



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 908**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7004 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04805348 .2**

96 Fecha de presentación : **29.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1682158**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Composiciones cosméticas que comprenden por lo menos un monómero de ramnosa para el tratamiento cosmético de las pieles.**

30 Prioridad: **31.10.2003 FR 03 12798**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2011

73 Titular/es: **PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE**
45, Place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)

72 Inventor/es: **Houlmont, Jean-Philippe;**
Rico-Lattes, Isabelle;
Pérez, Emile y
Bordat, Pascal

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 366 908 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

Composiciones cosméticas que comprenden por lo menos un monómero de ramnosa para el tratamiento cosmético de las pieles.

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden por lo menos un monómero de ramnosa para el tratamiento cosmético de las pieles y/o de las mucosas sensibles, irritadas, intolerantes, con tendencia alérgica, envejecidas, sometidas a una señal de peligro, que presentan un trastorno de la barrera cutánea, que presentan unas rojeces cutáneas o que presentan un desequilibrio inmunológico no patológico relacionado con el envejecimiento intrínseco, extrínseco u hormonal, para retrasar el envejecimiento natural de la piel y/o para prevenir el envejecimiento acelerado de la piel.

15 La reacción inflamatoria es una respuesta del sistema inmunitario frente a una agresión causada a las células o a los tejidos vascularizados de un organismo por un patógeno tal como los virus, las bacterias o bien frente a una agresión química o física. Frecuentemente dolorosa, la inflamación es generalmente una respuesta de curación. Sin embargo en ciertos casos (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunes, etc.) puede tener consecuencias más graves que el estímulo de origen.

20 Las reacciones de hipersensibilidad de contacto corresponden a unas reacciones de inmunidad específica dirigidas contra unos antígenos localizados sobre unas células o en los tejidos, en el origen de lesiones celulares o de reacciones inflamatorias. Estas reacciones de hipersensibilidad pueden desarrollarse en el marco de los mecanismos de defensa frente a un microorganismo patógeno o en el caso de reacciones alérgicas. Utilizan diferentes tipos de células y en particular las células de la piel, algunos leucocitos, sin olvidar las células endoteliales cuyo papel es preponderante en las reacciones inflamatorias.

25 Las reacciones intercelulares que intervienen entonces implican generalmente unos fenómenos de reconocimientos específicos entre ligandos y receptores. Durante estos últimos veinte años, se han identificado numerosos receptores de superficie celulares, tales como unas proteínas capaces de asegurar un reconocimiento específico con ciertos azúcares tales como la fucosa y la ramnosa.

30 Las lectinas son unas proteínas implantadas en las membranas de las células eucariotas, y desempeñan un papel muy importante en los fenómenos de adhesión y de reconocimiento entre células, en particular durante los procesos inflamatorios. Las lectinas membranarias están implicadas en particular en la endocitosis, el tráfico intracelular de los glicocjugados y la permeabilidad endotelial. Además, estas proteínas, frecuentemente transmembranarias, contribuyen al reconocimiento específico del antígeno (dominio extracelular) y a la activación de las células (dominio intracelular). Las lectinas pueden reconocer específicamente ciertos azúcares, en particular la ramnosa.

35 Desde hace numerosos años, los alquilos polisacáridos (C_mG_n en el que m es el número de carbonos en la cadena alquilo y n el número de unidades glicosídicas que componen la cabeza hidrófila) constituyen una familia interesante de tensioactivos no iónicos. Por ejemplo, los alquilos poliglucósidos (APG) que se preparan industrialmente a partir de glucosa y de alcohol graso, encuentran numerosas aplicaciones en detergencia pero también en cosmetología debido a su buena tolerancia dermatológica.

45 La publicación "cosmetic use formulation containing pentyl rhamnoside and cetyl rhamnoside", J P Houlmont *et al*, International Journal of Cosmetic Science, 2001, 23, 363-368, describe la síntesis y el uso del pentilo y cetilo ramósido como co-tensioactivo y tensioactivo respectivamente, así como su adecuación para la formulación en cosmética. Estos alquilos ramnósidos (de C₅ y C₁₆) se producen directamente mediante acetilación de la L-ramnosa en un alcohol apropiado en presencia de un catalizador ácido. Estos alquilos ramnósidos están descritos como biocompatibles y poco tóxicos.

50 La solicitud de patente EP 0 804 923 describe una composición que comprende un alquiléter polisacárido que comprende por lo menos dos unidades de azúcares diferentes y por lo menos un grupo hidroxilo sustituido con una cadena alquilo saturada de C₁-C₂₄. Esta composición permite proteger la piel frente a las radiaciones ultravioletas.

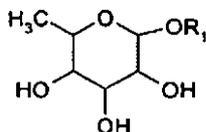
55 La solicitud de patente EP 0 804 924 describe una composición destinada a prolongar la longevidad de un perfume sobre la piel que comprende por lo menos un alquilo de éter polisacárido que comprende por lo menos dos unidades de azúcares diferentes y por lo menos un grupo hidroxilo sustituido con una cadena alquilo de C₁-C₂₄ saturada.

60 La solicitud de patente FR 2 756 735 describe unas composiciones farmacéuticas o cosméticas que comprenden por lo menos un compuesto fucósico o ramnósico, en particular la α -L-fucosa o la α -L-ramnosa. El compuesto puede ser asociado o combinado a un resto lipídico o proteico. El compuesto es un agente de inhibición de la expresión de la proteína de adherencia ICAM-1 por los queratinocitos asociados.

65 La solicitud de patente FR 2 768 623 describe unas composiciones cosméticas y/o dermatológicas de uso tópico para el tratamiento de las pieles grasas que pueden comprender ramnosa (complejo anti-inflamatorio).

La solicitud de patente FR 2 652 742 describe unas composiciones analérgicas cosméticas y dermo-farmacéuticas que pueden comprender la L-ramnosa.

