

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 355**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C07D 211/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2006 E 09171897 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2138157**

54 Título: **Síntesis de un nuevo nitróxido antioxidante y métodos de uso en composiciones cosméticas y dermatológicas**

30 Prioridad:

15.12.2005 US 750584 P

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

10.09.2013

73 Titular/es:

**JARROW FORMULAS, INC. (100.0%)
1824 SOUTH ROBERTSON BLVD.
LOS ANGELES, CA 90035-4317, US**

72 Inventor/es:

**DAMIANI, ELISABETTA y
ASTOLFI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 422 355 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).

SÍNTESIS DE UN NUEVO NITRÓXIDO ANTIOXIDANTE Y MÉTODOS DE USO EN COMPOSICIONES COSMÉTICAS Y DERMATOLÓGICAS

Descripción

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención se refiere a compuestos innovadores antioxidantes fotoabsorbentes, métodos de síntesis de compuestos antioxidantes fotoabsorbentes y su uso en composiciones dermatológicas y/o cosméticas. Además, la presente invención se refiere al uso de metoxicinamato y
10 compuestos de nitróxido para la preparación de una composición para el tratamiento cosmético y/o dermatológico de la piel.

ANTECEDENTES

[0002] Se sabe que entre las formas de cáncer más comunes que afectan a humanos el cáncer de piel es sin duda uno de los más
15 extendidos. En particular, en los últimos veinte años la incidencia de cáncer de piel ha aumentado de forma remarcable. Parte de este incremento se debe al hecho de que para una persona típica ha aumentado la cantidad de tiempo de exposición a la radiación solar, tanto natural como
20 artificial. Además, la radiación solar está menos filtrada debido a la reducción concomitante de la capa de ozono. La sobreexposición de la piel a la radiación solar ha contribuido a un aumento del uso de protectores solares. Sin embargo, las propias cremas solares pueden estar sometidas a reacciones
25 fotolíticas inducidas por la luz, dando como resultado la formación de especies de radicales libres que son dañinas para la salud de la piel.

[0003] Se sabe que el componente ultravioleta de la radiación solar (rayos UV) juega un papel principal en la inducción de
30 los tumores de la piel, ya que estos rayos UV atacan las células directamente, dañando su ADN. Debido a la distribución espectral del UV solar, ahora se cree que el componente UVA (380-315 nm) de la luz solar es la causa principal del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis y es mucho más
35 eficaz que UVB (315-280 nm) induciendo daño peroxidativo. Por consiguiente, la mayoría de productos cosméticos actuales incluyen filtros UVA en sus formulaciones junto con filtros UVB y separadamente incluyen antioxidantes como vitamina E

para desactivar los radicales libres (p. ej., especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species), como superóxido, hidroxilo, óxido nítrico y peroxilo) generados durante la exposición a UVA.

5 **[0004]** Los protectores solares modernos deben proporcionar y mantener su absorbancia UV inicial y por lo tanto su protección de la piel, a lo largo de todo el periodo de exposición a la luz solar. Sin embargo, no todos los filtros UVA y UVB son lo suficientemente fotoestables. Por ejemplo,
10 ensayos in vitro simples muestran que hay una disminución en la absorbancia espectral de los filtros UV usados más habitualmente y que esto se correlaciona en gran medida con el incremento de la peroxidación de lípidos inducida por UVA. La magnitud de este efecto está afectada por el absorbente UV
15 específico usado, tanto si se usa solo como en combinación y si hay otros antioxidantes presentes.

[0005] La adición de agentes antioxidantes en protectores solares es conocida y en muchos casos incluye categorías de compuestos como vitamina E y ácido ascórbico. Otros compuestos
20 antioxidantes que se han usado con esta finalidad incluyen la clase de los radicales mono-nitróxido cíclicos, como por ejemplo 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPO) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-3-hidroxi-1-oxilo (TEMPOL). Ambos son nitróxidos alifáticos cíclicos. Otra clase de antioxidantes
25 incluye el nitróxido bis(2,2,6,6-tetrametil-1-oxil-piperidin-4-il)sebacato, que parece ser un fotoantioxidante más eficaz que la vitamina E.

[0006] Damiani y col. (Free Radical Biology and Medicine, Vol. 26, n° 7/8, 1999, páginas 809-816) revela la prevención de
30 daños de ciertos nitróxidos en presencia de protectores solares dibenzoilmetano.

[0007] Damiani y col. (Free Radical Research, Vol. 40, n° 5, 2006, páginas 485-494) revela un compuesto que tiene una fracción nitróxido de piperidina y una fracción metoxicinamato
35 unidas covalentemente.

[0008] Muchas cremas cosméticas que contienen filtros solares o cremas cosméticas que están disponibles actualmente contienen una pluralidad de agentes antioxidantes y

coformulantes. Sin embargo, el uso de agentes antioxidantes en una crema que contiene filtros solares o en una crema con finalidades dermatológicas y/o cosméticas tiene varias complicaciones y desventajas.

5 **[0009]** Una primera desventaja es que una vez aplicados en la piel, algunos compuestos incluyendo antioxidantes pueden sufrir ellos mismos la degradación debida a los rayos solares, con la posterior formación de especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres formados son ellos mismos dañinos para la
10 piel, las células y los componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, los radicales libres formados pueden reaccionar químicamente con otros radicales libres y coformulantes presentes en la crema solar.

[0010] Otra desventaja de los productos existentes es debida
15 al hecho de que cuando aumenta el número de compuestos o agentes antioxidantes usados en una crema cosmética, se vuelve cada vez más difícil preparar un producto en el cual las características beneficiosas del compuesto sean estables a lo largo del tiempo.

