol (BHA)	0,005 - 0,021
Glicirrizato dipotásico	0,005 - 0,021
Sorbitil benzal	0,005 - 0,021
Hidróxido sódico	0,003 - 0,011
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 8 (no de la invención)

Detergente de baño-champú.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Sulfetal LA B-E	8 - 31
Setacin 103 spezial NP	6 - 24
Anfotensid GB 2009 CONC	3 - 12

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Di-PPG-2 Myreth-10 Adipato	15 - 6
Mirustyle MFP PE - LQ - (WD)	1,2 - 4,8
Ésteres PEG-7 de aceite de oliva	0,9 - 3,6
Perfume	0,6 - 2,4
Hidroximetilglicinato sódico	0,5 - 1,9
Antil 127	0,4 - 1,7
Oxetal VD 92	0,4 - 1,7
Ácido cítrico	0,3 - 1,2
Dimeticona PEG-7 Isoestearato	0,3 - 1,2
Cloruro potásico	0,3 - 1,2
Polyquaternium-10	0,2 - 1
Pantenol	0,12 - 0,48
EDTA tetrasódico	0,06 - 0,24
Butil hidroxianisol (BHA)	0,006 - 0,024
Sorbitil furfural tetrabenzoato	0,0012 - 0,0048
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 9

Crema reconfortante para después de exposición solar ("after sun").

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Manteca de karité	3 - 10
Decanoil y octanoil triglicéridos mezclados	3 - 10
Arlatone 2121	2 - 7
Extracto oleaginoso de caléndula	1,5 - 6,1
Glicerina	1,5 - 6,1
Almidón de tapioca	1 - 4
Dimeticona	0,5 - 2
Sorbitil benzal	0,4 - 1,4
Ácido beta-glicirrético 18 Fenoxietanol	0,3 - 1
Symdiol 68	0,3 - 1
Disolución de ácido láctico 80%	0,2 - 0,7
Alantoína	0,15 - 0,61
Betaína	0,15 - 0,61
Inositol	0,15 - 0,61
Perfume	0,15 - 0,61
Xilitol	0,15 - 0,61
Goma xantana	0,14 - 0,57
Cetil hidroxietilcelulosa	0,13 - 0,51
Delta tocoferol concentrado	0,1 - 0,4
Beta sitosterol	0,05 - 0,21
Hidróxido sódico	0,05 - 0,21
EDTA disódico dihidratado	0,05 - 0,2
Taurina	0,05 - 0,2

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Hialuronato sódico	0,03 - 0,1
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 10

Fluido suavizante de primeras arrugas.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
SFE 839	7 - 30
Polisilicona-11	0,5 - 3
Simulgel 600	0,6 - 2,4
Ciclopentasiloxano	7,0 - 31
Polivinil alcohol	0,5 - 2
Fenoxietanol	0,4 - 1,0
Perfume	0,3 - 1,4
Copolímero acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,3 - 1,2
Dimeticona	0,3 - 3
Glicerina	0,2 - 1
Polisorbato 20	0,2 - 1
Avocadol	0,2 - 0,8
Fancol VB	0,2 - 0,8
Manitol	0,2 - 0,8
Extracto de semillas de <i>Moringa Oleifera</i>	0,2 - 0,8
Diazolidinil Urea	0,12 - 0,5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> T12	0,1 - 0,4
Dióxido de titanio recubierto con sílice	0,1 - 0,4
Natrlquest E 30	0,07 - 0,3
Sorbitil vanilinal	0,05 - 0,2
Pululano	0,05 - 0,2
Tocotrienol	0,01 - 0,04
Tetrahidrocurcuminoides	0,005 - 0,02
Ectoína	0,002 - 0,01
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 11

Geles para cuero cabelludo con protección UVA y UVB.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Alcohol etílico desnaturalizado, tipo C	10 - 41
Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato	5 - 10
Etil hexil metoxicinnamato	4 - 10
Ciclopentasiloxano	3 - 10
Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina	1,5 - 6,2
Etil hexil triazona	1,5 - 5