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende por lo menos un monómero de alquil-ramnosa de fórmula I:



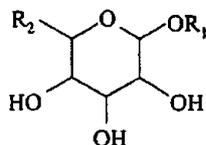
10 en la que R₁ representa un radical alquilo de C₅-C₁₂ para el tratamiento cosmético de las pieles y/o de las mucosas sensibles, irritadas, intolerantes, con tendencia alérgica, envejecidas, sometidas a una señal de peligro, que presentan un trastorno de la barrera cutánea, que presentan unas rojeces cutáneas o que presentan un desequilibrio inmunológico no patológico relacionado con el envejecimiento intrínseco, extrínseco u hormonal.

15 R₁ representa ventajosamente un radical alquilo de C₅-C₈. Según una variante ventajosa de la invención, R₁ representa un radical seleccionado de entre el grupo constituido por el pentilo, el octilo, el decilo y el undecilo.

En el marco de la presente invención, se hablará indiferentemente de monómero de alquil-ramnosa o de alquil-ramnósido. La ramnosa puede ser de configuración levógira o dextrógira. Según una variante ventajosa de la invención, la ramnosa es de configuración levógira.

20 La ramnosa puede estar en forma anomérica α o β. Según otra variante ventajosa de la invención, la ramnosa está en forma anomérica α.

25 En el marco de la presente invención, los monómeros de azúcares reductores de los cuales una función hidroxilo está sustituida por un radical alcoxi se denominan alquil-azúcares reductores. Los alquil-azúcares reductores responden a la fórmula general siguiente:



30 en la que R₂ representa el radical -CH₃ o el radical -CH₂OH y R₁ representa un radical alquilo de C₅-C₁₂.

35 En el sentido de la presente invención, se entiende por "azúcar reductor" un azúcar que presenta, cuando esta en forma lineal, una función aldehído libre soportada por el carbono anomérico. Los azúcares reductores pueden ser demostrados en una disolución con un ensayo con licor de Fehling. Como ejemplo de azúcares reductores, se pueden citar en particular la glucosa, la fructosa, la maltosa, la galactosa y la lactosa.

En el marco de la presente invención, el azúcar reductor es la ramnosa.

40 La ramnosa puede tener una configuración levógira o dextrógira. Según una variante ventajosa de la invención, la ramnosa es de configuración levógira.

La ramnosa puede estar en forma anomérica α o β. Según otra variante ventajosa de la invención, la ramnosa está en forma anomérica α.

45 Según una variante ventajosa de la invención, el radical alcoxi comprende de 5 a 8 átomos de carbono. Así, R₁ representa ventajosamente un radical alquilo de C₅-C₁₂, preferentemente de C₅-C₈. Según una variante ventajosa de la invención, R₁ representa un radical seleccionado de entre el grupo constituido por el pentilo, el octilo, el decilo y el undecilo.

50 La invención se caracteriza porque el azúcar reductor, que contiene un radical alquilo, está únicamente en forma monomérica.

55 Dichos monómeros de alquil-ramnosa según la invención pueden ser sintetizados en una sola etapa de reacción, sin ninguna etapa de protección o de desprotección de las funciones hidroxilos del azúcar reductor, mediante reacción de condensación de la ramnosa, con un alcohol, que tiene un número de átomos que corresponde a la longitud de la

cadena alquilo. El procedimiento de síntesis utilizado es una reacción de tipo reacción de Fisher con el ácido *p*-toluensulfónico (APTS) como catalizador ácido. Se lleva a cabo de manera "one-pot", los agentes reactivos (azúcar reductor: en particular ramnosa, alcohol y catalizador ácido) se ponen en presencia unos con otros sin utilizar ningún disolvente, y el medio está entonces en forma heterogénea.

5 La mezcla de ramnosa alcohol y catalizador ácido se pone ventajosamente a reaccionar con calentamiento y eventualmente bajo agitación a una temperatura comprendida entre 20 y 120°C, todavía más ventajosamente entre 35 y 75°C. La temperatura no debe ser demasiado elevada, en particular no debe superar los 120°C, con el fin de evitar una degradación de los azúcares. La mezcla se mezcla ventajosamente durante 5 minutos a 24 horas, todavía más ventajosamente durante 3 horas. Siendo la función anomérica la más reactiva, gracias a la estabilización de la carbocación por resonancia, la adición del alcohol se lleva a cabo únicamente en la posición 1.

15 El alcohol, en exceso, en una relación molar aproximadamente doble con relación a la ramnosa, sirve de disolvente al producto de síntesis, el medio de reacción se encuentra entonces en fase homogénea al final de la reacción. Se selecciona como catalizador ácido un ácido de Brønsted relativamente fuerte, pero soluble en un medio orgánico, tal como el APTS. El ácido sulfúrico demasiado potente y el ácido clorhídrico no han podido ser utilizados por lo tanto puesto que son solubles en agua mientras que los ácidos carboxílicos no eran lo suficientemente fuertes. Se debe evitar trabajar en presencia de agua, puesto que favorecería aún más la reacción inversa de hidrólisis más que la reacción de adición.

20 La auto-condensación de los monómeros de azúcares reductores, en particular de alquil-ramnosa, de alquil-fucosa o de alquil-glucosa, está limitada, incluso está suprimida, a pesar de que cada función hidroxilo, desde un punto de vista teórico, puede reaccionar incluso con otra para crear un enlace glicosídico y por lo tanto aumentar el grado de polimerización, debido a la ausencia de agentes protectores. Se supone que esta auto-condensación está suprimida debido a que los 6-desoxi-azúcares (ramnosa, fucosa en particular) están desprovistos de función hidroxilo primaria y poseen un grupo metilo en su lugar. El grupo metilo de los 6-desoxi azúcares favorecería la formación de alquil-monosacáridos suprimiendo una función hidroxilo muy reactiva soportada por el carbono 6 y añadiendo un gen estérico en la proximidad del carbono 4. Esta síntesis conduce para el conjunto de los alquil-azúcares reductores al anómero α , configuración en la que el gen estérico está minimizado y por lo tanto la más estable termodinámicamente. En particular, esta síntesis conduce, para la mayoría de los alquil-ramnósidos al anómero α . La relación anomérica α/β para los alquil-fucósidos es próxima a 2.

