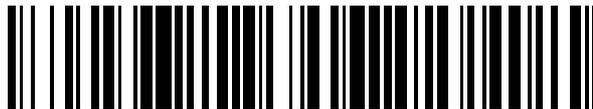


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 465**

51 Int. Cl.:
A61K 31/01 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61K 8/30 (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09290370 .7**
96 Fecha de presentación: **18.05.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2119435**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **COMPOSICIÓN EMOLIENTE.**

30 Prioridad:
16.05.2008 FR 0853187

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2011

73 Titular/es:
**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE
45, PLACE ABEL-GANCE
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:
**Fabre, Pierre;
Przybylski, Christophe;
Cordoliani, Jean-François y
Kopec, Marion**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 465 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

Composición emoliente.

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de las patologías y de los estados asociados a una función de barrera de la piel alterada.

La epidermis es un epitelio pluriestratificado, de origen ectodérmico, en constante renovación.

10 Protege el organismo de la deshidratación, de los estreses mecánicos y de ciertas agresiones patógenas.

Está compuesta por varios tipos celulares: unos queratinocitos a más del 90% pero también unas células de Langerhans, de Merkel y unos melanocitos.

15 Se distinguen varias capas de naturaleza morfológica y de composición celular diferentes, desde el interior hacia el exterior: la capa basal, asiento celular cuyos queratinocitos tienen una capacidad de proliferación muy alta que permite asegurar la auto-renovación de la epidermis, y después las capas suprabasales (capas granulosa, espinosa) y por último la capa córnea (Stratum Corneum, SC).

20 Una de las funciones fundamentales de la piel es asegurar una barrera entre el organismo y el medio exterior oponiéndose en un sentido a la penetración en la epidermis de hongos, bacterias y alérgenos del entorno y en el otro sentido a la pérdida en agua.

25 La calidad de la función de barrera se evalúa *in vivo* en el ser humano mediante la medición de la pérdida insensible en agua y el porcentaje de hidratación, y en el ratón mediante la muerte por deshidratación de los embriones, la permeabilidad cutánea a un colorante o la disminución de peso corporal.

30 La integridad del cemento lipídico extracelular así como todos los elementos celulares de la capa córnea y el equilibrio entre proliferación y diferenciación queratinocitarias son capitales para el mantenimiento de una función de barrera epidérmica funcional.

El gradiente de pH regula las actividades de las diferentes enzimas y contribuye así al equilibrio de la barrera.

35 Regulando la secreción de los cuerpos lamelares en la capa granulosa, la concentración en iones de calcio influye en la composición del cemento extracelular de la capa córnea y así en el equilibrio de la barrera epidérmica (Lee *et al.*, Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis, *J. Clin Invest*, 89, 530-538, 1992).

40 La presencia de un gradiente de agua que pasa de 70% en las capas visibles de la epidermis a 30% en las capas inferiores del SC y a 15% a nivel de las capas de las células más externas de la epidermis (Warner *et al.*, Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile, *J. Invest Dermatol*, 90, 218-224, 1988) sugiere que una parte del agua está retenida desde la unión entre la capa granulosa y la capa córnea.

45 Una de las funciones del agua en la capa córnea es permitir las reacciones de hidrólisis enzimática necesarias para la flexibilidad de la piel y para una descamación normal. Si la cantidad de agua presente en el SC desciende por debajo de un umbral crítico, las reacciones enzimáticas están perturbadas, lo cual provoca la adhesión de los corneocitos y la acumulación de las células en la superficie de la piel. Esto crea una apariencia visible de sequedad, picores, la piel se pela y se escama.

50 La hidratación cutánea se basa en dos fenómenos: la aportación de agua por el flujo transepidérmico aportado desde la circulación sanguínea y la retención de agua epidérmica que utiliza la función de barrera cutánea. Sin embargo, la barrera frente a pérdidas hídricas no es absoluta. El movimiento normal de intercambio de agua entre el medio externo e interno a través de la capa córnea se denomina TEWL (transdermal water loss) y constituye una parte de la pérdida insensible en agua.

55 La función de barrera cutánea está alterada en la mayoría de las patologías de la piel más extendidas en la población y frecuentemente están acompañadas de una componente inflamatoria (soriasis, dermatitis atópica, ictiosis, sequedad cutánea, etc.). Lo está asimismo en un gran número de estados fisiológicos en respuesta al tiempo (envejecimiento cutáneo) o a las agresiones del entorno (UV, porcentaje de humedad, contaminación, quemaduras).