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Óxido de zinc	1,5 - 6,2
Glicerina	1 - 4,1
Octocrileno	1 - 4,1
Cetil fosfato potásico	1 - 4,1
Copolímero acriloldimetiltaurato de amonio/VP	0,8 - 3,1
Sepiplus S	0,8 - 3,1
Betaína	0,3 - 1
Fanco VB	0,3 - 1
Sorbitil vanilinal	0,3 - 1
Stearth-21	0,3 - 1
Acetato de vitamina E	0,15 - 0,62
Goma de deshioxantano	0,05 - 0,19
Disolución de ácido láctico 80%	0,03 - 0,1
Butil hidroxianisol (BHA)	0,03 - 0,1
Hidroxitolueno butilado	0,03 - 0,1
EDTA disódico dihidratado	0,03 - 0,1
Hidróxido sódico	0,03 - 0,1
Ácido ferúlico	0,005 - 0,021
Catequina	0,004 - 0,016
Quercetina	0,001 - 0,0041
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 12

Leche con filtro de protección solar elevada.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato	5 - 10
Etil hexil metoxicinnamato	5 - 10
Butilen glicol cocoato	3 - 12
C12-15 Alquil benzoato	3 - 12
Dicaprilil éter	2 - 10
Octocrileno	2 - 10
Etil hexil salicilato	2 - 5
Dióxido de titanio recubierto de sílice	2 - 8
PEG-30 Dipolihidroxi estearato	2 - 7
Ciclopentasiloxano	1,5 - 5,9
Fomblin HC-P2 1000 disolución al 20%	1,2 - 4,7
Butil metoxidibenzoilmetano	1 - 3,9
Glicerina	0,7 - 2,9
Gliceril behenato/eicosadioato	0,7 - 2,9
Bentone Gel TNV	0,5 - 2
Oxynex ST Líquido sulfato magnésico heptahidratado	0,5 - 2
Hidroximetilglicinato sódico	0,1 - 0,5
Aceite de ricino hidrogenado	0,3 - 1,2

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
PPG-15 Estearil éter	0,2 - 1
Fenoxietanol	0,15 - 0,59
Ácido cítrico	0,1 - 0,39
Perfume	0,1 - 0,39
Ácido beta-glicirrético 18	0,05 - 0,2
EDTA disódico dihidratado	0,02 - 0,1
Sorbitil vanilinal	0,02 - 0,1
Acetato de vitamina E	0,02 - 0,1
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 13 (no de la invención)

Crema protectora específica para pieles sensibles.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
PEG-8 cera de abejas	7 - 26
Decanoil y octanoil triglicéridos mezclados	5 - 18
Isooctadecil isooctadecanoato	4 - 16
Uvinul A plus B	3 - 11
Alcohol etílico desnaturalizado, tipo C	1,5 - 6
Aceite de camomila	1,5 - 6
Manteca de karité	0,8 - 3
Ácido glicirrético de fitosoma	0,5 - 2
Hydroviton	0,5 - 2
Hidroximetilglicinato sódico	0,1 - 0,5
Sorbitil furfural tetrabenzoato	0,4 - 1,4
Ácido beta-glicirrético 18	0,3 - 1
Fenoxietanol	0,3 - 1
Carbómero	0,2 - 0,9
Perfume	0,11 - 0,44
Alfa bisabolol	0,1 - 0,4
Alantoína	0,1 - 0,4
Delta tocoferol concentrado	0,1 - 0,4
EDTA disódico dihidratado	0,08 - 0,3
Hidróxido sódico	0,08 - 0,3
Beta sitosterol	0,05 - 0,21
Ascorbil palmitato	0,0015 - 0,006
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 14 (no de la invención)

Protector solar "mineral" de alta protección.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Óxido de zinc (recubierto de trietoxicaprilsilano)	4 - 20

ES 2 821 910 T3

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Dióxido de titanio (recubierto de ácido esteárico y alúmina)	4 - 20
Triglicérido caprílico/cáprico	4 - 20
Dimeticona	3 - 10
Dicaprilil carbonato	2 - 7
Glicerina	1,5 - 6
Polioxietilen (2) estearil éter	1,5 - 6
Alcohol cetearílico	1 - 4
Copolímero de dilinoleil dímero hidrogenado/dimetilcarbonato	1 - 4
Steareth-21	1 - 4
Ácido polihidroxiesteárico	0,5 - 2,5
Fenoxietanol	0,4 - 1
Goma xantana	0,3 - 1
EDTA disódico dihidratado	0,06 - 0,24
Antileucina 6	0,05 - 0,2
O-Cymen-5-OL	0,05 - 0,2
Dióxido de titanio	0,05 - 0,2
Acetato de vitamina E	0,05 - 0,2
Sorbitil furfural tetraacetato	0,03 - 0,1
Ectoína	0,005 - 0,02
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 15 (no de la invención)

