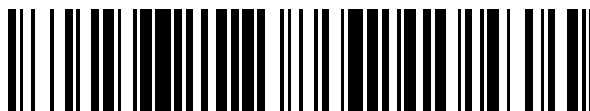


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 343**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/49** (2006.01)

**A61Q 17/00** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08368016 .5**

96 Fecha de presentación: **12.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2039341**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Composiciones cosméticas que comprenden derivados de tiazolidina contra las consecuencias del estrés oxidativo de la piel**

30 Prioridad:  
**21.09.2007 FR 0706641**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.04.2012**

73 Titular/es:  
**EXSYMOL S.A.M.  
4 AVENUE ALBERT II  
98000 MONACO, MC**

72 Inventor/es:  
**Seguin, Marie-Christine**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 378 343 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 derivados de tiazolidina contra las consecuencias del estrés oxidativo de la piel.

5 La invención se refiere a composiciones cosméticas que comprenden los derivados de tiazolidina, precisamente en el campo de la protección de la piel y más particularmente en la lucha contra el estrés oxidativo y sus consecuencias cutáneas.

10 Por su papel de envoltura externa del cuerpo con respecto a la atmósfera, la piel es un órgano particularmente sensible al medio ambiente al cual es sometido. Éste puede ser de naturaleza pro-oxidante, debido a las exposiciones prolongadas a los rayos Ultra-violetas del sol, a las atmósferas ahumadas o conteniendo vapores de contaminantes químicos atmosféricos. Estas "agresiones" de naturaleza exógena engendran en efecto un exceso de especies muy reactivas, radicalares o no, con fuerte potencial oxidante. Son especialmente las especies derivadas del oxígeno molecular, llamadas a menudo especies oxigenadas reactivas o "EOR" o "ROS" en inglés, tales como el anión superóxido  $O_2^-$ , el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , el "oxígeno singuleto"  $^1O_2$ , el radical hidroxilo  $OH^\cdot$ .

15 Esta sobreproducción de especies reactivas EOR es entonces responsable de la alteración de los constituyentes biológicos de la piel, en particular de aquéllos encontrados en las células cutáneas (ADN, proteínas, lípidos, glúcidos). La formación de subproductos provenientes de la degradación de estas moléculas biológicas, y en particular aquéllos provenientes de los fosfolípidos membranarios peroxidados por los EOR, es también nefasta a la piel. Por fin, la exposición de una piel a una sobreproducción de EOR inicia igualmente reacciones bioquímicas complejas al origen de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, de metabolitos mutagénicos, y a la muerte de las células cutáneas (Briganti S. *et al.*, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. (2003), vol. 17, pp. 663-669).

20 De una manera general, todos estos fenómenos son perjudiciales a la piel, más particularmente cuando alcanzan las capas profundas, especialmente en la dermis. Es además bien establecido hoy, que una pérdida de control por la piel de la presencia excesiva de EOR, conduciendo a un estado designado comúnmente por "estrés oxidativo", está implicado claramente en la iniciación de numerosos desórdenes o anomalías cutáneas: envejecimiento inducido, inmunosupresión, carcinogénesis, inflamación/eritema, irritación, etc, (Bickers D.R. y al., J. Invest. Dermatol. (2006), vol. 126, pp. 2565-2575 y referencias citadas).

30 Fisiológicamente, y a pesar de la existencia de sistemas antioxidantes naturales de regulación y de protección: enzimáticos (superóxidos dismutasas, catalasas, peroxidasas, etc) o no enzimáticos (vitaminas A, C, D o E, carotenoides, glutatión, oligoelementos, etc), la piel presenta, frente a un flujo importante de radicales libres o de especies EOR, una defensa rápidamente agotada y desbordada.

35 También, desde hace numerosos años, la concepción de sistemas capaces de limitar los efectos deletéreos de esta sobreproducción de especies reactivas, o mismo capturar o secuestrar éstas, se convirtió en un tema de investigación mayor. Así, para paliar a las insuficiencias fisiológicas de la piel, numerosas moléculas, de origen natural (extractos de plantas o de animales terrestres) o de origen sintético, fueron desarrolladas y propuestas a título de suplemento antioxidante o antirradicalar, administradas por vía general (oral) o por aplicación tópica (Darvin M. y al., Skin Pharmacol. Physiol. (2006), vol. 19, pp. 238-247).