20 **[0011]** Otra desventaja más de los productos existentes es debida al hecho de que al aumentar el número de compuestos o agentes antioxidantes usados en una crema cosmética, se vuelve cada vez más difícil preparar un producto con características de elevada compatibilidad en relación con los diferentes tipos
25 de piel sobre el que se va a aplicar. De hecho, puede suceder que la aplicación tópica de una crema que contiene un filtro solar, o una crema cosmética, induzca ciertas reacciones alérgicas debidas a la composición química específica del producto.

30 **[0012]** Además, otra desventaja es que al aumentar el número de agentes antioxidantes activos usados en la preparación de una crema que contiene un filtro solar, o una crema cosmética, aumenta el coste del producto final.

[0013] Por consiguiente, sería altamente deseable disponer de
35 un nuevo antioxidante o una clase de compuestos antioxidantes que supere estas desventajas de los productos y métodos utilizados actualmente. En particular, sería deseable poder disponer de un único compuesto protector solar hipoalergénico

que posea alta eficacia en la actividad de bloqueo de UV y actividad antioxidante, pero que también sea estable a lo largo del tiempo.

5 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0014] La presente invención se refiere a una composición química fotoprotectora que comprende una fracción metoxicinamato absorbente de la energía UV, unida covalentemente a una fracción nitróxido de piperidina
10 secuestrante de especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual es útil para la preparación de una composición dermatológica o cosmética para el tratamiento de la piel. La composición y los métodos de la presente invención son adecuados para mejorar la eficacia de formulaciones cosméticas fotoprotectoras. Por
15 consiguiente, es objeto de la presente invención proporcionar un compuesto para el uso en aplicaciones cosméticas o dermatológicas que demuestra una estabilidad mejorada y una eficacia mejorada en la absorción de UV y el secuestro de ROS. Como tal, en un aspecto, la presente invención se refiere a
20 una composición química innovadora que sorprendente e inesperadamente es eficaz en la prevención del daño fotooxidativo inducido por UV. En una realización preferida, la invención es un compuesto químico innovador que comprende una combinación de un metoxicinamato unido a un nitróxido
25 cíclico que muestra una actividad sinérgica inesperada (es decir, mayor que la actividad de la mezcla de los respectivos compuestos) con respecto al bloqueo de UV y secuestro de ROS.

[0015] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para sintetizar un compuesto que demuestra estabilidad
30 mejorada, mayor absorción de UV y mejor eficacia secuestrando ROS. Un aspecto de este objeto de la invención se refiere a un método de síntesis de un compuesto, el cual demuestra estabilidad mejorada, absorción de UV y actividad secuestrante de ROS, que se puede usar en aplicaciones cosméticas o
35 dermatológicas para el tratamiento de la piel. En ciertas realizaciones preferidas los métodos comprenden la unión covalente de una fracción absorbente de UV, por ejemplo OMC (Figura 1) a una fracción de nitróxido cíclico o fenólico

capaz de secuestrar radicales libres. En ciertos aspectos, los métodos de la presente invención comprenden una etapa en la que un grupo alquilo se elimina de un metoxicinamato y es sustituido por una fracción de nitróxido cíclico o fenólico que secuestra ROS.

5 **[0016]** Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de uso de la composición en una aplicación cosmética o dermatológica para el tratamiento de la piel, por ejemplo, para tratar o prevenir el daño
10 fotooxidativo en la piel, las células o componentes celulares, por ejemplo, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de un organismo, por ejemplo un ser humano. Un aspecto de este objeto comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición de la invención en una forma farmacéuticamente
15 aceptable a un organismo que lo necesita.

[0017] En ciertos aspectos la composición de la invención se puede administrar junto con cualquier carga, excipiente y/o ingrediente biológicamente activo o inactivo farmacéuticamente aceptable. La administración de la composición de la invención
20 puede hacerse mediante cualquier forma de dosificación adecuada, incluyendo por ejemplo, cremas, lociones, polvos, sprays, geles, pomadas, una suspensión o emulsión, espumas, aerosoles, o cualquiera de la variedad de dispositivos transdérmicos para el uso en la administración en continuo de
25 fármacos activos sistemáticamente por absorción a través de la piel.

[0018] Los excipientes farmacéuticamente apropiados incluyen, por ejemplo, aquellos que mejoran o prolongan la liberación, biodisponibilidad, absorción o captación, vida útil,
30 estabilidad, solubilidad, eficacia, viscosidad, que reducen la toxicidad, mejoran el gusto o el olor, y combinaciones de los mismos. En cualquiera de las realizaciones preferidas, la composición de la invención puede incluir opcionalmente, por ejemplo, agentes de composición farmacéutica, como uno o
35 varios agentes espesantes como aceites de parafina, ésteres como miristato de isopropilo, etanol, aceites de silicona y aceites vegetales, agentes espesantes celulósicos, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa,

hidroxipropilmetilcelulosa, povidona, ácidos poliacrílicos como carbopol, Sepigel® (poliacrilamida/isoparafina/lauril éter 7), las series Gantrez® de copolímeros polimetil vinil éter/anhídrido maleico, como el éster butílico del copolímero PVM/MA Gantrez® A-425 y cualquier agente espesante conocido por la técnica que tenga buena compatibilidad con líquidos volátiles; un conservante, por ejemplo, ésteres de hidroxibenzoato; un glicol; agua; un surfactante, como alcoholes grasos etoxilados, monoestearato de glicerol, ésteres de fosfato, y otros emulsionantes y surfactantes usados habitualmente; un potenciador de la penetración dérmica, por ejemplo, salicilato de octilo o DMSO; un agente reductor; un emulsionante; un disolvente orgánico, por ejemplo, un éter, un éster, un alcohol o un alcano; un triglicérido; un lípido o fosfolípido; un aceite; una grasa; un carbohidrato o sacárido; una proteína; un nucleótido; un liposoma; una sal o mineral; un extracto de planta, y similares. Además, también se contempla que en cualquiera de las realizaciones preferidas la composición de la invención se pueda combinar opcionalmente con al menos otro principio activo que incluye otro compuesto absorbente de UV, un fármaco, por ejemplo una hormona, un compuesto antimicrobiano, un antiinflamatorio, un antioxidante, y similares.