Exfoliante facial.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Decil glucósido	3 - 13
Butilen glicol	2 - 9
Polietileno	2 - 7
Glicerina	1,4 - 5,4
Glicéridos de almendra PEG-60	0,7 - 2,7
Euxyl PE9010	0,5 - 1,1
Poloxamer 188	0,5 - 1,8
Polímero reticulado de acrilatos/alquil acrilato C10-30	0,3 - 1,3
L-Arginina	0,3 - 1,2
Caprilil glicol	0,3 - 1,1
Perfume	0,2 - 0,6
Goma xantana	0,07 - 0,27
Ácido beta-glicirrético 18 0,05	0,05 - 0,18
Xilitil furfural	0,05 - 0,18
EDTA tetrasódico 0,02	0,02 - 0,09
Policuaternio-10	0,02 - 0,09
Acetato de vitamina E	0,02 - 0,09
Agua	según se necesite hasta 100

Ejemplo 16 (no de la invención)

Crema solar de protección media.

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Etil hexil metoxicinnamato	5 - 10
Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato	3 - 10
Decanoil y octanoil triglicéridos mezclados	2 - 8
Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina	0,8 - 3
Fomblin HC-P2 1000 disolución 20%	0,8 - 3
Pantenol	0,7 - 2,7
Bioscontrol synergy BAS	0,6 - 1,1
Aceite de jojoba	0,5 - 2
Butil metoxidibenzoilmetano	0,3 - 1
Acetato de vitamina E	0,3 - 1
PPG-15 Estearil éter	0,15 - 0,61
Polímero reticulado de acrilatos/alquil acrilato C10-30	0,1 - 0,4
Dermofeel PA-3	0,1 - 0,4
Extracto de aceite de caléndula	0,1 - 0,4
Pemulen TR-2	0,1 - 0,4
Perfume	0,08 - 0,3
Hidróxido sódico	0,08 - 0,3
Xilitil furfural	0,05 - 0,2
Acetil Tirosina	0,03 - 0,1
Carnosina	0,03 - 0,1
Ácido beta-glicirrético 18	0,01 - 0,04
Agua	según se necesite hasta 100

Estudios experimentales

- 5 Los siguientes compuestos, sorbitil benzal – sorbitil vanilinal, fueron sometidos a los siguientes ensayos de actividad *in vitro*:
- Ensayo MTT con estrés oxidativo inducido.
 - Ensayo anti-inflamatorio de actividad de TNF- α y LPS.
 - Ensayo de protección de la función de barrera cutánea.
- 10 - Ensayo de capacidad antioxidante de radical hidroxilo HORAC.

Modelos biológicos usados

Queratinocitos humanos cultivados

15 Se usa la línea inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC2544 (Perry V.P. et al, 1957), se cultiva en matraces estériles (25 cm³), se incuba a 37°C en atmósfera húmeda al 5% en CO₂ en medio de cultivo RPMI añadido a suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mm, 1% de aminoácidos no esenciales, en presencia de 1% de penicilina y estreptomycin. Se aplica una división 1: 3 cada 2 días tras alcanzar la monocapa mediante lavado con 1 x PBS (tampón de fosfato sin Ca²⁺ ni Mg²⁺) y desunión de células con disolución de tripsina-EDTA a 37°C durante 2 minutos. Las células se mantuvieron en cultivo en matraces estériles de 25 cm³ y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% en CO₂.

20 **Controles**

Ensayo MTT con estrés oxidativo inducido

Control negativo: células no tratadas en medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix), y mantenidas en placas de cultivo (96 pocillos) de 25 cm² a 37°C y 5% de CO₂ (a oscuras).

5 Control positivo: células tratadas durante 2h con peróxido de hidrógeno 1 mM en medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix), y mantenidas en placas de cultivo (96 pocillos) de 25 cm² a 37°C y 5% de CO₂ (a oscuras).

Estudio de la actividad anti-inflamatoria y de la protección de la función de barrera cutánea

10 Control negativo: células no tratadas en medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix), y mantenidas en placas de cultivo (12 pocillos) de 25 cm² a 37°C y 5% de CO₂.