40 Sin embargo, es en general señalado, para numerosas moléculas antioxidantes o antirradicales perteneciente al estado de la técnica, una protección eficaz contra los EOR llamados de primera generación según la invención. Por "EOR de primera generación", hay que comprender las especies derivadas de la reducción del oxígeno molecular ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $ONOO^\cdot$ , etc). Es en cambio muy raramente justificada una acción con respecto a los subproductos de oxidación o productos llamados de segunda generación (aldehídos tóxicos, productos finales derivados de la peroxidación lipídica, etc), ellos mismos tóxicos y resultantes de reacciones en cadena de las especies primarias con los componentes bioquímicos de la célula.

45 De modo general, queda que la selección de una sustancia antioxidante "eficaz", especialmente para una administración al Hombre, es difícil. Es también de notar que a menudo es avanzado un beneficio *in vitro*, pero raramente confirmado claramente *in vivo* (Bickers D.R. y al., J. Invest. Dermatol. (2006), vol. 126, pp. 2565-2575).

En efecto, además de la complejidad estructural multi-capas de la piel humana, y en consecuencia a un estrés oxidativo expresándose diferentemente, la sustancia antioxidante anteriormente evocada debe combinar:

- 50
- una eficacia con respecto al más amplio panel posible de especies oxigenadas reactivas EOR, en consecuencia poseer un amplio espectro de propiedades "anti-estrés",
  - una eficacia con respecto a los subproductos tóxicos del estrés oxidativo,
  - una reactividad al contacto de los EOR tal que no conduzca a la formación de productos de rearrreglos tóxicos,
  - una penetración cutánea (y por lo tanto una biodisponibilidad) favorable para poder alcanzar diferentes sitios tisulares cutáneos.

- por fin, una resistencia a los sistemas hidrolíticos de la piel (y por lo tanto una resistencia a su metabolización) quien sea garante de su actividad *in situ*.

La presente invención ha sido desarrollada en este contexto para satisfacer la demanda de productos o preparaciones que permitan oponerse lo más eficazmente posible a los efectos destructores del estrés oxidativo y de sus subproductos tóxicos, especialmente en las capas profundas de la piel.

La elección de la solicitante ha sido portada sobre los derivados del heterociclo tiazolidina, en particular sobre el 2-oxo-1,3-tiazolidina. Las razones de esta selección son múltiples:

En primer lugar, la estructura y las propiedades demostradas por el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina han constituido una respuesta ventajosa a los diferentes criterios enunciados anteriormente, ilustrados por:

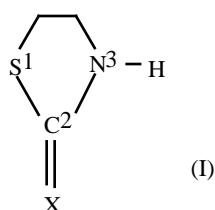
- una penetración cutánea completamente favorable, revelada por la obtención de un valor logarítmico de su coeficiente de partición ("Log P") comparable al conseguido para compuestos reconocidos permeantes a través del estrato córneo (Arct J. y al., SOFW-J. (2003), vol. 129, pp. 2-9) [test 1 a continuación],
- una actividad antioxidante notable con respecto a su capacidad a reaccionar sobre un amplio panel de moléculas EOR (constituidas por  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , y  $OH^{\cdot}$  producidos por medio del sistema oxidante: xantina oxidasa/hipoxantina) [test 2 a continuación],
- una capacidad insospechada a neutralizar la especie electrofílica altamente tóxica derivada de la peroxidación lipídica, el aldehído 4-hidroxinonenal o "4-HNE" [tests 3 y 4 a continuación].