[0019] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de síntesis de una composición cosmética y/o dermatológica que incluye al menos una fracción absorbente de UV y al menos una fracción capaz de secuestrar o reducir especies reactivas de radicales libres, por ejemplo ROS como superóxido, hidroxilo, óxido nítrico, peroxilo y combinaciones de las mismas.

[0020] Los expertos en la materia entenderán estas y otras ventajas y objetos de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos de las realizaciones preferidas.

35

DESCRIPCIÓN DE LAS IMÁGENES DE LA INVENCION

[0021] Figura 1. Fórmula química de los compuestos 2-etilhexil-4-metoxicinamato (OMC); 2,2,6,6-tetrametil-

piperidin-3-hidroxi-1-oxilo (TEMPOL); 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxilo (MC-NO). *ESQUEMA 1*: Ejemplo del método de una realización preferida para la generación del compuesto innovador absorbente de UV y
5 secuestrante de ROS de la invención.

[0022] Figura 2. Espectro de absorción de compuestos 50 μM en acetonitrilo. Como se puede observar, MC-NO tiene el mismo perfil espectral y coeficiente de extinción que OMC.

[0023] Figura 3. Espectro de absorción de compuestos 100 μM
10 antes (líneas gruesas) y después (líneas delgadas) de la exposición a 275 KJ/m^2 UVA. Véase la Descripción Detallada para los detalles experimentales.

[0024] Figura 4. Absorbancia de TBARS determinada en liposomas multilamelares de PC (3,5 mM) en PBS, EDTA 0,1 mM, tras
15 exposición a 275 KJ/m^2 UVA. Barra blanca = sin exposición UVA, barra negra = con exposición UVA, barras restantes = exposición UVA en presencia de compuestos 100 μM y varias combinaciones a la concentración anteriormente mencionada.

[0025] Figura 5. Absorbancia de TBARS determinada en liposomas multilamelares de PC (3,5 mM) en PBS, EDTA 0,1 mM, tras
20 exposición a 275 KJ/m^2 UVA. Barra blanca = sin exposición UVA, barra negra = con exposición UVA, barras restantes = exposición UVA en presencia de compuestos 100 μM y varias combinaciones a la concentración anteriormente mencionada.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0026] La composición de la presente invención comprende un compuesto eficaz para la absorción de energía UV y el secuestro de especies reactivas de oxígeno para la prevención
30 del daño fotooxidativo inducido por UV a la piel, las células, los componentes celulares, por ejemplo, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Sorprendentemente, el compuesto antioxidante-absorbente de UV único es más eficaz en la reducción de los efectos
35 perjudiciales de la radiación UV y los radicales libres del oxígeno que sus componentes respectivos en una mezcla simple.

[0027] La invención comprende una combinación de un compuesto absorbente de UV, por ejemplo, 2-etilhexil-4-metoxicinamato (OMC) y un compuesto antioxidante, por ejemplo, TEMPOL (4-hidroxi TEMPO) (Esquema 1; Figura 1). La composición
5 resultante de la invención, 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxil (MC-NO), mantiene el grupo 4-metoxicinamato responsable de la capacidad absorbente de UV, mientras que el grupo 2-etilhexilo responsable de su viscosidad ha sido sustituido por un nitróxido de piperidina,
10 el cual tiene propiedades secuestrantes de radicales libres. El nuevo compuesto puede ser considerado un nitróxido absorbente de UV: un protector solar antioxidante innovador.

[0028] El Esquema 1 resume una realización de los métodos de la invención para la síntesis del antioxidante absorbente de
15 UV. En resumen, el método comprende las etapas de proporcionar una cantidad adecuada de un metoxicinamato, disolverlo en metanol en presencia de una cantidad catalítica de monohidrato de ácido p-toluensulfónico. El metoximetilcinamato resultante se disuelve con cantidades estequiométricas de un nitróxido,
20 por ejemplo, TEMPOL, en tolueno con una solución metanólica (8%) de metóxido sódico. El producto resultante comprende una fracción metoxicinamato absorbente de UV y una fracción nitróxido antioxidante, la cual, como se ha demostrado aquí, muestra estabilidad mejorada y mayor eficacia absorbiendo UV y
25 secuestrando ROS.

[0029] En cualquiera de las realizaciones preferidas la composición de la invención se puede administrar en cualquier forma apropiada, junto con cualquier soporte farmacéuticamente aceptable, excipientes u otros ingredientes biológicamente
30 activos o inactivos. Las formas de dosificación apropiadas incluyen, por ejemplo, cremas, lociones, polvos, sprays, geles, pomadas, suspensiones o emulsiones, espumas, aerosoles o cualquier variedad de dispositivos transdérmicos para el uso en la administración en continuo de agentes activos por
35 absorción a través de la piel.