Control positivo: células en medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix) y 10 µg/mL de LPS (lipopolisacáridos), y mantenidas en placas de cultivo (96 pocillos) de 25 cm² a 37°C y 5% de CO₂ (a oscuras).

Métodos

15 MTT con estrés oxidativo inducido – NCTC 2544

- Principio del método:

20 Estudios llevados a cabo en 2005 por Rajapakse y colaboradores demostraron la capacidad de usar un método altamente utilizado y versátil como el del ensayo MTT para estudiar la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos activos. A través de este método es posible estudiar los efectos protectores de dichos compuestos en las células sometidas entonces a estrés oxidativo. La inducción de estrés oxidativo se lleva a cabo mediante incubación con peróxido de hidrógeno, un agente que induce la producción de daño oxidativo en las células a través de la formación de ROS. Cualquier efecto protector se puede determinar a través de la evaluación de la viabilidad celular después del estrés oxidativo de células pretratadas/pre-expuestas a los compuestos activos a evaluar, en comparación con células sometidas al mismo estrés oxidativo. Una mayor viabilidad celular se corresponderá con un efecto protector de los compuestos evaluados.

- Procedimiento experimental:

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Coda y colaboradores (Coda et al, 2012), con algunos cambios. Se sembraron queratinocitos humanos NCTC2544 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%.

30 A continuación, las células fueron incubadas durante 16 horas con los compuestos activos a evaluar y los respectivos controles a las siguientes concentraciones: 13,5 µM y 27 µM. Se prepararon diluciones a partir de una reserva 1000X en DMSO, se esterilizaron por filtración y usando un medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix).

35 Se usaron células tratadas con H₂O₂ 1 mM como control positivo; como control negativo en su lugar se usaron células mantenidas en medio de cultivo solo (RPMI 2,5% FCS). Después de 16 horas de pretratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas durante 90 minutos con una disolución 1mM de H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en medio libre de suero, a oscuras, a 37°C y con un 5% de CO₂.

40 Tras la etapa de inducción del estrés oxidativo, se evaluó la viabilidad celular de las muestras de los compuestos anteriores de la invención, de acuerdo al método descrito por Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods. 1983 Dec 16; 65(1-2): 55-63.

Los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células de control (ctr) no estresadas, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular / ctr} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs ctr}) * 100$$

Todos los ensayos se llevaron a cabo al menos dos veces por duplicado.

45 Estudio de la actividad anti-inflamatoria – NCTC 2544

- Procedimiento experimental.

Se evaluó la expresión génica del marcador de inflamación TNF-α mediante RT-PCR cuantitativa relativa (reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa cuantitativa – qRT-PCR).

Este ensayo implicó tres etapas secuenciales:

- extracción de ARN total;
- retrotranscripción en ADNc;
- qRT-PCR.

5 Se sembraron queratinocitos humanos NCTC 2544 en placas de 12 pocillos con una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo y se incubaron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%.

A continuación, las células fueron incubadas durante 16 y 24 horas con los compuestos de la invención a evaluar y los respectivos controles a las siguientes concentraciones: 13,5 μ M y 27 μ M, y se mezclaron (en el pocillo) con 10 μ g/mL de LPS.

10 Se prepararon diluciones a partir de una reserva 1000X en DMSO, se esterilizaron por filtración y usando un medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomycin (Pen-Strep Mix). Las células mantenidas solo en medio de cultivo (RPMI 2,5% FBS) se usaron como control negativo.

Como control positivo se usaron células en medio de cultivo solo (RPMI 2,5% FBS) y tratadas solo con 10 μ g/mL de LPS.

15 Tras la incubación, se extrajo el ARN. El ARN total fue extraído de células NCTC 2544 usando el kit comercial RibospinTM (GeneAII Biotechnology Co., LTD).

20 Al final de la incubación con los compuestos activos de la invención, las células fueron lavadas con PBS (1x) y finalmente fueron sometidas a un procedimiento de extracción de ARN. Al final de la extracción, y mediante el uso de un espectrofotómetro (Jenway UV/VIS MOD: 6715, BS-6715B0), se calcularon las concentraciones en μ g/mL de ARN total extraído a una longitud de onda de 260 nm.