En segundo lugar, y es un otro aspecto importante de la invención, cuando se hace un control del heterociclo 2-oxo-1,3-tiazolidina en un medio acuoso oxidante conteniendo los EOR, y en particular el peróxido de hidrógeno (uno de los EOR más tóxicos para los tejidos vivientes), la solicitante ha descubierto, a su asombro, a la mirada de una evolución casi-cuantitativa y de la ausencia de formas oxidadas intermedias, que este heterociclo engendraba fácilmente, desde su "colocación" bajo las condiciones oxidativas, el producto de oxidación último, estable, a saber la taurina [cf test 5 a continuación]. Un tal comportamiento es muy útil pues garantiza una ausencia total de toxicidad de los subproductos de reacción del 2-oxo-1,3-tiazolidina con el  $H_2O_2$ , pues la taurina es en efecto un aminoácido naturalmente presente en la piel. Por otro lado, el interés cutáneo de formar taurina se encuentra también hoy reforzado, pues es considerada desde hace poco como un osmolito esencial en la homeostasia de queratinocitos sometidos a un estrés, "UV-inducido" (Jancke G. y al., J. Invest. Dermatol. (2003), vol. 121, pp. 354-361).

El compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina, como tal, no es un producto nuevo. En el estado de la técnica, hay que relevar su síntesis a partir del "aminoetanetiolo y del difenil carbonato", según un procedimiento y condiciones particulares que concuerdan, de una manera general, con una reactividad química de tipo fosgeno con diversos policarbonatos cíclicos obtenidos del reciclaje de materia plástica (Hata S. *et al.*, J. Appl. Polym. Sci. (2003), vol. 90, pp. 2959-2968). En cambio, y a lo visto del arte anterior llegado al conocimiento de la solicitante, ninguna aplicación cosmética o dermatológica no es conocida específicamente para este heterociclo azufrado "2-oxo", ni mismo una o varias propiedades con respecto al estrés oxidativo para su análogo "tioneo" en posición 2 por el cual, por otro lado, la solicitante ha observado también la formación de taurina en condiciones oxidativas [cf test 5 a continuación].

Es a señalar sin embargo la existencia del ácido 2-oxotiazolidina-4-carboxílico. Este compuesto ha sido en cambio el objeto, él mismo, pero también ciertos derivados ésteres o amidas, de intereses diversos y numerosos en cosmética o dermatología: fotoprotección (patentes FR 2 877 004 y FR 2 854 160), lucha contra la caída del pelo (patente EP 0 656 201), agentes despigmentantes (patentes US nº 6.063.389 y US nº 6.007.827) o descamantes (patente FR 2 816 838), etc. A la lectura de su literatura referente a la protección de la piel de una manera general, no se ha relevado un beneficio cutáneo que a causa de una acción de estímulo de las defensas naturales de las células, y de manera particular de una acción estimulante sobre la síntesis intracelular del glutatión. Este compuesto no es, además, un precursor de taurina. Por fin, este compuesto es estructuralmente diferente del 2-oxo-1,3-tiazolidina, de modo que esta enseñanza no presagia de los efectos del 2-oxo-1,3-tiazolidina.

Así, según un primer aspecto, y en nombre de esta dimensión plurifuncional "anti-estrés" representada por el comportamiento del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina en un entorno pro-oxidante, tal como el de una piel sometida a un estrés oxidativo, la presente invención se extiende igualmente a una composición cosmética que comprende, en asociación con todo excipiente fisiológicamente compatible con la piel, y a título de ingrediente activo principal, el derivado de fórmula (I):



en la cual X representa un átomo de oxígeno o de azufre, el susodicho derivado o la susodicha composición siendo destinados a proteger la piel de todo estrés que engendra radicales libres o especies reactivas del oxígeno.

El compuesto preferido de fórmula (I) susodicha es tal que X representa un átomo de oxígeno.

5 Es retenido preferentemente que las composiciones susodicha son destinadas a proteger la piel contra un estrés en el cual, el origen es elegido entre las radiaciones ultravioletas, la contaminación atmosférica, el contacto con xenobióticos químicos o atmósferas ahumadas, y de manera particular las radiaciones ultravioletas. La presente invención mira a prevenir y a luchar contra los signos cutáneos que resultan de estos estreses, especialmente contra las diferentes manifestaciones vinculadas al envejecimiento de la piel. Se aplica particularmente al dominio de la fotoprotección, con respecto a:

- 10 - la implicación hoy demostrada del 4-hidroxinonenal o "4-HNE" en el apoptosis de células sometidas a los rayos UV-A (Yang Y. y al., J. Biol. Chem. (2003), vol.278, pp. 41380-41388), combinada a la eficacia notable, evocada antes, del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina a secuestrar este aldehído tóxico.
- 15 - la existencia reportada de un estrés "UV-A inducido" en la dermis de la piel y dañino a los constituyentes proteicos de la matriz extra-celular (Wondrak G.T. y al., J. Invest. Dermatol. (2003), vol. 121, pp. 578-586), combinado a la biodisponibilidad tópica del mismo compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina justamente en estas capas dérmicas, y además de sus características intrínsecas: ausencia de funciones químicas ionizables al pH fisiológico de la piel, no sensibilidad a las hidrolasas de la piel, bajo peso molecular
- la evaluación experimental hecha recientemente por la solicitante en la eficacia del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina frente a un estrés "UV-inducido" [test 6 a continuación]

20 De manera particular, la susodicha composición es destinada a proteger la piel de un estrés "UV-inducido", y el derivado de fórmula general (I) es tal que X representa un átomo de oxígeno.

Ventajosamente, la cantidad de dicho derivado de fórmula (I) en la composición susodicha es comprendida entre el 0,01 y el 10 % en peso con respecto al peso total de la composición, de preferencia entre el 0,05 y el 5% en peso, todavía mejor entre el 0,5% y el 5% en peso.

25 Puede citarse, como ejemplo de excipiente fisiológicamente compatible con la piel, un tensio-activo, un conservador, un cuerpo graso, un colorante, un emulsionante, un gelificante, un emoliente, un humectante, un pigmento, o todo otro coadyuvante habitualmente utilizado en cosmética.

30 Según un modo particular de la invención, para reforzar la actividad antioxidante o antirradicalar, la susodicha composición es susceptible de contener, además, otro elemento activo escogido entre los agentes antioxidantes, antirradicales y/o anti-contaminación corrientemente en el mercado, de manera tal que el efecto agregado intrínsecamente a las composiciones según la invención no sean alteradas por la adición considerada. Estos agentes antioxidantes, antirradicales o anti-contaminación corrientemente en el mercado pueden ser:

- vitaminas, tales como las vitaminas C, E, y D,
- 35 - enzimas, como superóxidos dismutasas, catalasas, y peroxidasas, de origen sintético, vegetal, animal, bacteriano o recombinante por ejemplo,
- compuestos fenólicos, tales como los polifenoles (epigallocatequina-3-galato) y especialmente los flavonoides ácido ferúlico, silimarina, genisteína, apigenina, resveratrol.

40 Siempre de manera facultativa, la susodicha composición puede asociar igualmente un filtro solar UV-A o B, o sus mezclas, de naturaleza orgánica (derivados de la benzofenona) o inorgánica (óxidos metálicos), o también un activo cosmético con efecto secundario, tal como un agente hidratante, un agente alivante, un agente pigmentante, un agente que estimula la síntesis de macromoléculas epidérmicas y dérmicas, y esto, siempre velando que el susodicho activo cosmético y su cantidad, estén presentes de manera tal que las propiedades de la composición según la invención no sean alteradas por la adición considerada.

45 Las composiciones según la invención son adaptadas a una administración por vía tópica cutánea, presentadas bajo todas las formas normalmente utilizadas para tal administración. De manera ventajosa, son formuladas bajo forma, por ejemplo, de emulsiones, crema, leche, geles, loción, etc.

A título de ilustración, es mencionado a continuación algunos ejemplos de formulación de composición cosmética según la invención, que contienen los heterociclos 2-oxo-1,3-tiazolidina o 2-tiono-1,3-tiazolidina precitados:

Formula A (crema)

50	2-oxo-1,3-tiazolidina	1 %
	Poliisobuteno hidrogenado	7 %

	Miristato de isobutilo	3 %
	Palmitato de cetilo	7 %
	Monoestearato de etileno glicol	5 %
	Laurato de sorbitán	2 %
5	Polisorbato 20	2 %
	Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida & aceite mineral)	0,3 %
	Fenoxietanol	0,5 %
	Agua	csp 100 %
	<u>Formula B (gel)</u>	
10	2-tiono-1,3-tiazolidina	0,5 %
	Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida & aceite mineral)	1,5 %
	Benzoato de sodio	0,2 %
	Acido sórbico	1 %
	1,3-butanodiol	10 %
15	Glicerina	5 %
	Soda	0,13 %
	Fenoxietanol	0,9 %
	Agua	csp 100 %