35 Según una variante ventajosa de la invención, el agua formada durante la reacción de condensación se elimina, física o químicamente. Como ejemplo de técnica de eliminación física del agua formada durante la síntesis, se puede citar en particular la destilación o la utilización de un adsorbente. Como ejemplo de técnica de eliminación química del agua formada durante la síntesis, se puede citar en particular la utilización de un agente de desecación.

40 El agua formada durante la reacción de condensación se elimina ventajosamente por medio de un agente de desecación seleccionado de entre el grupo constituido por los carbonatos, los sulfatos, el cloruro de calcio, el pentaóxido de fósforo, unos tamices moleculares o unas combinaciones de estos diversos agentes de desecación. El agente de desecación puede ser introducido directamente en el medio de reacción.

45 Según una variante de la invención, la reacción de condensación se realiza a presión atmosférica y bajo atmósfera de un gas inerte, tal como el argón o el nitrógeno.

Según otra variante de la invención, la reacción de condensación se realiza a presión reducida.

50 Según una variante ventajosa de la invención, al final de la reacción de condensación, la mezcla se lleva a una temperatura más baja, de algunos grados bajo la temperatura de reacción a 0°C, preferentemente a temperatura ambiente, y se recoge en un disolvente capaz de solubilizar el monómero de alquil-ramnosa, siendo dicho disolvente ventajosamente el diclorometano. El catalizador ácido se neutraliza con la ayuda de una base débil, preferentemente el hidrogenocarbonato, durante un periodo comprendido entre 1 minuto y 24 horas, ventajosamente durante 30 minutos.

55 Según las diferentes longitudes de cadena, los productos son purificados, o bien mediante cromatografía sobre columna para las cadenas más cortas, o bien mediante soxhlet para los demás compuestos. Los dos procedimientos se pueden combinar si se busca una pureza muy grande.

60 El principio de la purificación por soxhlet consiste en mezclar el bruto de la reacción (alquil-ramnósido, alcohol residual, APTS, ramnosa) con sílice para cromatografía en unas relaciones másicas próximas a 1:4, y poner esta mezcla en un cartucho de extracción: acoplamiento de un procedimiento de extracción sólido-líquido en caliente con un procedimiento de cromatografía en continuo.

65 El rendimiento másico de este procedimiento de síntesis de monómeros de alquil-ramnosa es superior a 40%.

La composición según la invención está destinada ventajosamente a regular los mecanismos inflamatorios.

- La composición está destinada en particular a la prevención o al tratamiento de las reacciones o patologías alérgicas inflamatorias, inmunitarias de la piel y/o de las mucosas. La composición según la invención está destinada asimismo a inhibir la respuesta inmune relacionada con el estrés inflamatorio.
- 5 La composición según la invención está destinada en particular a inhibir la activación de los leucocitos, tales como los polinucleares humanos y en particular los neutrófilos y los mastocitos humanos impidiendo la liberación de los mediadores preformados de la reacción inmunitaria. Permite asimismo la inhibición de la adhesión de los linfocitos circulantes y de las células endoteliales impidiendo así la transmigración de estos leucocitos en el lugar de la inflamación. Permite asimismo la inhibición de la secreción de las citoquinas queratinocitarias, activadoras de los linfocitos T y de las células de Langerhans, tales como IL-1, TNF- α , o unas moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, VCAM, que contribuyen al reclutamiento y al paso trans-endotelial de los leucocitos. La composición según la invención es asimismo inhibidora del fenómeno de hiperplasia queratinocitaria.
- 10
- 15 La composición según la invención es asimismo inhibidora del proceso de apresto del antígeno por las células dendríticas de la piel, de la maduración de las células presentadoras de antígeno, a saber las células dendríticas dérmicas y las células de Langerhans, del fenómeno de reconocimiento entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno.
- 20 Así, la composición según la invención está destinada a la prevención o al tratamiento de las enfermedades seleccionadas de entre el grupo constituido por eczema atópico y/o de contacto, dermatosis inflamatorias, dermatitis irritantes, acné, enfermedades autoinmunes tales como la psoriasis, foto-inmuno-supresión, vitíligo, pitiriasis, esclerodermias, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o rechazo de injerto.
- 25 La composición según la invención está destinada asimismo a la prevención y al tratamiento de los derivados inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento y con sus consecuencias. La composición está destinada en particular a la prevención o al tratamiento de las enfermedades seleccionadas de entre el grupo constituido por las sensibilizaciones anafilácticas, las anomalías pigmentarias de la piel, la hipervascularización dérmica, y las fisuras inflamatorias.
- 30 Según una variante de la invención, la composición está destinada a disminuir el carácter alérgico y/o irritante de una composición o de un perfume. La composición según la invención comprende ventajosamente 0,001 a 50% en peso de alquil-azúcares reductores.
- 35 La composición según la presente invención se puede formular para ser administrada por cualquier vía. Se formula ventajosamente para ser administrada por vía tópica, oral, subcutánea, inyectable, rectal y genital.
- 40 Cuando la composición está formulada para ser administrada por vía oral, dicha composición se puede presentar en forma de una disolución acuosa, emulsión, comprimidos, cápsulas blandas, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o también de suspensiones orales.
- 45 Cuando la composición está formulada para ser administrada por vía subcutánea, dicha composición se puede presentar en forma de ampollas inyectables estériles.
- 50 Cuando la composición está formulada para ser administrada por vía rectal, dicha composición se puede presentar en forma de supositorios.
- 55 Cuando la composición está formulada para ser administrada por vía genital, dicha composición se puede presentar en forma de óvulos.
- 60 Dicha composición según la invención es preferentemente de aplicación tópica. Dicha composición puede entonces ser formulada de manera que se presente, por ejemplo, en forma de disolución acuosa, de crema blanca o coloreada, de pomada, de leche, de loción, de gel, de ungüento, de suero, de pasta, de espuma, de aerosol o de barra.
- 65 La cantidad de la composición según la invención a administrar depende de la gravedad y de la antigüedad de la afección tratada. Naturalmente, el médico adaptará asimismo la posología en función del enfermo.
- La presente invención se refiere asimismo a una composición que comprende por lo menos un monómero de ramnosa, cuya función hidroxilo anomérica está sustituida por un radical alcoxi de C₅-C₁₂ para retrasar el envejecimiento natural de la piel y/o para prevenir el envejecimiento acelerado de la piel sometida a las agresiones exteriores, en particular para prevenir el envejecimiento fotoinducido de la piel.
- La composición cosmética aplicada en el procedimiento de tratamiento cosmético según la invención comprende ventajosamente 0,001 a 50% en peso de ramnosa.