Finalmente, se evaluó la integridad del ARN (2 μ g/mL) mediante un análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

25 El ARN total fue convertido en ADNc (ADN complementario), usando una enzima capaz de sintetizar una molécula de ADN usando una cadena de ARN como plantilla; dicha enzima dependiente de ARN de polimerasa de ADN se denomina transcriptasa inversa. Se une al extremo 3' de una cadena individual de ARN y usando cebadores aleatorios y trifosfato de desoxinucleósido (DNTPS) sintetiza la cadena de ADNc. Para ello, se usó un kit comercial "PrimeScriptTM RT Reagent Kit (perfect Real Time)" (TakaraBioInc., Japón), que contenía tampón 5X PrimeScript (para el tiempo real); Mix enzimático 1 PrimeScript RT; OligodTPimer; 6-meros aleatorios; dH₂O libre de ARNasa. El ARN extraído y cuantificado se diluyó hasta una concentración de 2 μ g/mL y se transcribió inversamente en ADNc. Se preparó una Mezcla Maestra de 10 μ L (que contenía tampón 5X PrimeScript (para tiempo real); Mix enzimático 1 PrimeScript RT; OligodTPimer 50 μ M; 6-meros aleatorios 100 μ M), a la que se añadieron 10 μ L de ARN (2 μ g/mL).

30 Las muestras se colocaron en un termociclador (Stratagene Mx3000P Real Time PCR System, Agilent Technologies Italia S.p.A., Milán, Italia) y se sometieron a retrotranscripción en las siguientes condiciones:

37°C durante 15 minutos;

85°C durante 5 segundos;

35 mantener a 4°C.

Al final de la retrotranscripción, las muestras se añadieron a 30 μ L de agua DEPC para obtener una concentración final de ADNc de 40 ng/ μ L.

40 La qRT-PCR es un método de amplificación y cuantificación en tiempo real de productos amplificados, a través de la monitorización de la fluorescencia emitida durante la reacción. Para la amplificación RT-PCR, se usó el método de la sonda TaqMan[®] (Applied Biosystems). Se usó la siguiente sonda TYaqMan: Hs00174128_m1 (TNF- α). Se usó GAPDH: Hs99999905_m1 como gen de control (doméstico). La sonda Taqman es un tipo de sonda que permite el desarrollo de fluorescencia según avanza la amplificación. Se liga un indicador (fluoróforo FAMTM) a su extremo 5' mientras que en el extremo 3' se liga un terminador. La proximidad entre el indicador y el terminador cancela la emisión de señal de fluorescencia. Solo con la 5' actividad esonucleásica 5' de ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) se detecta la fluorescencia y se puede evaluar la acumulación de los productos de amplificación a través del aumento de fluorescencia del indicador, que aumenta con cada ciclo.

Se preparó una Mezcla Maestra para la qRT-PCR como se indica a continuación:

- 10 μ L de "2X Premix Ex Taq";
- 1 μ L de "20x TaqMan Gene Expression Assays" (que contiene 2 cebadores y la sonda fluorescente marcada con fluoróforo FAMTM);
- 0,4 μ L de referencia pasiva Rox II;
- 5 μ L de agua DEPC.

Se añadieron 4 µL de ADNc a la Mezcla Maestra correspondiente al gen diana y 1 µL de ADNc correspondiente al gen doméstico.

La amplificación se llevó a cabo durante 40 rondas con las siguientes condiciones:

- 5
- 95 °C, 30 segundos (Amplificación);
 - 95 °C, 5 segundos (Desnaturalización);
 - 60 °C, 20 segundos (Maduración – extensión);

Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

10 Los datos obtenidos fueron analizados según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y por tanto fue posible calcular los valores relativos de expresión del gen de interés, normalizados respecto al gen doméstico y calibrados en la muestra de control (células no tratadas):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{diana-doméstico (control)}} - \Delta Ct_{\text{diana-doméstico (células tratadas)}}$$

Se calculó el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ suponiendo una eficiencia de amplificación del 100%.

Estudio de la protección de la función de barrera

- Procedimiento experimental.

15 Se evaluó la expresión génica de los marcadores de involucrina (IVL) y filagrina (FLG) mediante RT-PCR cuantitativa (reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa cuantitativa – qRT-PCR).

Este ensayo implicó tres etapas secuenciales:

- 20
- extracción de ARN total;
 - retrotranscripción en ADNc;
 - qRT-PCR.

Se sembraron queratinocitos humanos NCTC2544 en placas de 12 pocillos con una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo y se incubaron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%.