60 La perturbación de la función de barrera, crónica o aguda, hace que el organismo resulte más sensible a las agresiones externas y a la deshidratación. Se puede asociar a un desorden de la descamación y a una hiperproliferación (Jackson *et al.* Pathobiology of the stratum corneum, *West J. Med*, 158, 279-285, 1993).

65 La solicitud FR 2 847 467 se refiere a la utilización de por lo menos un agente modulador de la actividad de la

oxiesterol 7 α -hidroxilasa para la preparación de una composición cosmética destinada a prevenir y/o tratar los desórdenes cutáneos y/o de membranas de tipo mucosas que afectan al buen funcionamiento de la barrera cutánea.

5 La solicitud FR 2 831 443 se refiere a la utilización de por lo menos un extracto de *Gingko Biloba* o de *Olea Europaea*, para la preparación de una composición destinada a mejorar la función de barrera de la piel.

La solicitud FR 2 905 857 se refiere a la utilización de una composición que comprende un extracto de pulpa de algarroba para hidratar y/o proteger de la sequedad cutánea.

10 Unas emulsiones que comprenden glicerol, vaselina, parafina líquida y agua están descritas en el documento Kampf *et al.*, BMC Dermatology, 6 (1), 2006, 1471-5949 y en la patente FR 7 117 627. Existe una necesidad de un tratamiento de las patologías y de los estados asociados a una función de barrera de la piel alterada.

15 Se ha constatado ahora de manera completamente sorprendente e inesperada que una asociación de tipo glicerol, vaselina y parafina líquida en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite permitía tratar los estados de sequedad cutánea.

20 Los inventores han demostrado que esta asociación restaura una barrera de la piel protectora y funcional. Han evaluado la actividad hidratante de esta asociación y la mejora subsiguiente de la función de barrera de la piel utilizando un modelo de piel *in vivo* de deshidratación cutánea inducida. Además, han observado la expresión de los marcadores epidérmicos moleculares potencialmente implicados en la homeostasis de la función de barrera epidérmica mediante PCR cuantitativa e inmuno-histoquímica.

25 Los inventores han seguido asimismo la actividad serina proteasa mediante zimografía *in situ* y la funcionalidad de la barrera de la piel utilizando unas sondas fluorescentes. Los resultados muestran que la asociación de tipo glicerol, vaselina y parafina líquida en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite permite restaurar la actividad serina proteasa y suprimir la inflamación inducida por el estrés.

30 Los inventores han demostrado asimismo que la elección de una vaselina particular en esta asociación es particularmente ventajosa para alcanzar los resultados anteriores. La vaselina como agente oclusivo y emoliente es particularmente importante en la composición. En efecto, formando una película protectora sobre la piel, permite ayudar a compensar la deficiencia de la función de barrera alterada. La calidad de la película formada sobre la piel depende en gran medida de las propiedades reológicas de la vaselina utilizada en la fabricación.

35 La presente invención tiene así por objeto una composición de uso tópico que comprende, como principio activo, una asociación de glicerol, vaselina y parafina líquida, en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

40 En el sentido de la presente invención, se denominará "asociación activa" la asociación glicerol, vaselina y parafina líquida, en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

Ventajosamente, el glicerol, la vaselina y la parafina líquida presentan los criterios descritos y controlados según la "European Pharmacopeia", 6^a edición.

45 Ventajosamente, la vaselina de la asociación activa presenta un punto de goteo comprendido entre 35 y 70°C, preferentemente comprendido entre 51 y 57°C, de manera particularmente preferida de aproximadamente 54°C. El punto de goteo se mide según el procedimiento 2.2.17 descrito en la "European Pharmacopeia", 6^a edición.

50 Ventajosamente, la vaselina de la asociación activa presenta una consistencia comprendida entre 175 y 195 1/10 mm, preferentemente de aproximadamente 185 1/10 mm (penetración del cono a 25°C).

Ventajosamente, la vaselina de la asociación activa presenta una viscosidad comprendida entre 4 y 5 cSt a 100°C, preferentemente de aproximadamente 4,8 cSt a 100°C.