20 La invención es ilustrada a continuación, a título puramente indicativo por los siguientes tests evocados más altos en la descripción de la invención (tests 1 a 6). Hay también que señalar que los primeros resultados de estudios *in vivo* llevados a cabo en hombres son igualmente capaces de ilustrar la utilización de los derivados tiazolidinas a los fines de la presente invención.

**Test 1:** coeficiente de partición del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina

25 Las valores del coeficiente de partición n-octanol/agua (Log P) han sido conseguidos experimentalmente conforme con el protocolo descrito en la directriz n° 107 de la OCDE (adoptada el 27/7/1995) para las pruebas de productos químicos.

El log P del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención es comparado al conseguido para la cafeína y el etanol (tabla 1 a continuación).

Tabla 1

Compuesto	Log P
etanol	- 0,31
Cafeína	- 0,07
2-oxo-1,3-tiazolidina	- 0,27

30 El resultado conseguido para el 2-oxo-1,3-tiazolidina es comparable al obtenido para los compuestos reconocidos permeantes a través del estrato córneo.

**Test 2:** puesta en evidencia del efecto antioxidante del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina

a) medida de la actividad "secuestrante" del radical hidroxilo (OH°)

35 El método, descrito por Rehman A. *et al.* (British J. Pharmacol. (1997), vol. 122, pp. 1702-1706), es utilizado para la determinación de la constante de velocidad de "secuestación" del radical hidroxilo [Ks(OH°)], el compuesto 2-oxo-

1,3-tiazolidina según la invención es comparado a una molécula de referencia, la taurina.

Experimentalmente, la sustancia testada es disuelta en un medio tamponado a pH 7,4 al cual es añadido un medio generador de  $\text{OH}^\bullet$ . Después de una hora de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , la reacción es parada por medio del ácido tricloroacético. Después de la adición del revelador colorimétrico, el ácido tiobarbitúrico, se mide la absorbancia a 532 nm para diferentes concentraciones, luego se calcula el  $\text{Ks}(\text{OH}^\bullet)$  relativo a cada una de las sustancias. Los resultados son reportados en la tabla 2a a continuación.

Tabla 2a

Compuesto	$\text{Ks}(\text{OH}^\bullet)$ ( $109.\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )
taurina	5,32
2-oxo-1,3-tiazolidina	13,52

Los resultados, reúnen los valores medios obtenidos a partir de cinco experimentaciones independientes, subrayan una capacidad a "secuestrar" el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), para el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina, ampliamente muy superior al de la taurina, mismo superior al del ácido ascórbico (vitamina C) por el cual la literatura anuncia un  $\text{Ks}(\text{OH}^\bullet)$  de  $10,1 \text{ Giga}^{-1}.\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (Cabelli D.E., J. Phys. Chem. (1983), vol. 87, pp. 1809-1812).

*b) medida del poder antioxidante "global"*

El sistema de producción de EOR, descrito por Nowak D. y coll. (Biomed. Biochem. Acta (1991), vol. 50, pp. 265-272) y poniendo en juego el grupo xantina oxidasa/hipoxantina, es utilizado para la determinación del poder antioxidante "global." Éste es caracterizado por la suma de los efectos en contra del anión superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , del peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y del radical hidroxilo  $\text{OH}^\bullet$ , y es exprimido siguiendo el porcentaje de protección de una molécula "detectora", el desoxirribosa.

El compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención es comparado igualmente a la taurina. Experimentalmente, la sustancia testada es disuelta en un medio tamponado a pH 7,5, que contiene  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{CaCl}_2$ . Después de su incubación a  $37^\circ\text{C}$  en presencia del grupo xantina oxidasa/hipoxantina, de EDTA, y de desoxirribosa, la reacción es parada por medio del ácido tricloroacético. Después de la adición del ácido tiobarbitúrico, es realizado una medida de densidad óptica a 532 nm, expresada luego en porcentaje de protección de la desoxirribosa (después de comparación con un control). Los resultados son reportados en la tabla 2b a continuación:

Tabla 2b

Compuesto	% de protección
taurina (20 mM)	19
2-oxo-1,3-tiazolidina (10 mM)	19
2-oxo-1,3-tiazolidina (20 mM)	25

Para el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina, es observado así una protección de la desoxirribosa superior a los conseguidos con la taurina (protección idéntica para una concentración dos veces menor).

**Test 3:** puesta en evidencia de la capacidad del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina a neutralizar la citotoxicidad del 4-hidroxinonenal.

El estudio experimental ha sido realizado sobre una línea celular de fibroblastos adherentes de hámster llamada "V79", mantenidos en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$ , luego sembrados en las placas 96 pozos a razón de  $0,5.10^4$  células por pozo. Las células son sometidas entonces a un estado de estrés, tóxico, con el reemplazo del medio de cultivo por un medio que contiene 4-hidroxinonenal o (4-HNE) a la concentración de 6 ppm, medio al cual es añadido simultáneamente el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención.

La viabilidad celular de los fibroblastos es medida por el método de incorporación al bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (o "MTT"). Los resultados, reúnen los valores medios conseguidos a partir de tres experimentaciones independientes, son presentados en la tabla 3 a continuación, en comparación con aquéllos obtenidos para la N-acetil-cisteína a 2 mM escogida como molécula de referencia positiva (restauración total de una viabilidad celular respecto a un control y de células no objeto a un estrés 4-HNE).

Tabla 3

	% viabilidad celular
Control/referencia	100
HNE 6 ppm	34
N-acetil-cisteína 2 mM	126
2-oxo-1,3-tiazolidina 0,1 mM	40
2-oxo-1,3-tiazolidina 1 mM	58
2-oxo-1,3-tiazolidina 2,5 mM	100

Los resultados de la tabla 3 subrayan, para el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención, una viabilidad celular dosis-dependiente, lo mismo que una capacidad idéntica a aquella de la referencia para proteger las células sometidas a un estrés 4-HNE.

**Test 4:** puesta en evidencia del efecto anti-clastogénico del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina en presencia de una concentración genotóxica de 4-hidroxinonenal.

El estudio ha sido realizado según las condiciones experimentales (siembra) idénticas a las presentadas en el test 3 anteriormente, con una exposición de las células a un estado de "estrés 4-HNE" a la concentración genotóxica de 1 ppm, descrita (Eckel P.M., Molecular Aspects of Medicine (2003), vol. 24, pp. 161-165) como ocasionando cortes en el ADN celular y la formación de micronúcleos (efecto clastogénico).

El número de células con micronúcleos es contado después de la lectura de las láminas al microscopio de epifluorescencia, sobre 2000 células y después del marcaje con naranja de acridina (colorante del ADN).

Los resultados, reúnen los valores medios conseguidos a partir de dos experimentaciones independientes, son presentados en la tabla 4 a continuación, en comparación con aquéllos conseguidos para la N-acetil-cisteína a 2 mM escogida como molécula de referencia positiva (número de células con micronúcleos vecino del de "control" o referencia no expuesta).

Tabla 4

	Número de células con micronúcleos/2000 células
Control/referencia	19
stress-HNE 1 ppm	58
N-acetil-cisteína 2 mM	27
2-oxo-1,3-tiazolidina 5 mM	21

Es observado así, para el compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención, una capacidad a prevenir la aparición de células con micronúcleos inducidos por un estrés genotóxico 4-HNE.

**Test 5:** puesta en evidencia "en tubo de ensayo" de la formación de taurina al contacto de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A una solución acuosa al 10% en derivados 2-oxo-1,3-tiazolidina o 2-tiono-1,3-tiazolidina según la invención, tamponada a pH 7,4 y a 37° C, es añadido 4 equivalentes de una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), es decir un pequeño exceso de especies oxidantes con respecto a los 3 equivalentes teóricos necesarios para una conversión completa (el 100%) en taurina. La evolución de la mezcla reaccional es seguida entonces por cromatografía en fase líquida (HPLC provisto de un detector UV a 254 nm) conduciendo a los resultados expuestos en la tabla 5 y a la puesta en evidencia de una formación casi-exclusiva y cuantitativa de taurina después de reacción de los derivados 2-oxo-1,3-tiazolidina o 2-tiono-1,3-tiazolidina al contacto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabla 5

	taurina (% formación a partir del 2-oxo-1,3-tiazolidina,	taurina (% formación a partir del 2-tiono-1,3-tiazolidina,
3h	38	30
7h	56	50
24h	82	77
48h	93	89

5 **Test 6:** Puesta en evidencia de la capacidad del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina en presencia de un estrés "UV-A inducido".

El estudio fue realizado según las condiciones experimentales (siembras) idénticas a aquellas presentadas en los tests 3 y 4 anteriormente, pero con una exposición de las células V79 a los rayos UV ( $\lambda$  315-400 nm) a una dosis moderada de 5 J.cm<sup>-2</sup> (un estrés "UV-A inducido").

10 La formación de EOR intracelular fue medida con una sonda fluorescente permeante "CMDCF" derivada de la fluoresceína (10  $\mu$ m, 15 minutos de incubación).

Los porcentajes de células CMDCF dichas "positivas" (células con formación intracelular de ROS) son presentadas en la tabla 6 adjunta, en comparación con las células no irradiadas, y con células tratadas con la N-acetil-cisteína (testigo de referencia) y varias concentraciones del compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina.

Tabla 6

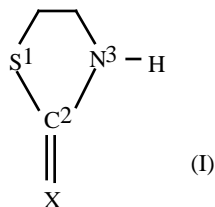
	% células CMDCF positivas
células no irradiadas	3
células irradiadas	30
células irradiadas + N-acetil-cisteína 5 mM	4
células irradiadas + 2-oxo-1,3-tiazolidina 0,625 mM	24,7
células irradiadas + 2-oxo-1,3-tiazolidina 1,25 mM	15,3
células irradiadas + 2-oxo-1,3-tiazolidina 2,5 mM	12
células irradiadas + 2-oxo-1,3-tiazolidina 5 mM	7,3

15 El compuesto 2-oxo-1,3-tiazolidina según la invención demuestra una capacidad dosis-dependiente para proteger las células sometidas a un estrés "UV-A inducido", similar a la molécula de la referencia.



## REVINDICACIONES

1. Composición cosmética destinada a proteger la piel de todo estrés que engendra radicales libres o especies reactivas del oxígeno, conteniendo, en asociación con todo excipiente fisiológicamente compatible con la piel, y a título de ingrediente activo principal, un derivado de fórmula (I):



- 5
- en la cual X representa un átomo de oxígeno o de azufre.
2. Composición cosmética según la reivindicación 1, caracterizada porque el derivado de fórmula (I) es tal que X representa un átomo de oxígeno.
- 10 3. Composición cosmética según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el derivado de fórmula (I) está presente en una cantidad comprendida entre el 0,01 y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición.
4. Composición cosmética según la reivindicación 3, caracterizada porque la cantidad de dicho compuesto de fórmula (I) está comprendida entre el 0,05 y el 5% en peso con respecto al peso total de la composición.
- 15 5. Composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque contiene, además, otro elemento activo antioxidante, antirradicalario o anti-contaminante.
6. Composición cosmética según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho otro elemento activo es elegido entre las vitaminas, las enzimas, los compuestos fenólicos.
- 20 7. Composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque puede asociar un filtro solar UV-A o B, orgánico o inorgánico, o sus mezclas, o además un activo cosmético con efecto secundario, tal como un agente hidratante, un agente alivante, un agente pigmentante, un agente que estimula la síntesis de macromoléculas epidérmicas y dérmicas.
8. Composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque se formula en forma de emulsiones, crema, leche, geles, loción.
- 25 9. Composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque el estrés es elegido entre las radiaciones ultravioletas, la contaminación atmosférica, el contacto con xenobióticos químicos o con atmósferas ahumadas.
10. Composición cosmética según la reivindicación 9, caracterizada porque el estrés es las radiaciones ultravioletas.