La ramnosa puede ser de configuración levógira o dextrógira. Según una variante ventajosa de la invención, la ramnosa es de configuración levógira.

5 La ramnosa puede estar en forma anomérica α o β . Según otra variante ventajosa de la invención, la ramnosa está en forma anomérica α .

Según una variante ventajosa de la invención, el radical alcoxi comprende de 5 a 8 átomos de carbono. Según una variante ventajosa de la invención, R_1 representa un radical seleccionado de entre el grupo constituido por el pentilo, el octilo, el decilo y el undecilo.

10 En el marco de la invención, los alquil-azúcares reductores se pueden preparar según el procedimiento descrito anteriormente o mediante cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la materia. Cuando la composición cosmética está formulada para ser administrada por vía tópica, dicha composición se presenta, por ejemplo, en forma de disolución acuosa, de crema blanca o coloreada, de pomada, de leche, de loción, de gel, de ungüento, de suero, de pasta, de espuma, de aerosol, de champú o de barra.

15 Otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción con los ejemplos representados a continuación. En estos ejemplos se hará referencia a las figuras siguientes. Estas figuras y ejemplos están destinados a ilustrar la presente invención y no pueden en ningún caso ser interpretados como limitativos de su alcance.

20 Figura 1: Viabilidad de las células endoteliales procedentes de los ganglios linfáticos periféricos en presencia de ramnosa.

25 Figura 2: Viabilidad de las células endoteliales procedentes de los ganglios linfáticos periféricos en presencia de pentilo-ramnósido.

Ejemplo 1: Procedimiento de síntesis del dodecil-ramnósido

30 En un matraz de 2 vías de 100 ml, coronado por un refrigerante recto equipado a su vez con una protección desecante (CaCl_2), se introducen con barrido de argón, 2 g de ramnosa (1 equivalente) y el alcohol graso (dodecil alcohol) a razón de 2 equivalentes molares (4,6 g). El catalizador ácido *p*-toluensulfónico (APTS) se añade a la mezcla heterogénea anterior mantenida bajo argón a razón de 0,1 equivalente molar. El medio se agita (agitador magnético) a 70°C durante 3 horas.

35 Después de la reacción, el medio homogeneizado, se enfría a temperatura ambiente. Se añade una disolución de diclorometano (20 ml) y una punta de espátula de NaHCO_3 a la mezcla dejada bajo agitación y mantenida bajo argón. El medio se deja así durante 30 minutos.

40 La disolución se filtra a continuación sobre papel. El filtrado (P2) que contiene los alquil-ramnósidos se evapora y se concentra en un aceite viscoso.

45 Se recuperan así 1,9 g de P2 después de la filtración, y un rendimiento de 48% después de una etapa de purificación sobre "batch" de sílice. La naturaleza de los alquil-ramnósidos se determina mediante RMN, HPLC y espectrometría de masas.

La espectrometría de masas se realiza mediante electropulverización. Estos análisis hacen aparecer un grado de polimerización máximo de 2 para la cabeza polar.

50 Los análisis RMN a 250 MHz se llevan a cabo en el CDCl_3 o D_2O en un aparato multinúcleos Brücker AC 250 que funciona a 250, 13 MHz para ^1H .

55 Los análisis cromatográficos se realizan en fase inversa sobre una columna injertada C18 (YMC-pack C18, 12 mm diámetro de poro medio, 5 μm de diámetro de las partículas) y una columna LiChrospher 100 RP-8 (125*4 mm I.D.). El eluyente seleccionado es una mezcla acetonitrilo-agua (40-60), con un caudal de 1,5 ml/min. a 45°C. El detector es un detector de difusión de luz Sedex 45.

Estos análisis permiten identificar el alquil-ramnósido presente en P2 que es el dodecil-ramnósido.

60 El pentil-ramnósido, el octil-ramnósido, el decil-ramnósido y el undecil-ramnósido pueden ser sintetizados según el mismo procedimiento sustituyendo respectivamente el dodecilalcohol por el pentilalcohol, el octilalcohol, el decilalcohol y el undecilalcohol.

Ejemplo 2: reactividad de los azúcares frente al alcohol

65 En el caso de los alcoholes lineales de cadena corta, la reactividad de los diferentes azúcares frente al alcohol es

buena. En efecto, si se consideran dos familias de compuestos, los alquil-ramnósidos y los alquil-glucósidos, los resultados obtenidos para los pentil-sacáridos son comparables. El alcohol, poco hidrófobo, asegura un buen contacto mediante una buena humectabilidad del azúcar y la reactividad está por lo tanto incrementada. Los rendimientos obtenidos para los alcoholes de cadena más corta son siempre superiores a 50%.