25 A continuación, las células fueron incubadas durante 16 y 24 horas con los compuestos activos a evaluar y los respectivos controles a las siguientes concentraciones: 13,5 y 27 µM, y se mezclaron (en el pocillo) con 10 µg/mL de LPS.

Se prepararon diluciones a partir de una reserva 1000X en DMSO, se esterilizaron por filtración y usando un medio RPMI añadido a 2,5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Pen-Strep Mix). Las células mantenidas solo en medio de cultivo (RPMI 2,5% FBS) se usaron como control negativo.

30 Como control positivo se usaron células en medio de cultivo solo (RPMI 2,5% FBS) y tratadas solo con 10 µg/mL de LPS.

35 Tras la incubación, se extrajo el ARN. El ARN total fue extraído de las células NCTC 2544 usando el kit comercial Ribospin™ (GeneAllBiotechnology Co., LTD). Al final de la incubación con los compuestos activos de interés, las células fueron lavadas con PBS (1x) y finalmente fueron sometidas a un procedimiento de extracción de ARN. Al final de la extracción, y mediante el uso de un espectrofotómetro (Jenway UV/VIS MOD: 6715, BS-6715B0), se calcularon las concentraciones en µg/mL de ARN total extraído a una longitud de onda de 260 nm.

Finalmente, se evaluó la integridad del ARN (2 µg/mL) mediante un análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

40 El ARN total fue convertido en ADNc (ADN complementario), usando una enzima capaz de sintetizar una molécula de ADN usando una cadena de ARN como plantilla; dicha enzima dependiente de ARN de polimerasa de ADN se denomina transcriptasa inversa. Se une al extremo 3' de una cadena individual de ARN y usando cebadores aleatorios y trifosfato de desoxinucleósido (dNTPS) sintetiza la cadena de ADNc. Para ello, se usó un kit comercial "PrimeScript™ RT Reagent Kit (perfect Real Time)" (TakaraBioInc., Japón), que contenía tampón 5X PrimeScript (para el tiempo real); Mix enzimático 1 PrimeScript RT; OligodTPrimer; 6-meros aleatorios; dH2O libre de ARNasa. El ARN extraído y cuantificado se diluyó hasta una concentración de 2 µg/mL y se transcribió inversamente en ADNc. Se preparó una Mezcla Maestra de 10 µL (que contenía tampón 5X PrimeScript (para tiempo real); Mix enzimático 1 PrimeScript RT; OligodTPrimer 50 µM; 6-meros aleatorios 100 µM), a la que se añadieron 10 µL de ARN (2 µg/mL).

Las muestras se colocaron en un termociclador (Stratagene Mx3000P Real Time PCR System, Agilent Technologies Italia S.p.A., Milán, Italia) y se sometieron a retrotranscripción en las siguientes condiciones:

37°C durante 15 minutos;

85°C durante 5 segundos;

mantener a 4°C.

Al final de la retrotranscripción, las muestras se añadieron a 30 µL de agua DEPC para obtener una concentración final de ADNc de 40 ng/µL.

5 La qRT-PCR es un método de amplificación y cuantificación en tiempo real de productos amplificados, a través de la monitorización de la fluorescencia emitida durante la reacción. Para la amplificación RT-PCR, se usó el método de la sonda TaqMan® (Applied Biosystems). Se usó la siguiente sonda T_{YaqMan}: Hs00846307_s1 (IVL) y Hs00863478_g1 (FLG). Se usó GAPDH: Hs99999905_m1 como gen de control (doméstico). La sonda Taqman es un tipo de sonda que permite el desarrollo de fluorescencia según avanza la amplificación. Se liga un indicador (fluoróforo FAMTM) a su extremo 5' mientras que en el extremo 3' se liga un terminador. La proximidad entre el indicador y el terminador cancela la emisión de señal de fluorescencia. Solo con la 5' actividad esonucleásica 5' de ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) se detecta la fluorescencia y se puede evaluar la acumulación de los productos de amplificación a través del aumento de fluorescencia del indicador, que aumenta con cada ciclo.

Se preparó una Mezcla Maestra para la qRT-PCR como se indica a continuación:

- 15
- 10 µL de "2X Premix Ex Taq";
 - 1 µL de "20x TaqMan Gene Expression Assays" (que contiene 2 cebadores y la sonda fluorescente marcada con fluoróforo FAMTM);
 - 0,4 µL de referencia pasiva Rox II;
 - 5 µL de agua DEPC.