[0030] Los excipientes farmacéuticamente apropiados incluyen, por ejemplo, aquellos que mejoran o prolongan la liberación, biodisponibilidad, absorción o captación, vida útil,

estabilidad, solubilidad, eficacia, viscosidad, que reducen la toxicidad, mejoran el gusto o el olor, y combinaciones de los mismos. En cualquiera de las realizaciones preferidas, la composición de la invención puede incluir opcionalmente, por ejemplo, agentes de composición farmacéutica, como uno o varios agentes espesantes como aceites de parafina, ésteres como miristato de isopropilo, etanol, aceites de silicona y aceites vegetales, agentes espesantes celulósicos, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona, ácidos poliacrílicos como carbopol, Sepigel® (poliacrilamida/isoparafina/lauril éter 7), las series Gantrez® de copolímeros polimetil vinil éter/anhídrido maleico, como el éster butílico del copolímero PVM/MA Gantrez® A-425 y cualquier agente espesante conocido por la técnica que tenga buena compatibilidad con líquidos volátiles; un conservante, por ejemplo, ésteres de hidroxibenzoato; un glicol; agua; un surfactante, como alcoholes grasos etoxilados, monoestearato de glicerol, ésteres de fosfato, y otros emulsionantes y surfactantes usados habitualmente; un potenciador de la penetración dérmica, por ejemplo, salicilato de octilo; un agente reductor; un emulsionante; un disolvente orgánico, por ejemplo, un éter, un éster, un alcohol o un alcano; un triglicérido; un lípido o fosfolípido; un aceite; una grasa; un carbohidrato o sacárido; una proteína; un nucleótido; un liposoma; una sal o mineral; un extracto de planta, y similares.

[0031] En cualquiera de las realizaciones preferidas el compuesto de la invención se puede liberar en una composición cosmética o dermatológica en combinación con al menos otro principio activo, incluyendo otro compuesto absorbente de UV, un fármaco, por ejemplo una hormona, un agente antimicrobiano, un antiinflamatorio, un antioxidante y similares.

[0032] Se entiende que los ejemplos y realizaciones aquí descritos sólo tienen finalidad ilustrativa y los expertos en la materia sugerirán varias modificaciones o cambios a la luz de los mismos y se incluyen en el espíritu y ámbito de esta solicitud y se consideran dentro del alcance de las

reivindicaciones subordinadas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí y en las listas de referencias proporcionadas se incorporan por referencia en su totalidad para cualquier fin.

5 **[0033]** En los ejemplos de las realizaciones preferidas se describe la útil y ventajosa síntesis de un antioxidante absorbente de UV. Los siguientes ejemplos detallados se presentan a modo de ejemplo de las realizaciones preferidas y no deben considerarse limitantes de la invención. Por ejemplo,
10 pueden variar las cantidades relativas de los ingredientes, se pueden añadir ingredientes adicionales y/o se pueden sustituir ingredientes similares por uno o varios de los ingredientes descritos.

[0034] Las características y funcionalidades ventajosas adicionales asociadas con los sistemas, métodos y procesos de
15 la presente invención se ponen de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente.

Ejemplo #1

20

Síntesis de 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxilo (MC-NO).

[0035] El Esquema I muestra, de forma simplificada, un ejemplo
25 de una realización de los métodos de la invención para la síntesis de uno de los antioxidantes fotoabsorbentes de la invención. En este ejemplo, se disuelven 0,4 mmol de 2-etilhexil-4-metoxicinamato (OMC) en 10 ml de metanol en presencia de una cantidad catalíticas de monohidrato de ácido
30 p-toluensulfónico. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante aproximadamente 9 horas, se neutraliza con NaHCO_3 0,5 M, se lava con agua y se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Se obtiene un aceite blanco,
35 compuesto de p-metoximetilcinamato que cristaliza en reposo. En el ejemplo anterior, 4 mmol de OMC rinden aproximadamente 0,5 g (2,5 mmol) de p-metoximetilcinamato.

[0036] Después, cantidades estequiométricas de TEMPOL, por ejemplo 1 mmol (172 mg) y p-metoximetilcinamato (1 mmol, 204 mg) se disolvieron en 5 ml de tolueno junto con 0,1 ml de una solución metanólica (8%) de metóxido sódico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 horas y se lavó repetidamente con agua para eliminar el TEMPOL no reaccionado, parcialmente soluble en agua. La purificación cromatográfica (SiO₂, 80:20 éter de petróleo/éter dietílico) rindió aproximadamente 230 mg (70%) de MC-NO.

5
10 **[0037]** La Figura 2 muestra el perfil espectral de soluciones de acetonitrilo 50 µM de OMC y MC-NO. Como se puede observar, el nuevo compuesto tiene el mismo perfil espectral y coeficiente de extinción que OMC.

[0038] La Figura 3 muestra el espectro de MC-NO y OMC antes y después de la exposición a 275 kJ/m² UVA en tampón y tras extracción con disolvente. La razón de usar tampón ha sido mantener el mismo medio que los experimentos de peroxidación, de manera que las comparaciones entre los experimentos de absorción óptica y de peroxidación de lípidos puedan ser significativas.

15
20 **[0039]** Como se puede observar, hay una gran disminución en la absorción espectral para OMC tras la exposición a UV. De hecho, este filtro UVB ha demostrado ser sensible a la luz y se tiene que informar de una reducción en la eficacia de absorción de UV tras la exposición a la luz, lo que resulta de la fotoisomerización cis/trans y posiblemente la cicloadición [2+2] a longitudes de onda de aproximadamente 300 nm. El isómero cis resultante absorbe a la misma longitud de onda, pero tiene una extinción reducida, dando así valores espectrométricos inferiores que pueden explicar el resultado observado aquí. Sorprendentemente, como se puede observar en la Figura 3, la disminución en la absorbancia de MC-NO no es tan remarcable como la de OMC solo, implicando que el nuevo compuesto mantiene gran parte de su absorbancia original tras la irradiación con UVA. Parece que la presencia del grupo nitróxido, de forma inesperada pero ventajosa, estabiliza el protector solar.

25
30
35

[0040] En el ensayo descrito, los presentes inventores investigaron las propiedades espectrales de un nuevo protector solar antioxidante, su capacidad de prevenir la generación de ROS inducida por UVA, medida como daño fotooxidativo reducido en lípidos y su efecto en la presencia del filtro UVA común, Parsol 1789.

[0041] Los resultados en la peroxidación de lípidos inducida por UVA se obtuvieron evaluando el grado de formación de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), que se forman principalmente de la reacción de productos de descomposición de peróxidos de lípidos, principalmente malondialdehído (MDA) con TBA (ácido tiobarbitúrico). En muchos casos MDA es el aldehído individual más abundante cuya formación se cree que está involucrada en la formación de peróxidos cíclicos y endoperóxidos que sufren fragmentación durante la peroxidación de lípidos. Muchos otros compuestos (p. ej., desoxirribosa, metionina, prolina, adenosina, ADN), bajo las condiciones apropiadas forman también complejos de TBA rosas, aunque en nuestro sistema liposomal aislado las TBARS pueden derivar sólo de la descomposición de los peróxidos formados durante la peroxidación de PC.

[0042] Se sabe que, comparado con UVB, UVA genera más estrés oxidativo y a los niveles encontrados en la luz solar, es diez veces más eficaz que UVB causando la peroxidación de lípidos que conduce al daño en la membrana plasmática. Por consiguiente, los efectos de MC-NO, OMC, TEMPOL y los dos últimos combinados en este evento oxidativo se han estudiado *in vitro* usando liposomas como modelos de membrana. La extensión del proceso oxidativo se determinó mediante el método popular de evaluación de productos de descomposición aldehídicos (TBARS) producidos durante la peroxidación de lípidos que absorben a 535 nm, usando el ensayo del TBA. La Figura 4 muestra el nivel de absorbancia de TBARS medido en suspensiones liposomiales antes y después de la exposición a 275 kJ/m² UVA en ausencia y presencia de los compuestos ensayados.

[0043] UVA induce el triple de incremento de peroxidación de lípidos en este sistema experimental. OMC parece proteger la peroxidación de lípidos inducida por UVA aunque no absorbe en UVA, excepto una fracción muy pequeña entre 320 y 330 nm. Su comportamiento espectral (Figura 3) muestra que hay una reducción de su absorbancia que no implica necesariamente fotoinestabilidad. OMC sufre isomerización cis/trans que se puede considerar un modo muy eficaz de dispersión de la energía absorbida y puede explicar la protección aquí observada: parte de la energía UVA es atenuada por OMC, de modo que se oxidan menos lípidos. La presencia de TEMPOL solo, inhibe la peroxidación de lípidos inducida por UVA en casi un 60%. Esto no se debe a su capacidad de filtración, ya que no absorbe en el intervalo UVA, sino más bien a su capacidad de reaccionar con ROS inducidas por la exposición UVA. Con la combinación OMC/TEMPOL, la reducción en el nivel de TBARS es la misma que la observada con TEMPOL. Sin embargo, en las muestras que contienen el nuevo compuesto MC-NO, el nivel de peroxidación de lípidos se reduce enormemente, casi a niveles control (control no iluminado) y esto puede deberse al hecho de que el compuesto es más fotoestable, como se observa en la Figura 2, por consiguiente se potenciará su capacidad protectora, además del hecho de que secuestra radicales libres inducidos por UVA. Es significativo el hecho de que MC-NO 100 μM es más eficaz que la combinación de OMC 100 μM con TEMPOL 100 μM .

[0044] Como el espectro de protección frente a UV de una formulación de protector solar se obtiene normalmente mediante una mezcla de filtros UV, es importante la compatibilidad entre diferentes filtros UV. Por tanto, un estudio similar al descrito anteriormente se llevó a cabo utilizando el filtro UVA más común presente en el mercado, 4-terc-butyl-4'-metoxidibenzoilmetano (conocido comercialmente como Parsol 1789 o Avobenzona), el cual tiene una elevada capacidad de absorción en casi todo el intervalo UVA. Sin embargo, este compuesto tiene un inconveniente importante, porque produce radicales libres cuando se activa por UVA, lo que conduce a una reducción en el poder fotoprotector y a un aumento del

potencial de dañar biológicamente moléculas relevantes, como proteínas, ADN plasmídico y más recientemente, queratinocitos de cultivo. Por tanto, la fotodescomposición de los protectores solares puede afectar a su protección frente al
5 daño en la piel inducido por UV, ya que su descomposición reduce la capacidad de absorción de UVA, dando como resultado un incremento del daño directo en la piel inducido por UVA. Como se puede observar en la Figura 5, la presencia de Parsol 1789 conduce a un aumento significativo en el nivel de
10 absorbancia en el nivel de absorbancia de TBARS comparado con el control iluminado, y este resultado confirma una vez más que los radicales libres se producen durante la iluminación con UVA de este filtro, lo que contribuye a la exacerbación de la reacción en cadena de los radicales libres de la
15 peroxidación de lípidos. En los liposomas que contienen Parsol/OMC no hubo una diferencia significativa en los niveles de peroxidación de lípidos con respecto a Parsol solo.

[0045] Con la combinación Parsol/TEMPOL se reduce ligeramente el nivel de peroxidación comparado con Parsol 1789 solo, sin
20 embargo, el nivel de TBARS alcanzado es mayor comparado con cuando TEMPOL está presente solo (Figura 4). Esto significa posiblemente que se producen más radicales cuando está presente Parsol, conduciendo a más lípidos que se oxidan, de modo que TEMPOL tiene que secuestrar no sólo los radicales
25 generados por la exposición a UVA, sino también los inducidos por la fotodescomposición de Parsol 1789. El resultado más sorprendente es el que se obtiene con la combinación Parsol/MC-NO. La presencia de 100 μM del nuevo compuesto es capaz de reducir enormemente la peroxidación de lípidos a
30 niveles casi del control, cuando está presente 100 μM del filtro UVA Parsol 1789. Se cree que este resultado se debe a las propiedades de protector solar antioxidante del nuevo compuesto.

[0046] El daño inmediato e importante infligido por la luz UVA
35 a las células se produce a partir de los radicales libres y otras especies oxidativas que también pueden ser responsables directa o indirectamente de la reacción eritematogena. Es útil entender los efectos de los absorbentes UVA/UVB y

antioxidantes al nivel de las ROS inducidas por UV, generadas bajo la exposición UVA y en luz solar natural, para comprender la eficacia de las formulaciones cosméticas para el cuidado de la piel y puede conducir a una mejora de la fotoprotección. Esto es especialmente importante, considerando los numerosos informes en la bibliografía que muestran que los espectros de absorción UV de los agentes protectores solares después de la irradiación UVA cambian en muchos casos debido a fotoinestabilidad. Ni la combinación de varios filtros orgánicos ni la adición de filtros inorgánicos parece garantizar la fotoestabilidad. Una investigación reciente hecha por Haywood y col. (2003) indica también que los usuarios de protectores solares están poco protegidos contra la producción de radicales libres por UVA y los efectos dañinos de UVA.

CONCLUSIONES

[0047] El nuevo compuesto nitróxido absorbente de UVB conduce a una reducción significativa de la peroxidación de lípidos (Figura 4). En primer lugar, esto se debe a las excelentes propiedades secuestrantes de radicales de los radicales nitróxido. Éstos son un grupo de compuestos cuyos efectos protectores en una variedad de sistemas biológicos a nivel molecular, celular, orgánico y del cuerpo entero contra el estrés oxidativo han sido establecidos ampliamente. Las razones subyacentes de su éxito son que los nitróxidos son moduladores extremadamente eficaces de los procesos mediados por especies paramagnéticas (radicales y metales de transición), lo que los hace útiles para probar reacciones y procesos asociados con los radicales libres. En la presente descripción se muestra que estos compuestos también son extremadamente eficaces reduciendo el daño fotooxidativo, incluso en combinación con absorbentes de UV fotolábiles. Merece la pena recordar que los nitróxidos son derivados de fotoestabilizadores de aminas impedidas (HALs, por sus siglas en inglés de "hindered amine light stabilizers"). Estos HALs se utilizan ampliamente en polímeros para prevenir la fotooxidación y su efecto estabilizador se atribuye a la

actividad del radical nitróxido derivada de la amina principal, como ha sido descrito previamente por nosotros. Bernstein y col. han demostrado también que el nitróxido Tempol permite protección frente a la radiación UV en un modelo de cultivo de fibroblastos murinos transgénicos de fotoenvejecimiento cutáneo, y recientemente también en fibroblastos dérmicos humanos. Por consiguiente, estos resultados apoyan la idea de que los antioxidantes, como los nitróxidos, pueden proporcionar un suplemento útil a la protección de los protectores solares frente a la fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento en la piel. Sin embargo, la novedad del nuevo nitróxido descrito aquí es que también tiene fuertes propiedades absorbentes de UVB.

[0048] Este compuesto es útil en particular porque la protección frente a radicales libres/UVA proporcionada actualmente por los filtros solares parece ser inadecuada. Existe la constante necesidad de composiciones cosméticas y dermatológicas mejoradas, que sean bloqueantes de UV y antioxidantes eficaces. Esto es especialmente cierto, dado el hecho de que la exposición humana a UV está aumentando debido a la destrucción de la capa de ozono y el uso de equipos de bronceado modernos (solárium y lámparas solares). El protector solar antioxidante innovador aquí descrito es ideal para reducir los problemas asociados con el daño fotoinducido en la piel.

Métodos detallados

[0049] L- α -fosfatidilcolina (P2772: tipo XI-E), TEMPOL, 2-etilhexil 4-metoxicinamato (octilmetoxicinamato; abreviado aquí como OMC), así como todos los otros reactivos y solventes fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co. (Milán, Italia). 4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (aquí abreviado como Parsol) fue obtenido en forma de Eusolex 9020 de Merck (Darmstadt, Alemania) y su identidad fue confirmada por RMN.

[0050] El espectro RMN ^1H se registró a temperatura ambiente en solución de CDCl_3 en un espectrómetro Varian Gemini 200 (δ en ppm referido a tetrametilsilano). Los espectros ESR se registraron en un espectrómetro Bruker EMX ESR equipado con

un contador de frecuencia XL Microondas, Modelo 3120 para la determinación de los factores g .

[0051] Como fuente de irradiación UVA se empleó una lámpara solar comercial, Philips Original Home Solarium (modelo HB 406/A; Philips, Groningen, Holanda) equipada con una lámpara HPA Philips libre de ozono de 400 vatios, UV tipo 3, que proporciona un flujo de 23 mW/cm² entre 300 y 400 nm, a una distancia de 20 cm. Siempre hay un funcionamiento previo de 15 min para permitir que se estabilice la potencia. La dosis de UVA se midió con un Radiómetro Power Pack UV (EIT Inc.).

[0052] RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, 25°C, tras reducción con fenilhidrazina): δ = 1,34 (s, 6H), 1,41 (s, 6H), 1,75-1,91 (m, 2H), 2,00-2,12 (m, 2H), 5,14-5,28 (m, 1H), 6,27 (d, 1H, J = 16 Hz), 6,91 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,48 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,63 (d, 1H, J = 16 Hz).

[0053] El espectro ESR se registró en acetato de etilo (Esquema 1): triplete con a_N = 15,47 G, g = 2,0062₈.

Espectros de absorción óptica

[0054] Se prepararon soluciones madre 10 mM de TEMPOL y los ingredientes fotoactivos en acetonitrilo. Después se añadieron cantidades apropiadas a tampón fosfato 5 mM, NaCl 0,9%, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 (acetonitrilo < 2% v/v) y se mezcló cuidadosamente hasta alcanzar concentraciones finales de 100 μ M en un volumen final de 3 ml. Las soluciones se transfirieron a una placa de 24 pocillos para cultivos celulares (Orange Scientific, Cambrex BioScience, Walkerville, Inc.) que se colocó sobre un bloque metálico introducido en hielo a una distancia de 20 cm de la fuente de luz. La placa multi-pocillo se cubrió con una lámina de cuarzo de 2 mm de grosor para evitar la evaporación. La dosis de UVA incidente recibida desde arriba por las muestras fue 275 kJ/m². Tras la iluminación se tomaron 2,4 ml de muestra de cada pocillo y se extrajeron con el mismo volumen de acetato de etilo. Se separó la fase orgánica y se registró su espectro de absorción en un espectrofotómetro UV Kontron 941. Para la muestras no iluminadas se siguió el mismo procedimiento durante el mismo periodo de tiempo, excepto en que las muestras fueron

expuestas a luz artificial directa de trabajo en el laboratorio.

5 *Peroxidación inducida por UVA de liposomas multilamelares de fosfatidilcolina (PC)*

[0055] Los liposomas multilamelares de PCse prepararon como sigue. Se añadió la cantidad deseada de PC de huevo en cloroformo a un tubo de ensayo de vidrio mantenido en un baño de hielo y el solvente se eliminó completamente bajo corriente de nitrógeno. Cuando se tuvieron que analizar los compuestos, bien solos o en combinación, se introdujo la cantidad deseada de una solución de acetonitrilo del/de los compuesto/s en otro tubo de ensayo de vidrio y tras la evaporación del solvente se añadió PC de huevo y se sometió al mismo procedimiento descrito anteriormente. Cada película de lípido preparada se dispersó en 1,5 ml de tampón fosfato 5 mM, NaCl 0,9%, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 y se agitaron en vórtex durante 2 min hasta obtener una suspensión opalescente, homogénea y blanca. La concentración final de PC en la dispersión liposomal multilamelar resultante fue 3,5 mM. Después cada muestra se alicuotó en 2 partes (de 700 µl cada una) y se transfirió a una placa multi-pocillo, cubierta con una lámina de cuarzo de 2 mm de grosor para evitar cualquier evaporación y se expuso a UVA como se describe arriba. La dosis de UVA incidente recibida desde arriba por las muestras fue 275 kJ/m². Al finalizar la exposición UVA se evaluó el grado de peroxidación de los lípidos usando un método modificado del ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).[14] En este procedimiento, 2 ml de TBA-TCA-HCl (TBA 0,375% p/v, TCA 15% p/v, HCl 0,2 M) se añadieron a 600 µl de muestra que contenía BHT 0,3 mM para prevenir la posible peroxidación de los liposomas durante el ensayo del TBA. Las muestras se calentaron durante 15 min a 95°C y a continuación se enfriaron y centrifugaron. Se midió la absorbancia a 535 nm del cromóforo rosa del sobrenadante formado al calentar.

[0056] Se sintetizó 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxilo (aquí abreviado MC-NO) a partir de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxilo (TEMPOL)

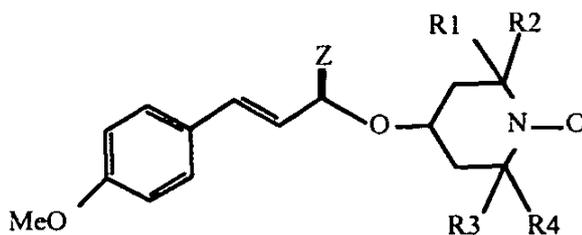
comercial y el éster metílico del ácido *p*-metoxicinámico. El procedimiento típico (Esquema 1) requiere que se calienten a reflujo los reactivos en tolueno durante 4-5 horas en presencia de metóxido sódico como catalizador, como indica la bibliografía (I. Dragutan, *Free Rad. Res. Comms.* 1990, 9, 379-382).

[0057] Se llevaron a cabo controles apropiados a lo largo de todos los experimentos descritos arriba y los resultados presentados son un promedio de al menos tres experimentos independientes, realizados cada uno por duplicado.

[0058] En los ejemplos de las realizaciones preferidas, se describe un método para la generación de un compuesto novedoso y útil para la absorción de UV y el secuestro de ROS. Las cantidades relativas de los ingredientes pueden variarse para optimizar los efectos deseados, se pueden añadir ingredientes adicionales y/o se pueden sustituir ingredientes similares por uno o varios de los ingredientes descritos. Las características y funcionalidades ventajosas adicionales asociadas con los sistemas, métodos y procesos de la presente invención resultarán obvias a partir de la descripción detallada.

REIVINDICACIONES

1. Una composición química antioxidante fotoprotectora que comprende una fracción metoxicinamato absorbente de la energía UV, unida covalentemente a una fracción nitróxido de piperidina secuestrante de especies reactivas de oxígeno (ROS).
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el metoxicinamato comprende 2-etilhexil-4-metoxicinamato.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el compuesto nitróxido comprende 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-hidroxi-1-oxilo (TEMPO).
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la fracción absorbente de UV comprende 2-etilhexil-4-metoxicinamato (OMC), la fracción secuestrante de ROS comprende 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-3-hidroxi-1-oxilo (TEMPOL) y el compuesto antioxidante fotoprotector generado según el método comprende 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxilo (MC-NO).
5. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición química tiene la fórmula general:

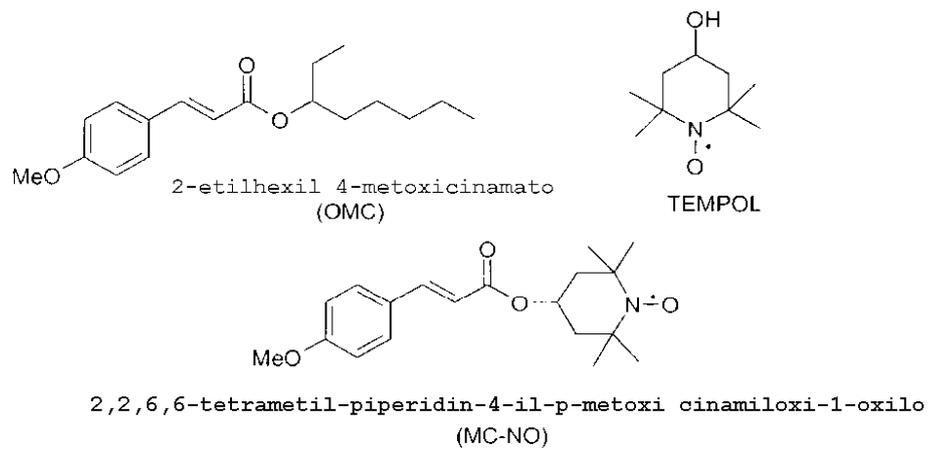


- en la que Z representa un oxígeno o un grupo NR_2 con R_2 representando un grupo alquilo, alcoxilo, arilo o fenilo; y R_1 , R_2 , R_3 y R_4 pueden ser idénticos o diferentes, representando independientemente entre sí un hidrógeno, un arilo, un alquilo, un alquenilo, un alcoxi o $-\text{COOR}_5$ con R_5 representando un alquilo, alquenilo, arilo, arilalquilo,

un fenilo o un resto benceno sustituido, un resto bencílico o bencílico sustituido, o un resto arílico.

- 5 6. Una composición dermatológica o cosmética antioxidante fotoprotectora que comprende la composición de la reivindicación 5 y un soporte.
- 10 7. Un método cosmético de tratamiento y/o protección de la piel, células, componentes celulares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos frente a los efectos dañinos de UV, ROS o ambos, que comprende: administración de una cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 6 a un individuo, siendo la composición eficaz para el tratamiento y/o protección de la piel,
- 15 células, componentes celulares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos frente a los efectos dañinos de UV, ROS o ambos.
- 20 8. La composición de la reivindicación 6, en la que el antioxidante fotoprotector comprende 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-p-metoxi cinamiloxi-1-oxilo (MC-NO).

Figura 1



ESQUEMA 1

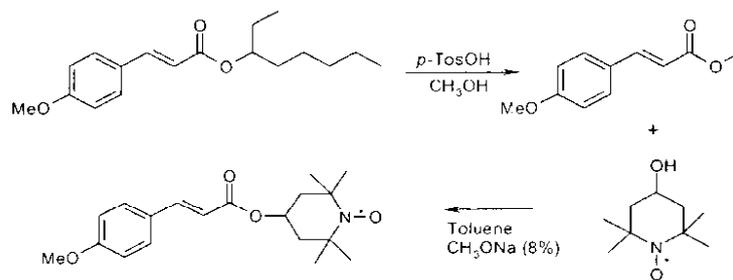


Figura 2

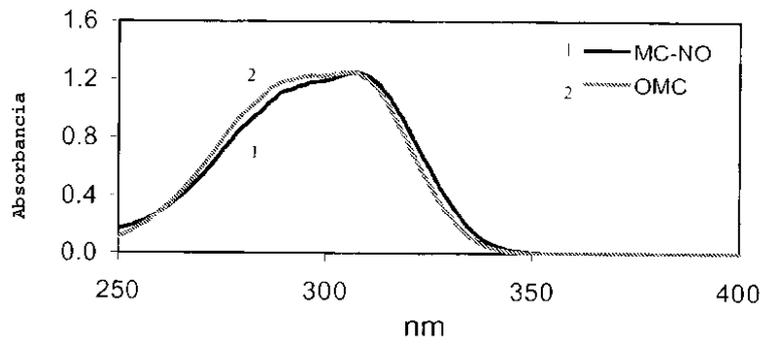


Figura 3.

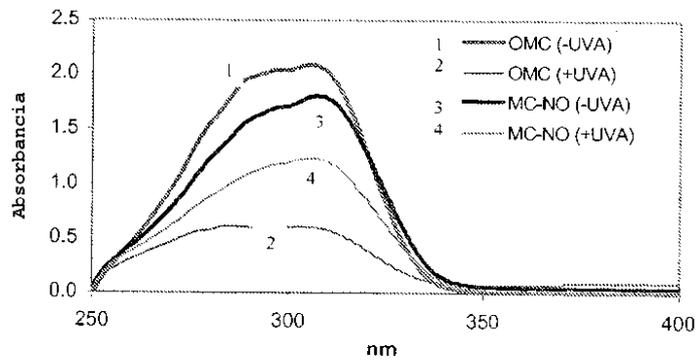


Figura 4

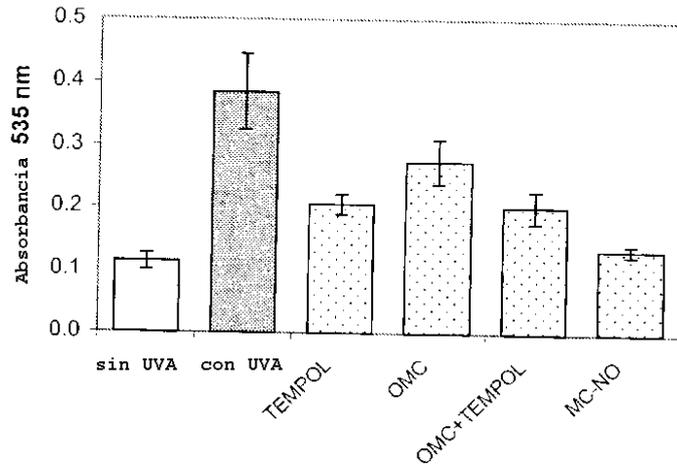


Figura 5