55 Ventajosamente, la vaselina de la asociación activa presenta un espectro en espectroscopia RMN a 500 MHz del carbono C13 que comprende un pico a 24,55 ppm cuya área relativa a un control de tetrametilsilano (TMS) al 1% está comprendida entre 4 y 8.

60 En la composición según la invención, la asociación activa está presente según una proporción comprendida entre 10 y 50% y preferentemente entre 20 y 30% en peso con respecto al peso total de la composición; la concentración en glicerol está comprendida entre 5 y 30%, preferentemente entre 10 y 20% y de manera particularmente preferida es de aproximadamente 15% en peso con respecto al peso total de la composición, la concentración en vaselina está comprendida entre 3 y 20%, preferentemente entre 5 y 10% y de manera particularmente preferida es de aproximadamente 8% en peso con respecto al peso total de la composición, y la concentración en parafina líquida está comprendida entre 0,5 y 5%, preferentemente entre 1 y 3% y de manera particularmente preferida es de aproximadamente 2% en peso con respecto al peso total de la composición.

65

En la fase acuosa, el agua está comprendida entre 30 y 80% en peso con respecto al peso total de la composición.

5 Ventajosamente, la composición según la invención comprende aproximadamente 15% de glicerol, aproximadamente 8% de vaselina y aproximadamente 2% de parafina líquida en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición dermatológica según la invención comprende, además, unos excipientes habituales dermatológicamente compatibles.

10 La composición dermatológica según la presente invención se puede preparar en forma de una emulsión de agua en aceite (W/O) o de aceite en agua (O/W), de una emulsión múltiple como por ejemplo, una emulsión de agua en aceite en agua (W/O/W) o una emulsión de aceite en agua en aceite (O/W/O), o también en forma de una hidrodispersión o una lipodispersión, un gel o un aerosol.

15 Los excipientes dermatológicamente compatibles pueden ser cualquier excipiente de entre los conocidos por el experto en la materia con vistas a obtener una composición para la aplicación tópica en forma de crema, de loción, de gel, de pomada, de emulsión, de microemulsión, de spray, etc.

20 La composición según la invención puede contener en particular unos aditivos y ayudas para la formulación, tales como unos emulsionantes, unos espesantes, unos gelificantes, unos fijadores de agua, unos agentes de extensión, unos estabilizantes, unos colorantes, unos perfumes y unos conservantes.

Unos emulsionantes apropiados comprenden el ácido esteárico, la trolamina, el PEG-40-estearato.

25 Preferentemente, la composición según la invención presenta aproximadamente 5% de emulsionantes en peso con respecto al peso total de la composición.

30 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 1 y 5% de ácido esteárico, preferentemente aproximadamente 3% en peso con respecto al peso total de la composición.

Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 0 y 2% de trolamina, preferentemente aproximadamente 0,5% en peso con respecto al peso total de la composición.

35 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 0 y 2% de PEG-40-estearato, preferentemente aproximadamente 0,5% en peso con respecto al peso total de la composición.

Unos espesantes apropiados comprenden el monoestearato de glicerol, y el PEG 600.

40 Preferentemente, la composición según la invención presenta aproximadamente 5% de espesantes en peso con respecto al peso total de la composición.

Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 2 y 10% de monoestearato de glicerol, preferentemente aproximadamente 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

45 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 2 y 10% de PEG 600, preferentemente aproximadamente 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

Unos conservantes apropiados comprenden el parahidroxibenzoato de propilo, y el clorocresol.

50 Preferentemente, la composición según la invención presenta aproximadamente 0,1% de conservantes en peso con respecto al peso total de la composición.

55 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 0,05 y 1% de parahidroxibenzoato de propilo, preferentemente aproximadamente 0,1% en peso con respecto al peso total de la composición.

Unos agentes de extensión apropiados comprenden la dimeticona, el polidimetilciclosiloxano.

60 Preferentemente, la composición según la invención presenta aproximadamente 2% de agentes de extensión en peso con respecto al peso total de la composición.

Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 0,2 y 2% de dimeticona, preferentemente aproximadamente 0,5% en peso con respecto al peso total de la composición.

65 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 1 y 3% de polidimetilciclosiloxano, preferentemente aproximadamente 2,5% en peso con respecto al peso total de la composición.

Unos fijadores de agua apropiados comprenden el polietilenglicol, preferentemente el polietilenglicol 600.