20 Se añadieron 4 µL de ADNc a la Mezcla Maestra correspondiente al gen diana y 1 µL de ADNc correspondiente al gen doméstico.

La amplificación se llevó a cabo durante 40 rondas con las siguientes condiciones:

- 25
- 95 °C, 30 segundos (Amplitaqactivation);
 - 95 °C, 5 segundos (Desnaturalización);
 - 60 °C, 20 segundos (Maduración – extensión);

Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Los datos obtenidos fueron analizados según el método de 2-ΔΔCt y por tanto fue posible calcular los valores relativos de expresión del gen de interés, normalizados respecto al gen doméstico y calibrados en la muestra de control (células no tratadas):

30

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{diana-doméstico (control)}} - \Delta Ct_{\text{diana-doméstico (células tratadas)}}$$

Se calculó el 2^{-ΔΔCt} suponiendo una eficiencia de amplificación del 100%.

Ensayo HORAC: capacidad antioxidante de hidroxilo in vitro

- Procedimiento experimental

El kit comercial "ensayo de actividad Oxiselect Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (HORAC)" (Cell Biolabs).

35 En ensayo HORAC expresa la capacidad antirradicalaria del compuesto frente al radical hidroxilo OH· y se basa en la oxidación de una sonda fluorescente con radicales hidroxilo a través de un proceso de transferencia de hidrógeno (HAT). Los radicales hidroxilo se producen mediante un iniciador radicalario hidroxilo y un reactivo de Fenton, que detiene la sonda fluorescente con el tiempo. Los antioxidantes presentes en la muestra bloquean la oxidación por parte del radical hidroxilo de la sonda fluorescente hasta que la actividad antioxidante de la muestra se agota. La capacidad antioxidante de la muestra se relaciona con la curva de decaimiento de fluorescencia, que normalmente se representa como el área bajo la curva (AUC, del inglés "area under the curve"). El AUC se usa para cuantificar la actividad antioxidante total del radical hidroxilo en una muestra y se compara con la curva de un patrón de antioxidante.

Los compuestos de la invención fueron evaluados en las siguientes concentraciones: 13,5 µM; 27 µM, 13,5 mM; 27 mM.

45 Con fines comparativos, también se evaluaron muestras del compuesto monofurfuriliden-2.4-sorbitol, definido a continuación mediante el acrónimo ARGB11, bajo las mismas dos concentraciones, como compuesto de referencia según el documento EP0345362 mencionado anteriormente como antecedente de la técnica de sustancias con actividad de inhibición de radicales libres.

Resultados

Protección celular frente a estrés oxidativo inducido

El porcentaje de protección de varios compuestos a las dos concentraciones evaluadas es el siguiente:

	% de protección	
	13,5 µM	27 µM
Sorbitil benzal	11,673	20,439
Sorbitil vanilinal	11,320	22,766

5 Se destaca de forma general que todos los compuestos evaluados presentan una actividad de protección de las células frente a estrés oxidativo inducido.

Actividad anti-inflamatoria

Los datos obtenidos para los diversos compuestos a las dos concentraciones evaluadas son los siguientes:

	Comparación de TNF-α frente a LPS (%)			
	16h	24h	16h	24h
Control	1,00	1,00	-	-
Control + LPS	3,20	20,36	-	-
Sorbitil benzal 13,5 µM	0,39	0,71	87,93	96,50
Sorbitil benzal 27 µM	0,08	0,01	97,62	99,97
Sorbitil vanilinal 13,5 µM	0,04	0,09	98,64	99,57
Sorbitil vanilinal 27 µM	0,15	0,21	95,44	98,95

10 Los valores obtenidos demuestran que todos los compuestos de la invención presentan actividad anti-inflamatoria, a las diferentes concentraciones y tiempos ensayados.

En particular, son destacables los valores correspondientes al sorbitil vanilinal para la dosis más baja, mientras que a la dosis más alta el sorbitil benzal resulta particularmente significativo.