En el caso particular de los alcoholes cuya longitud de cadena es superior a 8 carbonos, los rendimientos de los alquil-glucósidos decrecen muy rápidamente cuando la longitud de la cadena hidrocarbonada aumenta. El alcohol se vuelve en efecto demasiado hidrófobo y el contacto con la glucosa muy hidrófila está cada vez peor asegurada.

Esta bajada de reactividad es bastante menos importante en el caso de la ramnosa (véase la tabla 1). Los rendimientos para los alquil-ramnósidos son aproximadamente 8 veces superiores a los de los alquil-glucósidos para la cadena de C₁₂ y también casi 6 veces para la cadena de C₁₆.

Tabla 1: Rendimientos máxicos obtenidos después de la purificación de alquil-glucósidos y de β-alquil-ramnósidos

Rh-C ₅	50%	Glu-C ₅	65%
Rh-C ₁₂	47%	Glu-C ₁₂	6%
Rh-C ₁₆	27%	Glu-C ₁₆	5%

En la tabla 1, la abreviatura Rh representa la ramnosa y la abreviatura Glu representa la glucosa. Así, por ejemplo, Rh-C₅ representa el pentil-ramnósido.

Una de las razones propuestas para explicar esta reactividad es una mayor hidrofobia de los desoxi-azúcares. En efecto, la supresión del hidroxilo en la posición 6 y la presencia del grupo metilo permiten aumentar la hidrofobia del azúcar.

La presencia del grupo metilo en el quinto carbono permite asimismo aumentar la densidad electrónica del oxígeno mediante un efecto inductivo positivo y estabilizar así el intermedio que interviene en el mecanismo de reacción. La ramnosa es por lo tanto más reactiva que las hexosas frente a los alcoholes grasos.

Ejemplo 3: Aspecto físico de los alquil-ramnósidos en función de la longitud de cadena del radical alquilo.

Los alquil-ramnósidos que tienen unas cadenas de C₅, C₆, C₈, C₁₀, C₁₁ y oleilo están en forma de un líquido viscoso.

Los alquil-ramnósidos que tienen unas cadenas lineales de C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₂ están en forma sólida.

El alquil-ramnósido que tiene una cadena lineal de C₁₂ es un gel muy compacto.

Ejemplo 4: análisis farmacológico de los alquil-ramnósidos

Se han estudiado las diferentes células de la inmunidad que intervienen en estos procesos de la inflamación. Son las células dendríticas de la piel, las células endoteliales, algunos leucocitos y los queratinocitos.

1) Principios de las técnicas de medición de la viabilidad celular

♣ *técnica de reducción del MTT, bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio] (comercializado por Sigma)*

Esta técnica corresponde a un ensayo colorimétrico que permite la cuantificación de las células vivas, metabólicamente activas de manera no radioactiva. El MTT es una molécula catiónica que se fija a las membranas de las mitocondrias de manera potencial-dependiente. A nivel de la mitocondrias, el MTT se reducirá en azul de formazán mediante la deshidrogenasa mitocondrial. Las células vivas se colorean por lo tanto en azul, a la inversa de las células muertas que permanecen transparentes. La medición de la viabilidad se lleva a cabo a continuación mediante la medición de la densidad óptica con la ayuda de un lector automático.

Sin embargo, este procedimiento de análisis parece estar mejor adaptado a las células adherentes (tipo queratinocitos) que para las células no adherentes (monocitos y células dendríticas). Por lo tanto, se ha previsto otro estudio para concluir sobre la citotoxicidad de los oligoramnósidos frente a las células diferenciadas analizadas: la citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio.

♣ *técnica de reducción de la sal de tetrazolio XTT.*

Se trata de una técnica que permite una cuantificación de la proliferación celular y del número de células vivas, (metabólicamente activas) sin incorporación de isótopos radioactivos. El XTT, de color amarillo, es una molécula catiónica que se fija a las membranas de las mitocondrias de manera potencial-dependiente, tal como lo hace el

MTT.

A nivel de las mitocondrias, el XTT se reduce en formazán (naranja) mediante la tetrazolio reductasa mitocondrial. Este procedimiento, más costoso que el procedimiento del MTT, no necesita en su protocolo la lisis de las células por el SDS para liberar el colorante. En efecto, el producto de reducción es soluble en el seno de la célula. El procedimiento es así más rápido. Las células vivas, en ausencia y en presencia de un tratamiento con un producto se colorean, a la inversa de las células muertas que permanecen incoloras. El porcentaje de formazán producido se detecta con espectrofotómetro para una longitud de onda de 450 nm y es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

2) ensayos de toxicidad

♣ Unos queratinocitos son aislados y cultivados a partir de biopsia de piel humana procedente de donantes anónimos tras una intervención de cirugía plástica. Se hace una media de las mediciones de densidad óptica (absorbancia) de los 4 pocillos tratados con la misma concentración de productos. Esta media se compara con la media de las mediciones obtenidas para los 4 pocillos de control (test t de Student -comparación de las medias-diferencia significativa a 95% si $p < 0,05$ y a 99% si $p < 0,01$).

Las viabilidades de las células tratadas se expresan en porcentaje con relación al control (células no tratadas) de 100% (DO tratado/DO control x 100).

La ramnosa no presenta ninguna citotoxicidad (véase la tabla 2), incluso para las concentraciones más elevadas.

Tabla 2: Viabilidad de los queratinocitos en presencia de diferentes concentraciones en ramnosa.

	Control	Ramnosa 1 mg/ml	Ramnosa 0,1 mg/ml	Ramnosa 0,01 mg/ml	Ramnosa 0,001 mg/ml
% de viabilidad	100	104	98	100	95
p (Student)		0,504	0,679	0,991	0,407

El pentil-ramnósido presenta una citotoxicidad para unas concentraciones superiores a 2 mg/ml (véase la tabla 3). Esta toxicidad no se puede explicar por un efecto deslipidante del alquilramnósido debido a que a una concentración claramente superior, próxima a 70 g/l, no se ha demostrado ningún efecto de detergencia durante los estudios en las vesículas multilamelares de fosfatidilcolina.

Tabla 3: Viabilidad de los queratinocitos en presencia de diferentes concentraciones en pentil-ramnósido (RhC₅).

	Control	Rh-C ₅ 5 mg/ml	Rh-C ₅ 2 mg/ml	Rh-C ₅ 1 mg/ml	Rh-C ₅ 0,1 mg/ml
% de viabilidad	100	40	53	74	94
p (Student)		<0,01	<0,01	<0,01	0,145

Unos ensayos de toxicidad han sido efectuados asimismo con la undecil-ramnosa y la octadecil-ramnosa. Los resultados se proporcionan en la tabla 4 siguiente:

Tabla 4: Viabilidad de los queratinocitos en presencia de diferentes concentraciones de alquilo de C₁₁ y C₁₈ ramnósidos.

	Control	Rh-C ₁₁ 500 µg/ml	Rh-C ₁₁ 250 µg/ml	Rh-C ₁₁ 100 µg/ml	Rh-C ₁₁ 10 µg/ml
% de viabilidad	100	30	11	17	81
p (Student)		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Control	Rh-C ₁₈ 500 µg/ml	Rh-C ₁₈ 250 µg/ml	Rh-C ₁₈ 100 µg/ml	Rh-C ₁₈ 10 µg/ml
% de viabilidad	100	27	25	87	137
p (Student)		<0,01	<0,01	<0,05	<0,01

♣ Unas células endoteliales han sido cultivadas, inmortalizadas y estabilizadas en su fenotipo. Las líneas celulares estudiadas son las células endoteliales de apéndice, las células endoteliales microvasculares de cerebro, las células endoteliales de ganglios linfáticos mesentéricos, las células endoteliales de ganglios linfáticos periféricos, y las células endoteliales microvasculares de la piel.

El ensayo de citotoxicidad se lleva a cabo por medio de un ensayo bioquímico sobre la transformación de una sal de tetrazolio, el MTT.

Los resultados obtenidos son muy positivos, no se demuestra ninguna toxicidad, con el pentil-ramnósido (véanse las figuras 1 y 2). La viabilidad es en efecto siempre superior a 85%, para todas las líneas de células estudiadas.

Figura 1: Viabilidad de las células endoteliales procedentes de los ganglios linfáticos periféricos en presencia de ramnosa.

Figura 2: Viabilidad de las células endoteliales procedentes de los ganglios linfáticos periféricos en presencia de pentil-ramnósido.

Se observa en particular la aparición de un pico de estimulación que corresponde a 4 horas de incubación, tiempo necesario para el inicio de la síntesis proteica. La presencia de este pico es interesante debido a que traduce que las células toleran los oligoramnósidos (ausencia de toxicidad), y los asimilan. Estos productos parecen enriquecer el medio de cultivo.

Estos resultados son similares para las demás líneas de células endoteliales.

3) Influencia de los alquil-ramnósidos sobre unas células humanas cultivadas en medio pro-inflamatorio

* Dosificación de la PGE₂ liberada por los KHN estimulados por el PMA.

Los alquil-ramnósidos han podido ser evaluados como inhibidores de la liberación de PGE₂ en los sobrenadantes celulares. Estos productos son puestos en presencia de los KHN al mismo tiempo que el PMA a 1 ng/ml. Cada condición ensayada se evalúa sobre 4 pocillos de KHN para la estimulación.

Las abreviaturas KHN significan queratinocitos humanos normales.

Las abreviaturas PMA significan forbol-12-miristato-13-acetato.

Después de 24 horas de tratamiento, los resultados resumidos en la tabla 5 siguiente representan las medias de los valores de las concentraciones en PGE₂ (pg/ml) dadas en cada uno de los sobrenadantes celulares estimulados o no e indicadas en una cantidad de células expresadas en µg.

Tabla 5: Porcentaje de inhibición de la liberación de PGE₂ en función de la concentración de los alquil-ramnósidos (Rh-C₅, Rh-C₁₁ y Rh-C₁₈).

	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,02 mg/ml	0,01 mg/ml
Rh-C ₅	89%	84% 63%	64%	61%	29%	-
Rh-C ₁₁					28%	28%
Rh-C ₁₈					2%	

El pentil-ramnósido presenta una inhibición más fuerte (80 a 60%) para unas concentraciones de 1 mg/ml a 0,05 mg/ml. Su actividad disminuye a 0,02 mg/ml: 29% de inhibición.

El pentil-ramnósido presenta una fuerte inhibición, de 60 a 80%, para unas concentraciones comprendidas entre 1 mg/ml y 50 mg/ml.

El undecil-ramnósido presenta una actividad comparable al pentil-ramnósido en la gama de 20 µg/ml, lo cual le confiere una actividad inflamatoria comparable.

4) Adhesión entre células endoteliales y linfocitos

Se ha evaluado la influencia de los alquil-ramnósidos sobre la adhesión entre linfocitos y células endoteliales no activadas, en particular la línea de células endoteliales procedentes de la piel (HskMEC). Estas células han sido puestas en presencia de un fuerte activador, el TNF-α.

La adhesión se realiza *in vitro* en condición estática. Las células endoteliales son inoculadas en unos pocillos con el fin de obtener una monocapa. Las células son pre-tratadas durante 5 horas en presencia o en ausencia de alquil-ramnósidos. Como el dodecil-ramnósido necesita un contenido de 0,1% en volumen para ser soluble en los medios de cultivo, se analizará asimismo un control que contiene 0,1% de glicerol. En efecto, el glicerol al 0,1% estimula la adhesión de los linfocitos sobre HskMEC (31%) mientras que no hay efecto sobre las demás líneas de células endoteliales.

La suspensión de linfocitos marcados está a una concentración que permite obtener una relación de 5 linfocitos para una célula endotelial. La adhesión se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente. El marcador se fija irreversiblemente a los lípidos de la membrana plásmica de las células sin afectar a las propiedades biológicas de la membrana, ni a la viabilidad celular.

La adhesión de los linfocitos sobre las células endoteliales se cuantifica mediante citometría de flujo.

5 Los primeros ensayos de adhesión sobre las líneas de células endoteliales no activadas han dado los resultados siguientes. El pentil-ramnósido 1,1 mM induce un aumento de la adhesión de los linfocitos sobre HPLNEC.B3 (37,9%) y un aumento muy fuerte de la adhesión sobre HMLNEC con relación a la ramnosa (96,7%). Tiene un efecto inhibitor de la adhesión de los linfocitos sobre HSkMEC de 37,3% con respecto a la ramnosa. No tiene o tiene muy poco efecto sobre HAPEC y HBrMEC.

10 El dodecil-ramnósido a 1,5 μ M disminuye la adhesión de los linfocitos sobre HSkMEC un 34,2%. Aumenta esta adhesión sobre HAPEC un 44,1% y no tiene efecto sobre HBrMEC, HPLNEC.B3 y HMLNEC.

Los resultados de la adhesión entre linfocitos y las células endoteliales activadas, resumidos en la tabla siguiente (véase la tabla 5) proceden del agrupamiento de tres experimentos de adhesión.

15 Tabla 5: Resultados de la adhesión entre linfocito y células endoteliales (HSkMEC) en presencia de los derivados ramnosilados.

	Medio	TNF	Relación control/TNF
Control	1,000	2,730	2,7
Ramnosa	1,630	2,450	1,5
Pentil-ramnosa	1,900	3,100	1,6
Control glicerol	2,200	3,200	1,45
Dodecil-ramnosa	3,200	1,900	0,59

20 El efecto del dodecil-ramnósido a 1,5 μ M se confirma sobre las células endoteliales con una inhibición de la adhesión de 63%.

Ejemplo 5: Evaluación del potencial irritante cutáneo sobre epidermis reconstituidas del pentil-ramnósido

25 La evaluación del potencial irritante cutáneo sobre epidermis reconstituida es un procedimiento alternativo al experimento animal para la evaluación del potencial irritante cutáneo sobre la epidermis reconstituida. El principio se basa en la evaluación del potencial irritante del producto ensayado por:

- Estudio de la citotoxicidad mediante cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y mediante reducción del MTT en sal de tetrazolio
- Estudio de los marcadores de la inflamación mediante cuantificación de la liberación de las interleucinas IL1 α e IL8.

35 Los resultados se resumen en la tabla siguiente (véase la tabla 6)

Tabla 6: Resultados de la evaluación del potencial irritante cutáneo sobre epidermis reconstituidas del pentil-ramnósido

		Rh-C ₅ concentración 30%	Triton 4%
24 horas de aplicación	MTT % de viabilidad	89,9	3,0
	Relación LDH	1,4	124,7 l
	Relación IL _{1α}	2,4	36,0
	Relación IL ₈	5,2	3,7
72 horas de aplicación	MTT % de viabilidad	82,1	1,5
	Relación LDH	1,0	77,3
	Relación IL _{1α}	2,0	7,2
	Relación IL ₈	4,0	0,9
Clasificación		Ligeramente irritante	Irritante

40 Los resultados muestran que el pentil-ramnósido a una concentración de 30%, es poco irritante.

Ejemplo 6: Estudio del poder sensibilizante por el procedimiento LLNA del pentil-ramnósido.

45 Las abreviaturas LLNA significan Local lymph Node Assay, que es un procedimiento alternativo al experimento sobre cobaya del poder sensibilizante.

Este ensayo determina el potencial sensibilizante de la sustancia de ensayo midiendo la proliferación de los linfocitos en los ganglios linfáticos auriculares. La proliferación de los linfocitos se medirá determinando la incorporación de metiltimidina tritiada.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente (véase la tabla 7).

Tabla 7: Resultados del estudio del poder sensibilizante mediante el procedimiento LLNA del pentil-ramnósido

5

Concentraciones estudiadas	Disolvente	Concentración 1: 3%	Concentración 2: 15%	Concentración 3: 30%	DNCB dilución 0,25%
DPM-BLANCO	13814,5	9921,5	8328,5	6378,5	125622,5
DPM/ganglio	1726,8	1240,2	1041,1	797,3	15702,8
RATIO		0,7	0,6	0,5	9,1
Conclusión		No sensibilizante	No sensibilizante	No sensibilizante	Sensibilizante

En la tabla 7, la abreviatura DPM significa "desintegración por minuto", el blanco es la referencia y el DNCB es el dinitroclorobenceno que sirve de control sensibilizante. Los resultados muestran que el pentil-ramnósido, incluso a una concentración de 30%, no es sensibilizante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende por lo menos un monómero de ramnosa, cuya función hidroxilo anomérica está sustituida con un radical alcoxi de C₅-C₁₂ para el tratamiento cosmético de pieles y/o de las mucosas sensibles, irritadas, intolerantes, con tendencia alérgica, envejecidas, sometidas a una señal de peligro, que presentan un trastorno de la barrera cutánea, que presentan unas rojeces cutáneas o que presentan un desequilibrio inmunológico no patológico relacionado con el envejecimiento intrínseco, extrínseco u hormonal.
- 10 2. Composición que comprende por lo menos un monómero de ramnosa, cuya función hidroxilo anomérica está sustituida por un radical alcoxi de C₅-C₁₂ para retrasar el envejecimiento natural de la piel y/o para prevenir el envejecimiento acelerado de la piel sometida a las agresiones externas, en particular para prevenir el envejecimiento fotoinducido de la piel.
- 15 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque comprende 0,001 a 50% en peso de dicho monómero.

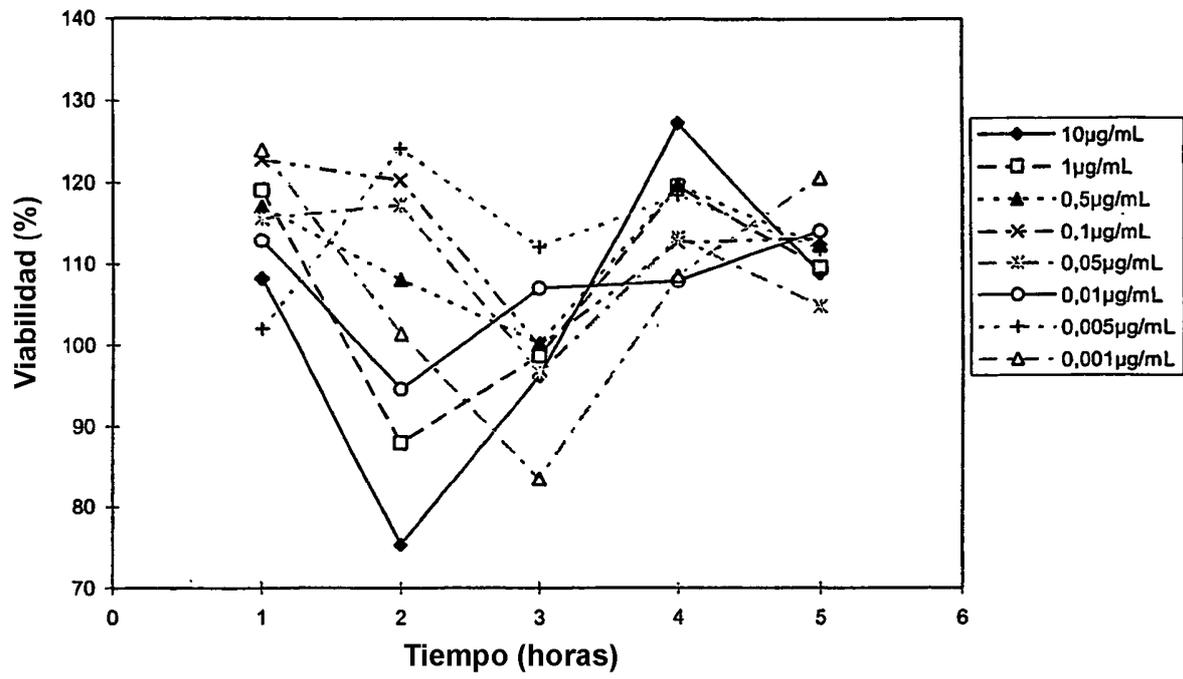


Fig. 1

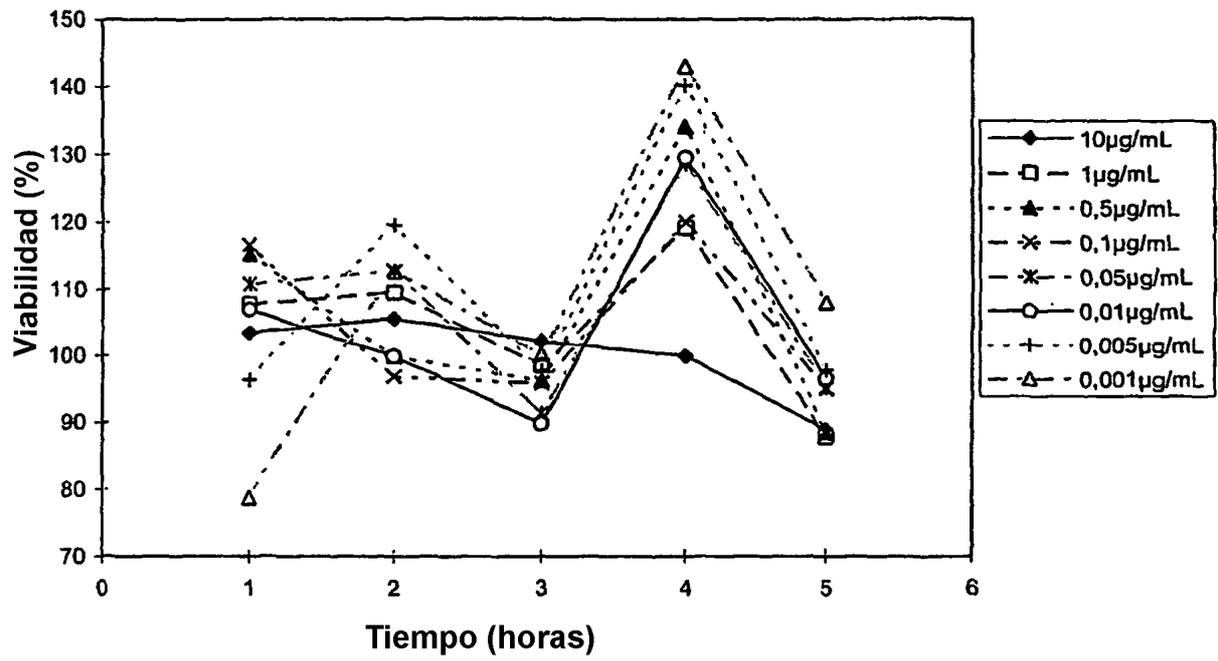


Fig. 2