Preferentemente, la composición según la invención presenta aproximadamente 8% de fijadores de agua en peso con respecto al peso total de la composición.

5 Ventajosamente, la composición según la invención presenta entre 2 y 10% de polietilenglicol, preferentemente aproximadamente 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

10 El agua utilizada para la fase acuosa de la emulsión puede ser un agua destilada o un agua termal que tiene unas propiedades dermatocósméticas.

Ventajosamente, la composición según la invención comprende:

- 15
- aproximadamente 15% de glicerol,
 - aproximadamente 8% de vaselina,
 - aproximadamente 2% de parafina líquida, y a título de excipientes:
 - aproximadamente 1 a 5% de ácido esteárico,
 - aproximadamente 2 a 10% de monoestearato de glicerol,
 - aproximadamente 1 a 3% de polidimetilciclosiloxano,
 - 20 - aproximadamente 0,2 a 2% de dimeticona,
 - aproximadamente 2 a 10% de polietilenglicol 600,
 - aproximadamente 0 a 2% de trolamina,
 - aproximadamente 0,05 a 1% de parahidroxibenzoato de propilo,
 - hasta el 100% en agua.

25 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de una composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar los estados de sequedad cutánea, en particular de ciertas dermatosis tales como la dermatitis atópica, estados ictiósicos, y soriasis.

30 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de una composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar las quemaduras superficiales de poca extensión.

35 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de una composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado a prevenir y/o tratar/reducir la frecuencia y la intensidad de los brotes eczematosos observados en los pacientes que padecen dermatitis atópica.

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

Figuras

40 Figura 1: Espectro RMN a 500 MHz del carbono C13 de 5 g de muestra de la vaselina Syntadex A (Synthéal) y de la composición A.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Formulaciones

Composición A

- 50
- 15 g de glicerol,
 - 8 g de vaselina,
 - 2 g de parafina líquida,
 - 55 - 0,5 g de trolamina,
 - y a título de excipientes: ácido esteárico, monoestearato de glicerol, polidimetilciclosiloxano, dimeticona, polietilenglicol (PEG) 600, parahidroxibenzoato de propilo,
 - 60 - agua hasta 100 g.

Composición A'

- 65
- 15 g de glicerol,
 - 8 g de vaselina,

- 2 g de parafina líquida,
- 1,5 g de ácido esteárico,
- 5 g de monoestearato de glicerol,
- 1,5 g de polidimetilciclosiloxano,
- 5 - 0,5 g de dimeticona,
- 5 g de polietilenglicol 600,
- 0,15 g de trolamina,
- 0,1 g de parahidroxibenzoato de propilo,
- agua hasta 100 g.

10

Composición B

- 15 g de glicerol,
- 15 - 8 g de vaselina,
- 2 g de parafina líquida,
- 0,5 g de PEG-40-estearato,
- 20 - y a título de excipientes: ácido esteárico, monoestearato de glicerol, polidimetilciclosiloxano, dimeticona, polietilenglicol 600, clorocresol,
- agua hasta 100 g.

25

Composición B'

- 15 g de glicerol,
- 8 g de vaselina,
- 30 - 2 g de parafina líquida,
- 3 g de ácido esteárico,
- 5 g de monoestearato de glicerol,
- 2 g de polidimetilciclosiloxano,
- 0,5 g de dimeticona,
- 35 - 0,1 g de trolamina,
- 3 g de polietilenglicol 600,
- 0,5 g de PEG-40-estearato,
- 0,075 g de clorocresol,
- agua hasta 100 g.

40

Ejemplo 2: Análisis de la regulación de la deshidratación cutánea inducida

Se ha evaluado en este caso la actividad hidratante de la composición A y la mejora subsiguiente de la función de barrera de la piel utilizando un modelo de piel *ex vivo* de deshidratación cutánea inducida.

45

Se observa la expresión de los marcadores epidérmicos moleculares diferenciales mediante PCR cuantitativa e inmuno-histoquímica.

Se sigue asimismo la actividad de las enzimas de serina proteasa mediante zimografía *in situ* y la degradación de proteínas comeodesmosomales mediante transferencia western.

50

La funcionalidad de la barrera de la piel se analiza utilizando unas sondas fluorescentes.

Material y métodos

55

I. Modelos tisulares

1. Preparación de los explantes cutáneos

60 El laboratorio recupera unas muestras de piel que proceden de desechos operatorios de cirugía plástica (disminuciones mamarias). La utilización de estas muestras entra en el marco de la "declaración de actividad de conservación y de preparación de elementos del cuerpo humano para las necesidades de programa de investigación del grupo Pierre Fabre" realizada en el Ministerio de Enseñanza Superior e Investigación.

65 Estas muestras se lavan en 10 baños de PBS y después se troquelan en discos de 2 cm de diámetro. Los explantes cutáneos se extienden sobre una rejilla en una caja de Petri y se sella un anillo de 1 cm de diámetro sobre la piel

para delimitar la zona de tratamiento.

2. Cinética de los modelos

- 5 Para el modelo de deshidratación inducida, la piel se seca durante 2 horas bajo la campana de cultivo celular en una caja sin tapa y después se dispone en la estufa para un tratamiento tópico con o sin asociación activa durante 2 horas. El control negativo del estrés de deshidratación sufre la misma cinética en una caja de Petri cerrada.

3. Extracciones para el análisis

- 10 Después del tratamiento, se extraen 2 biopsias de 6 mm de diámetro para el análisis de la expresión de los ARN y se introduce una biopsia de 4 mm de diámetro en un bloque de resina Tissue Tek® (Sakura Finetek) para la histología. Para el análisis de las proteínas, la piel se expone a un choque térmico en un baño de agua a 60°C durante 5 minutos y después a 4°C durante 2 minutos con el fin de separar la epidermis de la dermis.

- 15 Las biopsias y las epidermis se congelan en el nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C antes de ser analizadas.

II. Análisis del transcriptoma mediante PCR cuantitativa

- 20 Las biopsias de piel se trituran en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido y los ARN son extraídos gracias a un kit RNeasy® (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor. El ARN se dosifica después con la ayuda de un Bioanalyser 2100® (Agilent Technologies) sobre chips RNA 6000 Nano LabChip®. El ADNc se obtiene a partir de 1 µg de ARN mediante reacción enzimática de retrotranscripción realizada con un kit Acces RT-PCR Core Reagents® (Promega), con la ayuda de cebadores oligo dT. Los niveles de expresión génica se analizan mediante
- 25 PCR cuantitativa sobre un termociclador de fluorescencia iCycler iQ® (Biorad) con unos kits PCR iQ™ SYBR® Green Super Mix (Biorad) siguiendo un protocolo de 40 ciclos que comprende una desnaturalización a 95°C (15 s) y una elongación a 60°C (1 mm). La acumulación del producto de PCR proporcional a la emisión de fluorescencia (que intercala SYBR®Green) se visualiza ciclo tras ciclo gracias al programa iCycler.

- 30 El programa de análisis iCycler versión 3.1 suministra unos valores brutos de C_T (Cycle Threshold): ciclo a partir del cual empieza la amplificación de ADNc. La expresión de varios genes de referencia se analiza en paralelo con la ayuda del programa Genorm versión 3.4 que permite seleccionar el gen de referencia más estable de una muestra a otra. Este gen sirve después de referencia para la normalización de los resultados mediante el cálculo del $\Delta C_T = C_T$ gen de interés - C_T gen de referencia.

- 35 El factor de inducción (FI) se calcula a continuación para cada tratamiento con respecto a la condición control correspondiente. $FI = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ en la que $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ tratado - ΔC_T control. La expresión de los ARNm se evalúa por duplicado para cinco experimentos procedentes de 5 individuos diferentes. Cuando el factor de inducción con respecto al control es superior a 2, se considera que la expresión del gen es inducida y cuando es inferior a 0,5 se considera que la expresión está reprimida. El efecto del principio activo sobre la respuesta al estrés causada en el modelo se evalúa por el porcentaje de inhibición calculado con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de inhibición de respuesta al estrés} = 100 * \frac{(FI \text{ estresado} - FI \text{ control sin estrés}) - (FI \text{ tratado} - FI \text{ control sin estrés})}{(FI \text{ estresado} - FI \text{ control sin estrés})}$$

- 45 Con respecto al modelo de estudio, la condición "control sin estrés" corresponde al control no desecado; la condición "estresada" corresponde a una biopsia de piel que ha sido desecada 2 horas y después que ha pasado 2 horas suplementarias en condición control (es decir sin tratamiento tópico); por último la condición "tratada" es la piel que ha sufrido 2 horas de desecado seguidas de 2 horas de tratamiento por un emoliente.

III. Análisis de la expresión proteica mediante transferencia western

- 50 Las epidermis tratadas se trituran en un mortero enfriado con nitrógeno líquido y las proteínas son extraídas en un tampón de lisis RIPA RIPA (Tris HCl pH8 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X 100 IX; Na+Desoxicolato al 1%; SDS al 0,1%; EDTA 5 mM; DTT 100 mM; cóctel de inhibidor de proteasas (referencia P8340, SIGMA).

- 55 Las proteínas se dosifican a continuación mediante el método DC-DC Protein Assay (Biorad) y se analizan mediante transferencia western. Para cada condición, se depositan 25 a 40 µg de proteínas totales sobre unos geles Tris-Glicina al 7,5% de poliacrilamida. La mezcla proteica se separa mediante electroforesis con la ayuda del sistema Mini Protean II (Biorad) y las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham). La proteína de interés se revela mediante un anticuerpo específico y un kit ECL + (Amersham). La cantidad de
- 60 proteínas y la proporción de forma degradada se calculan gracias al programa Image Master TotalLab versión 1.11 (Amersham) después de la normalización con respecto a la β -actina (proteína de referencia).

IV. Técnicas histológicas

Las biopsias de piel se seccionan con el criotomo (Leica CM 3050s) en cortes de 5 µm de grosor y se depositan sobre unas láminas de observación (Starfrost®).

5 1. Inmunohistoquímica

Los criocortes se fijan durante 10 minutos con acetona a 20°C y después se rehidratan con PBS antes de ser analizados mediante marcado inmunológico. Después de la fijación y de la rehidratación, los cortes de piel se saturan con una disolución de BSA al 3% y se incuban durante 1 hora con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés. En un segundo tiempo, se incuban durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo Alexa-488 o Alexa-555 y se montan por último en un Mowiol que contiene DAPI para marcar los núcleos.

15 2- Zimografía *in situ*

Después de una fijación de 10 minutos en acetona a -20°, los cortes se aclaran en una disolución de lavado (Tween 20 al 1% en agua) y se incuban durante 2 horas a 37°C con una disolución que contiene el sustrato específico de las enzimas de interés acoplado a un fluoróforo (anexo). Cuando la enzima se activa, el fluoróforo se escinde, liberando una señal fluorescente observable con microscopio. Las láminas marcadas se observan a continuación con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 50i) o con microscopio confocal invertido Zeiss Axiovert 100.

3. Sonda fluorescente

25 Después del tratamiento de deshidratación, los explantes cutáneos se incuban durante una hora suplementaria en estufa a 37°C con una sonda fluorescente Lucifer Yellow Carboxyhydrazide dilithium salt (Invitrogen) a 1 mM en tampón HBSS. La piel se aclara a continuación en un baño de HBSS durante 1 minuto y después se extraen unas biopsias de 4 mm de diámetro y se incluyen en resina Tissue TekR® (Sakura Finetek) (Matsuki *et al*, 1998). La piel se corta después, los núcleos se marcan con DAPI y las láminas se observan con microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 450 nm tal como se ha descrito anteriormente.

Resultados

35 1. Modelo de ruptura de la función de barrera mediante desecado inducido

1. Medición de la permeabilidad cutánea mediante una sonda fluorescente

40 El primer análisis consistió en estudiar un parámetro funcional fundamental en la función de barrera cutánea: la permeabilidad de las capas superiores de la epidermis. La incubación de la piel con una sonda fluorescente (Lucifer Yellow) después del experimento de desecado ha permitido caracterizar la modulación de la permeabilidad cutánea. En condición control, el marcado es muy débil y superficial, la sonda penetra poco a través de la capa córnea y se elimina durante el aclarado. Después de dos horas de desecado, el marcado se puede observar en los estratos más profundas de la capa córnea. El desecado hace la piel más permeable, y su función de barrera está deteriorada. El tratamiento tópico mediante la composición A tras las dos horas de desecado restaura la impermeabilidad del SC frente a la sonda, el marcado es de nuevo débil y superficial, tal como en la condición control. Se puede entonces concluir que el tratamiento hidratante tiene un efecto reparador sobre la piel desecada y sobre la función de barrera cutánea que se puede observar sobre el modelo tisular.

50 2. Efectos sobre la regulación del transcriptoma y del proteoma

La expresión de diferentes genes implicados potencialmente en la homeostasis de la función de barrera epidérmica se ha medido mediante PCR cuantitativa en las diferentes condiciones de estrés o de tratamiento del modelo de desecado. El análisis por inmunohistoquímica ha permitido mostrar la reorganización de la expresión de ciertas proteínas en términos de localización, por ejemplo las uniones apretadas. La degradación de las proteínas corneodesmosomales ha sido analizada mediante transferencia western.

Las dianas estudiadas con la ayuda de estos diferentes enfoques han sido agrupadas según su papel fisiológico (véase la tabla 1). El objetivo de este estudio es observar una respuesta al estrés que se puede visualizar y una corrección del efecto del estrés mediante la aplicación tópica de la composición A.

60 El trabajo realizado ha permitido asimismo demostrar los diferentes niveles de regulación de ciertas dianas. Así, se ha podido constatar que las enzimas de la descamación no estaba regulada a nivel transcripcional sino más especialmente a nivel de su actividad (véanse Resultados 3).

Tabla 1: Recapitulativo de las dianas y de la respuesta farmacológica estudiadas en el modelo de desecado

Herramientas	Respuesta al estrés	Inhibición de la respuesta al estrés por la composición A
Permeabilidad cutánea	O	O
Desmogleína 1	O	O
Cdsn	X	X
Desmocolina	O	O
Plakoglobina	O	X
KLK5	O	X
KLK7	X	X
KLK8	X	X
Proteasas de serina	O	O
Catepsina D	X	X
ABC A12	O	O
ABC G1	X	X
B-GC	X	X
DES 2	X	X
Filagrina	O	O
Involucrina	X	X
TG1	X	X
TG3	X	X
Caspasa 14	X	X
Elox-3	O	X
12R-LOX	X	X
HAS 2	O	X
CD44	X	X
AQP3	O	O
NHE1	O	O
IL-1a	O	O
Ocludina	O	O
Claudina 1	O	O
Claudina 4	O	O
ZO-1	X	X
E-Caderina	X	X
βCatenina	X	X

3. Medición de la actividad enzimática relacionada con la descamación

5

La actividad de las proteasas con serina ha sido evaluada mediante zimografía *in situ* sobre el modelo de deshidratación y se ha observado con microscopio confocal en la condición de control después de dos horas de desecado y después de dos horas de desecado seguidas por una incubación de dos horas con la composición A. El marcado es el más intenso en la condición de control, y corresponde a la actividad fuerte normal. Este marcado disminuye y se vuelve irregular a lo largo de la capa córnea después de dos horas de desecado mientras que su intensidad aumenta y la localización de la actividad se reorganiza después de las dos horas de incubación con la composición A. El desecado tiene por efecto disminuir y perturbar la actividad enzimática. Estos resultados son coherentes con la disminución de la degradación de las proteínas corneodesmosomales que se observa con el desecado y confirma el efecto del desecado sobre la disminución de la descamación observada sobre el modelo implantado. La composición A es capaz de restaurar la actividad enzimática de la piel deshidratada, lo cual confirma el efecto de esta composición para un retorno de la homeostasia de la descamación.

10

15

Estos resultados muestran que la composición A permite restaurar el nivel de expresión de las dianas moleculares cuya expresión ha aumentado por el estrés de deshidratación cutánea inducido. La composición A permite asimismo restaurar la actividad serina proteasa. Además, la aplicación tópica de la composición A permite suprimir la inflamación inducida por el estrés.

20

El conjunto de estos resultados sugiere que la composición A en aplicación tópica permite restaurar la función de barrera de la piel, limitar

25

Ejemplo 3: Caracterización mediante RMN de la vaselina Syntadex A

Se solubilizan 5 g de muestra en cloroformo deuterado para medición mediante RMN a 500 MHz del carbono C13.

ES 2 370 465 T3

La vaselina Syntadex A (Synthéal) presenta un espectro característico en espectroscopía RMN a 500 MHz del carbono C13, que comprende en particular un pico a 24,55 ppm cuya área relativa a un control de tetrametilsilano (TMS) al 1% está comprendida entre 4 y 8.

- 5 Este mismo pico se encuentra en la composición A.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de uso tópico que comprende, como principio activo, una asociación de glicerol, vaselina y parafina líquida, en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, en la que la vaselina presenta un punto de goteo comprendido entre 51 y 57°C, una consistencia comprendida entre 175 y 195 1/10 mm (penetración del cono a 25°C) y una viscosidad comprendida entre 4 y 5 cSt a 100°C.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la vaselina presenta un espectro en espectroscopía RMN a 500 MHz del carbono C13 que comprende un pico a 24,55 ppm cuya área relativa a un control de tetrametilsilano (TMS) al 1% está comprendida entre 4 y 8.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la vaselina presenta un punto de goteo de 54°C.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vaselina presenta una consistencia de aproximadamente 185 1/10 mm (penetración del cono a 25°C).
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vaselina presenta una viscosidad de aproximadamente 4,8 cSt a 100°C.
- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende aproximadamente 15% de glicerol, aproximadamente 8% de vaselina y aproximadamente 2% de parafina líquida.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende uno o varios excipientes seleccionados de entre el grupo constituido por ácido esteárico, monoestearato de glicerol, polidimetilciclosiloxano, dimeticona, polietilenglicol 600, trolamina, parahidroxibenzoato de propilo, clorocresol, PEG-40-estearato, y agua destilada.
- 30 8. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento destinado a tratar los estados de sequedad cutánea de ciertas dermatosis tales como la dermatitis atópica, los estados ictióticos, soriasis.
- 35 9. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un medicamento destinado a tratar las quemaduras superficiales de poca extensión.
- 40 10. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un medicamento destinado a prevenir y/o tratar/reducir la frecuencia y la intensidad de los brotes eczematosos observados en los pacientes que padecen dermatitis atópica.
- 45 11. Utilización de una vaselina que presenta un punto de goteo comprendido entre 51 y 57°C para preparar una composición de uso tópico que comprende, como principio activo, una asociación de glicerol, vaselina y parafina líquida en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.
12. Utilización de una vaselina que presenta un espectro en espectroscopía RMN a 500 MHz del carbono C13 que comprende un pico a 24,55 ppm cuya área relativa a un control de tetrametilsilano (TMS) al 1% está comprendida entre 4 y 8 para preparar una composición de uso tópico que comprende, como principio activo, una asociación de glicerol, vaselina y parafina líquida en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

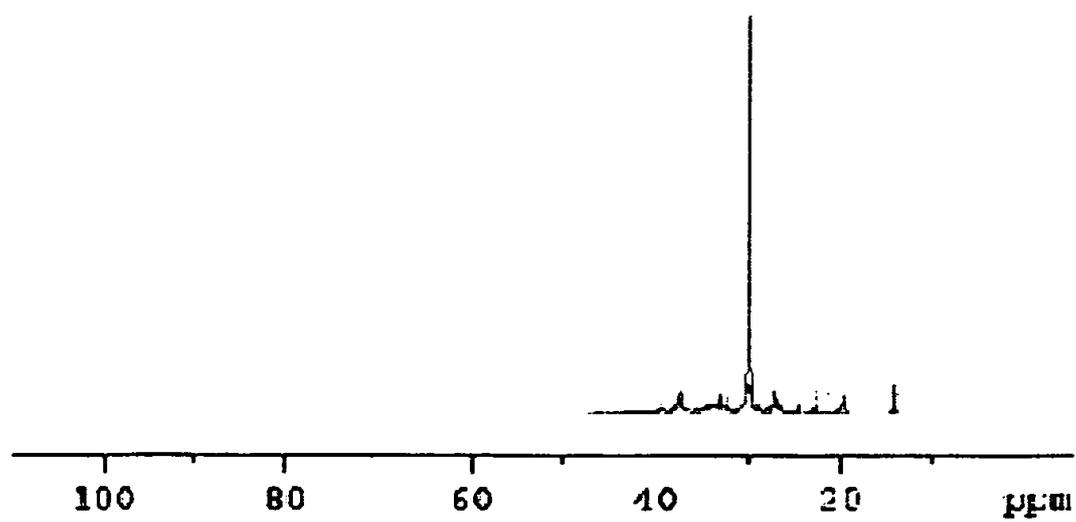


Fig. 1