Efecto sobre la barrera cutánea

15 Los datos obtenidos a este respecto son los siguientes:

	(IVL) 16h	(FLG) 16h
	RQ ± SEM	RQ ± SEM
Control + LPS	1,000 ± 0,284	1,000 ± 0,195
Sorbitil benzal 13,5µM	6,646 ± 1,733	16,971 ± 2,987
Sorbitil vanilinal 13,5µM	18,347 ± 1,664	4,408 ± 2,683

20 Muestran que todos los compuestos de la invención evaluados estimulan enormemente la involucrina (IVL) y la filagrina (FLG), y por tanto son capaces de llevar a cabo una acción de recuperación de la función de barrera cutánea en el caso de alteraciones de la misma, por ejemplo debido a una inflamación, apoyando de este modo la integridad de la misma.

Ensayo HORAC: capacidad antioxidante de hidroxilo *in vitro*

Los datos obtenidos en referencia a las cuatro dosis diferentes, es decir 13.5 µM; 27 µM; 13.5 mM; 27 mM, de cada compuesto evaluado, se recogen en la siguiente tabla:

	HORAC (Capacidad Antioxidante de Radical Hidroxilo) µmol GAE/L			
	13,5 µM	27 µM	13,5 mM	27 mM
ARGB11 (referencia)	31,04	40,110	308,497	408,795

HORAC (Capacidad Antioxidante de Radical Hidroxilo) μmol GAE/L

	13,5 μM	27 μM	13,5 mM	27 mM
Sorbitil benzal	31,04	40,110	308,497	408,795
Sorbitil vanilinal	70,29	115,422	3544,098	3261,945

El ensayo HORAC demostró que todos los compuestos presentan un efecto antioxidante (expresado como μmol equivalentes de ácido gálico/L).

5 En particular, a las concentraciones más bajas de 13,5 μM y 27 μM , el sorbitil vanilinal, compuesto según la invención, presenta una actividad – incluso destacadamente – superior a la de la referencia seleccionada ARGB11, mientras que el sorbitil benzal mantiene una actividad totalmente comparable.

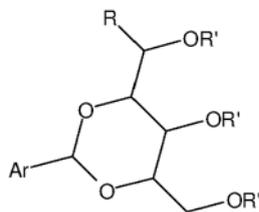
A las dosis más altas (13,5 μM y 27 μM), el compuesto sorbitil vanilinal según la invención presenta una mayor actividad que la referencia seleccionada ARGB11, mientras que el sorbitil benzal mantiene una actividad totalmente comparable.

10 Por tanto, todos los datos experimentales demuestran que todos los compuestos de fórmula (I) según la invención sometidos a los ensayos descritos presentan una fuerte actividad inhibidora de radicales libres, además combinada con unos sorprendentes efectos anti-inflamatorios, una protección de la función de barrera cutánea y una inhibición del estrés oxidativo inducido, lo que los hace adecuados para un uso farmacéutico efectivo y grande en dermatología para afecciones clínicas más amplias, tal como desde piel sensible a dermatitis atópica, o en cosmética para bienestar y la salud de la piel humana, incluyendo el cuero cabelludo, particularmente con el objetivo de prevenir un envejecimiento prematuro de la misma.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula general (I):



(I)

donde R = H, CH₂-OH, CH₂-O-CO-CH₃, CH₂-O-CO-Ph (Ph = fenilo)

5 R' = H, CH₂-O-CO-CH₃, CH₂-O-CO-Ph;

Ar = fenilo, 3-metoxi-4-hidroxi fenilo;

para uso farmacéutico como principio activo en el campo dermatológico cuando se administra tópicamente sobre la piel o el cuero cabelludo para preservar o restaurar la función de barrera cutánea de la piel implicada, junto con una actividad anti-inflamatoria y una actividad antioxidante contra radicales libres.

10 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, que se caracteriza por que es elegido entre sorbitilbenzal y sorbitilvanilinal.

15 3. Una composición farmacéutica para una administración tópica sobre la piel o el cuero cabelludo para el uso en la preservación o la restauración de la función de barrera de la piel implicada, junto con una actividad anti-inflamatoria y una actividad antioxidante contra radicales libres, que comprende como principio activo al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, formulado junto con componentes para administración tópica sobre la piel o el cuero cabelludo.

4. La composición para uso según la reivindicación 3 que se caracteriza por que el compuesto de fórmula (I) se elige entre sorbitilbenzal y sorbitilvanilinal.

20 5. Una composición para uso según la reivindicación 3 que comprende dicho principio activo en una cantidad que oscila entre 0,001 y 2,0% p/p en base al peso de la composición.

6. Un compuesto de fórmula (I) que se caracteriza por que es sorbitilvanilinal:

