

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 236**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10775793 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2493462**

54 Título: **Pterostilbeno (PTER) para uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas**

30 Prioridad:

30.10.2009 EP 09174717

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

02.12.2013

73 Titular/es:

**GREEN MOLECULAR, S.L. (100.0%)
Parc Cientific de la Universitat de Valencia
Poligono La Coma s/n. Despacho No 7
46980 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**ESTRELA ARIQUEL, JOSE MARÍA y
ASENSI MIRALLES, MIGUEL A.**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 432 236 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).

DESCRIPCION

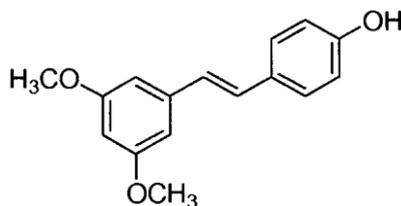
Pterostilbeno (PTER) para uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas

5 **Campo de la invención**

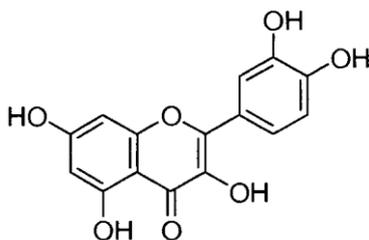
La presente invención puede entrar dentro del campo técnico farmacéutico.

10 **Estado de la técnica**

Una elevada ingesta de frutas y hortalizas se asocia con un estilo de vida saludable. Esta asociación se debe a la presencia en los alimentos de antioxidantes naturales, principalmente compuestos polifenólicos. Uno de los polifenoles que ha levantado más interés en la comunidad científica es el resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-estilbeno; RESV), un pequeño polifenol presente en cantidades significativas en el vino, al que se le han atribuido posibles efectos beneficiosos en diferentes enfermedades crónicas (especialmente cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes de tipo II y enfermedades neurodegenerativas). Las propiedades anticancerosas del RESV fueron propuestas por primera vez por Jang et al. (Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997) *Science* 275(5297):218-20), con efectos sobre las tres etapas del desarrollo del cáncer (inicio, estimulación y progresión). Los efectos anticancerosos del RESV están muy limitados por su baja biodisponibilidad (Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, Estrela JM. (2002) *Free adic Biol Metal*. 33(3): 387-98). Debido a este inconveniente, se analizaron algunos otros polifenoles con mejor biodisponibilidad para el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que la combinación de PTER (3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-trans-resveratrol, PTER, un derivado del RESV) y QUER (3,3', 4',5,6-pentahidroxiflavona; QUER), dos pequeños polifenoles naturales que tienen la fórmula siguiente



PTER



QUER

era eficaz para inhibir el crecimiento metastático de un melanoma maligno altamente agresivo (Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, Varea MT, Asensio G, Jorda L, Estrela JM. (2005) *Neoplasia*. 7(1):37-47). Además, la asociación de PTER y QUER, al potenciar los efectos antitumorales de la quimioterapia más radioterapia, facilita la eliminación de cáncer colorrectal humano resistente xenoinjertado en ratones inmunodeficientes (Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Estrela JM. (2008) *Mol Cancer Ther*. 7(10): 3330-42). PTER y QUER se administraron por vía intravenosa y/u oral.

En recientes estudios epidemiológicos se ha demostrado que más del 90% de todos los cánceres de piel se deben a una exposición excesiva al sol, especialmente ultravioleta B (UVB). La incidencia de estos cánceres, tanto de tipo melanoma como no melanoma, está creciendo de un modo espectacular (las muertes por cáncer de piel se han duplicado en los últimos 20 años).

Por consiguiente, hace mucho que en la técnica existe la necesidad de composiciones capaces de prevenir y/o tratar enfermedades (incluyendo el cáncer de piel), lesiones o daños cutáneos causados por la prolongación excesiva a la radiación, en particular a UVB (rayos ultravioleta B).

No obstante, las enfermedades, lesiones o daños cutáneos se pueden deber, no solo a la exposición a la radiación, sino también a otros factores como factores inmunológicos. La mayoría de las enfermedades, lesiones o daños cutáneos comparten la presencia de procesos inflamatorios asociados con patologías cutáneas. Además, la exposición de la piel a la radiación o a procesos inflamatorios en la piel asociados con dicha exposición a la radiación o con otras causas, como enfermedades cutáneas autoinmunitarias o enfermedades cutáneas alérgicas, tales como psoriasis, dermatitis de contacto alérgica o dermatitis atópica, también comparte un incremento del estrés oxidativo de la piel, mediante la producción de radicales de oxígeno y otras especies oxidativas como el óxido de nitrógeno (NO) de peroxinitrilo, a modo de ejemplo.

Las anomalías asociadas con inflamación comprenden un grupo grande y no relacionado de trastornos que subyacen a una vasta variedad de enfermedades humanas. No obstante, el objetivo de la presente invención no se centra en la prevención/tratamiento de la inflamación específicamente, sino en un grupo particularmente seleccionado de indicaciones, todas ellas relacionadas con la piel, que se tratan aplicando formulaciones tópicas, más particularmente las enfermedades cutáneas causadas por la exposición a la radiación. Además, el estado de la técnica ha divulgado fármacos administrados por vía oral que podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, aunque estos fármacos administrados por vía oral nunca ejercerían sus potenciales efectos terapéuticos en un tejido diana lejano como la piel.

Se ha divulgado (Rubia Casagrande, Sandra R. Georgetti, Waldiceu A. Verri Jr., Daniel J. Dorta, Antônio C. dos Santos, Maria J. V. Fonseca [2006]; J. Photochem Photobiol B: Biology 84: 21-27 y Alena Svobodová, Jitka Psovtová, Daniela Walterová [2003]; Biomed. Papers 147(2): 137-145) que la QUER es eficaz en la prevención de efectos perjudiciales de la radiación UV sobre la piel. No obstante, el espectro de absorción de QUER muestra la mayoría de sus picos máximos a longitudes de onda en el intervalo de UVA (320-400 nm), no en el intervalo de UVB (290-320 nm), precisamente en el que el espectro de absorción de PTER tiene su área máxima.

En el estado de la técnica (documento WO01/43705 A2), para el cuidado de la piel se usa una combinación de algunos miembros de la familia química del estilbeno, no específicamente PTER, con retinoides.

La presente invención da un nuevo paso hacia delante, hacia la solución de los problemas anteriores, desarrollando composiciones centradas en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos, basadas en PTER, como compuesto activo principal y, más particularmente, en combinaciones de PTER y QUER. Además, la presente invención también se aplica a la piel de mamíferos (humanos) con una formulación, particularmente formulaciones de protección solar, loción para después del sol, antienvjecimiento, antiarrugas, formulaciones con fines fotoprotectores, antes de que pueda producirse ninguna enfermedad, daño o lesión cutánea.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere principalmente al uso de PTER, o cualquier sal aceptable del mismo, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de composiciones farmacéuticas para prevenir y/o tratar enfermedades, daños o lesiones cutáneas. Los procedimientos terapéuticos de prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición que comprende PTER como compuesto activo, o cualquier sal aceptable del mismo, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, a un sujeto que lo necesite. La presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas, per se, que comprenden PTER como compuesto activo o cualquier sal aceptable del mismo, opcionalmente en combinación con QUER, estando preferentemente en forma de formulaciones tópicas y, más preferentemente, en forma de liposomas, la invención también cubre el procedimiento de preparar dichas formulaciones liposómicas.

QUER se puede sustituir por cualquier otro polifenol, siempre que la combinación con PTER muestre un efecto sinérgico.

A efectos de la presente invención, los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que pueden encontrarse en plantas, aunque no exclusivamente, y se caracterizan por la presencia de más de una unidad fenol o bloque componente por molécula. En general, los polifenoles se dividen en taninos hidrolizables (ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares) y fenilpropanoides, tales como ligninas, flavonoides y taninos condensados.

La acción de PTER y, opcionalmente, también su combinación con QUER, se ejercería de muchas formas:

- a) como filtro de UV porque ambos polifenoles tienen estructuras químicas que permiten la absorción de la radiación.
- b) como sequestrantes de radicales libres de oxígeno de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos durante la irradiación y/o durante procesos inflamatorios.
- c) como agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores.

En una realización preferida, las composiciones de la invención comprenden una combinación de los dos compuestos activos PTER y QUER, o cualquier sal aceptable de los mismos. Por tanto, los métodos de prevención y/o trata-

miento comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición que comprende PTER y QUER, o cualquier sal aceptable de los mismos, a un sujeto que lo necesite.

Un "sujeto", como se define en la presente memoria descriptiva, es un mamífero, por ejemplo un ser humano.

Procesos inflamatorios, como se define en la presente invención, comprenden procesos de inflamación aguda o crónica iniciados por células ya presentes en todos los tejidos, principalmente macrófagos residentes, células dendríticas, histiocitos, células de Kuppfer y mastocitos. Al inicio de una infección, quemadura u otra lesión, estas células sufren activación y liberación de mediadores inflamatorios responsables de los signos clínicos de inflamación. La vasodilatación y su incremento de flujo sanguíneo resultante producen enrojecimiento e incremento de calor. El incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos tiene como resultado una exudación (salida) de proteínas plasmáticas y fluido en el tejido (edema), que se manifiesta como hinchazón. Algunos de los mediadores liberados, tal como la bradiquinina, aumentan la sensibilidad al dolor (hiperalgesia). Las moléculas mediadoras también alteran los vasos sanguíneos para permitir la migración de leucocitos, principalmente neutrófilos, fuera de los vasos sanguíneos (extravasación) en el tejido. Los neutrófilos migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico creado por las células locales para alcanzar el lugar de la lesión. La pérdida de función es, probablemente, el resultado de un reflejo neurológico en respuesta al dolor.

Además de los mediadores derivados de células, varios sistemas de cascadas bioquímicas celulares que consisten en proteínas plasmáticas preformadas actúan en paralelo para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estos incluyen el sistema del complemento activado por las bacterias y los sistemas de fibrinólisis de coagulación activados por necrosis, por ejemplo una quemadura o un traumatismo. La respuesta inflamatoria aguda requiere mantener una estimulación constante. Los mediadores inflamatorios tienen semividas cortas y se degradan rápidamente en el tejido. Por tanto, la inflamación cesa cuando se retira el estímulo.

Las composiciones de la invención pueden comprender cualquier "sal aceptable" de los compuestos activos incluidos en las mismas. Como se usa en el presente documento, dicha expresión significa las sales de compuestos de la invención cuyo uso en mamíferos, como sustancias farmacéuticas, es seguro y eficaz, y que poseen la actividad biológica deseada. Sales ilustrativas incluyen, entre otras, las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato. Las "sales aceptables" de la presente invención se preparan, preferentemente, a partir de un compuesto de polifenol que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico y una base inorgánica u orgánica aceptable. Bases adecuadas para formar sales farmacéuticamente aceptables con grupos funcionales ácidos o profármacos de la presente invención incluyen, entre otros, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio, hidróxidos de metales alcalino térreos tales como hidróxidos de calcio y magnesio, hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc, amoníaco y aminos orgánicas, tales como mono, di o trialquilaminas insustituídas o hidroxisustituídas; diciclohexilamina; tributilamina; piridina; N-metil-N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono, bis o tris-(2-hidroxi)alquilaminas menores sustituidas), tales como mono, bis o tris-(2-hidroxi)etilamina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tris(hidroxi)etilmetilamina, N,N-dialquilo menor-N-(hidroxi)alquilo menor)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etilamina o tri-(2-hidroxi)etilamina, o N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. La expresión "sal aceptable" también incluye un hidrato de un compuesto polifenol.

Un excipiente, como se define en la presente memoria descriptiva, es una sustancia activa usada como excipiente o vehículo para los compuestos activos (PTER y/o QUER) comprendidos en la composición. Las composiciones de la invención pueden comprender cualquier excipiente, preferentemente adecuado para su inclusión en las composiciones tópicas (es decir, excipiente dermatológico aceptable). Los siguientes agentes auxiliares que se mencionan más adelante pueden estar, independientes uno de otros, presentes en la composición de la invención. Agentes gelificantes, aceites, Ceras, agentes espesantes, polímeros hidrófilos o hidrófobos, agentes emulsionantes, emolientes, ácidos grasos, disolventes orgánicos, antioxidantes, estabilizantes, agentes secuestrantes, agentes acidificantes o basificantes, emulsionantes, emolientes, tensioactivos, formadores de películas, aditivos biológicos para potenciar el rendimiento y/o atraer al consumidor, tales como aminoácidos, proteínas, vainilla, extracto de aloe o bioflavonoides, agentes tampón, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido oxálico, colorantes, pigmentos, propelentes, agentes antiespumantes, agentes humectantes, vitaminas, estabilizantes de la emulsión, ajustadores del pH, agentes espesantes, fragancias, conservantes, agentes opacificantes, agua y/o alcoholes. Los agentes auxiliares mencionados anteriormente para la composición de la invención se usan en las cantidades habituales conocidas por los expertos en la técnica.

Aceites adecuados para las composiciones de la invención se seleccionan de aceites animales o vegetales o sintéticos. Aceites particularmente preferidos se seleccionan del grupo que comprende vaselina líquida, parafina líquida, aceites de silicona volátiles y no volátiles, isoparafinas, polialfaolefinas, aceites fluorados o perfluorados.

Estabilizantes adecuados para las composiciones de la invención pueden ser de naturaleza no iónica, aniónica, catiónica y anfifílica. Estabilizantes preferidos se seleccionan del grupo que comprende polietilenglicol (PEG) y deri-

vados del mismo, tweens, tritones, espans, poliglicerinas, polialquilglicéridos, sulfonatos de alquilo, sulfonatos de arilo, fosfatos de alquilo, derivados alquil-betaína y fosfatidilglicerol.

5 Los emulsionantes se usan, preferentemente, en las composiciones de la presente invención en cantidades eficaces para proporcionar un mezclado uniforme de los ingredientes en dichas composiciones. Emulsionantes adecuados incluyen aniónicos tales como jabones de ácidos grasos, por ejemplo estearato de potasio, estearato de sodio, estearato amónico y estearato de trietanolamina, monoésteres de ácido graso de poliol que contienen jabones de ácido graso, por ejemplo monoestearato de glicerol que contiene sal de potasio o sal de sodio; ésteres sulfúricos (sales de sodio), por ejemplo laurilsulfato sódico y acetilsulfato sódico, y monoésteres de ácido graso de poliol que contienen ésteres sulfúricos, por ejemplo monoestearato de glicerilo que contienen laurilsulfato sódico; (ii) cloruro de cationes tales como N(estearoilcolaminoformilmetil)piridinio; etosulfato de N-soja-N-etilmorfolinio; cloruro alquildimetilbencilamónico; cloruro diisobutilfenoxietildimetilbencilamónico y cloruro de acetilpiridinio; y (iii) no iónicos tales como éteres de alcohol graso de polioxietileno, por ejemplo monoestearato, alcohol polioxietilenoaurílico; éteres de ácido graso de sorbitano, por ejemplo sorbitano; ésteres de ácido graso de polioxietilenglicol, por ejemplo monoestearato de polioxietilenglicol; y ésteres de ácido graso de poliol, por ejemplo monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol; y derivados etoxilados de lanolina, por ejemplo lanolinas etoxiladas, alcoholes de lanolina etoxilada y/o colesterol etoxilado.

20 También se pueden usar emolientes en las composiciones de la invención en cantidades tales que prevengan o alivien la sequedad. Emolientes adecuados incluyen, sin limitaciones, aceites de hidrocarburos y ceras; aceites de silicona; ésteres de triglicéridos, ésteres de acetoglicérido, glicérido etoxilado, ésteres de alquilo, ésteres de alquenoilo, ácidos grasos, alcoholes grasos, éteres de alcohol graso, éterésteres, lanolina y derivados, alcoholes polihídricos (polioles) y derivados de poliéter, alcohol polihídrico, ésteres de polioles, ésteres de ceras, derivados de cera de abeja, ceras vegetales, fosfolípidos, ésteres y/o amidas.

25 También se pueden usar tensioactivos en las composiciones de la presente invención. Tensioactivos adecuados son, por ejemplo, los tensioactivos agrupados generalmente como agentes de limpieza, agentes emulsionantes, refuerzos de espuma, hidrotropos, agentes solubilizantes, agentes de suspensión y no tensioactivos, que facilitan la dispersión de sólidos en líquidos.

30 Los formadores de película que se pueden usar, preferentemente, en las composiciones de la presente invención deberán mantener la composición lisa y uniforme y son, preferentemente, sin limitaciones: Formadores de película adecuados se seleccionan del grupo que comprende copolímero de acrilamida/acrilato sódico, copolímero de acrilatos y amoniaco, bálsamo de Perú, goma de celulosa, copolímero de etileno/anhídrido maleico, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, poliacrilamida, polietileno, alcohol polivinílico, copolímero de pvm/MA (copolímero de metiléter vinílico/anhídrido maleico), PVP (polivinilpirrolidona), polímero de anhídrido maleico, copolímero de viilpirrolidona/hexadeceno, copolímero de acrilacrilato y similares.

40 En las composiciones de la presente invención también pueden usarse ajustadores del pH. Estos ajustadores del pH se seleccionan, preferentemente, de: hidróxido amónico, trietanolamina o ácido cítrico.

45 Agentes espesantes usados para las composiciones de la invención se seleccionan, preferentemente, de: Ceras de candelilla, carnauba y microcristalinas, polímeros de ácido acrílico reticulados, carbómero, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o hidroxietilcelulosa y espesantes de polietileno.

50 Ejemplos de disolventes orgánicos preferidos para las composiciones de la presente invención incluyen alcoholes alifáticos menores y polioles.

55 Antioxidantes adecuados para las composiciones usadas en la presente invención se seleccionan, preferentemente, del grupo que comprende ácido ascórbico (vitamina C), L-ascorbato sódico, L-ascorbato cálcico, palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, EDTA disódico cálcico, ácido isoascórbico, lecitina, ácido láctico, polifosfato, tocoferol (vitamina E), de tipo [alfa]-tocoferol, [gamma]-tocoferol, [delta]-tocoferol, propilgalato, octilgalato, dodecilgalato, isoascorbato sódico, ácido cítrico, citrato sódico, citrato potásico y 11-cloruro de estaño.

60 Agentes gelificantes que se usan preferentemente en las composiciones de la invención pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros naturales se seleccionan, preferentemente, de: agar-agar, alginato, pectina, carbómero, carragenina, caseína, dextrina, gelatina, goma arábiga, queratina, goma garrofín, goma xantana y similares. Polímeros sintéticos preferidos que se pueden usar en las composiciones de la invención se seleccionan de: polímeros de ácido acílico, amidas de poliacrilo y polímeros de óxido de alquileo.

65 Se puede usar cualquier vía de administración para administrar la composición de la invención al sujeto, prefiriéndose las vías de administración intravenosa, oral y tópica. En una realización preferida, la composición de la invención es una formulación tópica que se puede formular en forma líquida o semisólida, preferentemente como un líquido, fluido, espuma, crema, gel, pasta, bálsamo, pulverizador, pomada, loción, acondicionador, tónico, leche, mousse, emulsión, suero, aceite, barra, champú, gelatina, suspensión, dispersión, laca, pintura, elixir, gotas o aerosol. En una forma de realización concreta, los compuestos activos de la invención se administraron por vía tópica en una prepa-

ración liposómica. Como se usa en la presente invención, un "liposoma" es una vesícula artificial que está compuesta por una o más capas concéntricas y se usa especialmente para liberar sustancias (es decir, PTER y/o QUER) en las células del cuerpo.

5 La administración tópica de la composición de la invención conduce a una elevada biodisponibilidad de los compuestos activos PTER y/o QUER, disminuyendo la cantidad de las composiciones de la invención que produce una respuesta terapéutica en el 50% de los sujetos a los que se administra, es decir disminuyendo la dosis eficaz (DE50). En farmacología, la biodisponibilidad se usa para describir la fracción de una dosis administrada de fármaco sin modificar que alcanza la circulación sistémica, una de las principales propiedades farmacocinéticas de los fármacos.
10 Por tanto, la biodisponibilidad es una de las herramientas esenciales en farmacocinética y se debe considerar cuando se calculan las dosis para las vías de administración que no son intravenosas.

Cualquier enfermedad, daño o lesión cutánea, incluido el cáncer de piel, se puede prevenir y/o tratar con las composiciones de la invención. En una realización preferida de la invención, las enfermedades, daños o lesiones cutáneas se asocian con procesos inflamatorios. Por tanto, la invención, en una realización preferida, se centra en la prevención y/o tratamiento de sujetos predispuestos o afectados por dermatosis inflamatoria, que comprenden la administración de la composición de la invención en el área de piel afectada (labios, cara o piel en general) y/o mediante cualquier otro modo alternativo de administración. La expresión "dermatosis inflamatoria" incluye una gama de trastornos cutáneos, incluyendo, entre otros, trastornos de las glándulas sebáceas, dermatosis papuloescamosa, dermatosis alérgica, dermatosis prurítica, dermatosis vascular, dermatosis bacteriana, dermatosis viral, infecciones micólicas de la piel, dermatosis granulomatosa, dermatosis cutánea parasitaria, dermatitis exfoliativa, dermatosis ampollosa, dermatosis pigmentada, dermatosis fotosensible, dermatosis causada por enfermedades del colágeno y dermatosis por enfermedades internas. La dermatosis inflamatoria también se puede asociar con una afección autoinmunitaria, en cuyo caso se denomina en el presente documento "dermatosis autoinmunitaria".

15 En una realización preferida de la invención, la dermatosis inflamatoria es un trastorno de las glándulas sebáceas, por ejemplo un trastorno acneiforme tal como acné vulgar, acné conglobata, hidradenitis supurativa, acné rosácea, seborrea, dermatitis seborreica, folliculitis gramnegativa, piodermia facial, esteatocistoma multiplex, hiperplasia sebácea o rinofima. En una realización más preferida de la invención, la composición/formulación que comprende PTER o cualquier sal del mismo aceptable, opcionalmente en combinación con QUER o cualquier sal aceptable del mismo, se usa para tratar el acné vulgar. Como es bien conocido, el acné vulgar es una afección cutánea crónica que se caracteriza por comedones y pápulas, y puede ser bastante grave: en los casos particularmente graves se pueden producir pústulas, quistes y cicatrización permanente.

20 En otra realización preferida de la presente invención, la dermatosis inflamatoria prevenida y/o tratada es una dermatosis papuloescamosa tal como, psoriasis, Pityriasis rosea, tiña versicolor o liquen plano. El procedimiento y formulaciones de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de la psoriasis, un trastorno inflamatorio autoinmunitario que se ha demostrado que es difícil de tratar con los agentes convencionales.

25 En otra realización preferida adicional de la presente invención, la dermatosis inflamatoria tratada es una dermatosis autoinmunitaria que puede ser, a modo de ejemplo, dermatitis atópica, enfermedad de los mastocitos, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, vasculitis necrotizante, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso sistémico o dermatitis herpetiforme.

30 En otras realizaciones, ejemplos de los diversos tipos de dermatosis inflamatoria con los que el procedimiento y la formulación de la invención son eficaces son los siguientes:

- dermatosis alérgica: dermatitis de contacto, dermatitis fotoalérgica, dermatosis industrial causada por la exposición a diversos compuestos usados por la industria que son irritantes de contacto; eccema atópico (infantil y adulto), y dermatosis causada por fármacos y eccema numular.
- dermatosis prurítica: prurito del invierno, senil y esencial, prurito anual, otitis eterna, prurito hiemalis, prurito de la vulvar y prurito del escroto.
- dermatosis vascular: eritema multiforme, eritema nodoso, dermatitis por estasis, dermatosis purpúrica tales como las asociadas con púrpura trombocitopénica, púrpura no trombocitopénica, púrpura disproteinémica, púrpura actínica, púrpura escorbútica y púrpura de Henochs, equimosis, púrpura por estasis, telangiectasia primaria y secundaria.
- dermatosis bacteriana: piodermia tal como impétigo, estíma, folliculitis, forúnculos, orzuelos, carbúnculos, infecciones en las glándulas sudoríparas, erisipelas, eritrasma, úlceras infectadas y dermatitis eccematoide infectada y dermatosis bacteriana asociada con infecciones bacterianas sistémicas tales como fiebre escarlata, granuloma inguinal, chancro blando, tuberculosis, lepra, gonorrea, rickettsiosis, actinomicosis y sífilis.
- dermatosis viral: Tales como las causadas por el virus del herpes simple, erupción variceliforme de Kaposi, zóster, varicela, viruela, virus vacunal, molusco contagioso, linfogranuloma venéreo, enfermedades exantematosas tales como rubéola, roséola y eritema infeccioso.

- infecciones cutáneas micóticas: tiña crural (infecciones fúngicas superficiales de la piel en varios sitios del cuerpo), pie de atleta (dermatofitosis de los pies causada por infección con trichophyton mentagrophytes); tiña ungueal (onicomicosis), esporotricosis, coccidiomicosis, histoplasmosis y blastomicosis norteamericana.
- dermatosis granulomatosa: sarcoidosis; granuloma anular; reticulohistiocitoma y granulomas inducidas por sílice.
- infecciones cutáneas parasitarias: sarna, dermatitis por cheyletiella, demodicosis, pediculosis
- dermatosis pigmentada: cloasma (melasma) y vitíligo.
- enfermedades del colágeno: esclerodermia y dermatomiositis
- dermatosis por enfermedades internas: piodermia gangrenoso asociado con colitis ulcerosa y úlceras por diabetes.
- dermatosis fotosensible: Tipos exógenos como la fotodermatitis inducida por fármacos y dermatitis de contacto con componentes fotoalérgicos, y tipos endógenos como los asociados con porfirias y erupciones ligeras polimorfas.

En una realización preferida, las enfermedades, daños o lesiones cutáneas se deben a la exposición a radiación, bien aguda o bien crónica. Después, la enfermedad se selecciona entre: cáncer de piel, melanoma, erupción ligera polimorfa, queratosis actínica, urticaria solar, xerodermia pigmentosa, fotoenvejecimiento, dermatitis actínica crónica o quemaduras solares. El término "radiación" comprende cualquier tipo de radiación capaz de producir lesiones o daños en la piel, por ejemplo la radioterapia usada para tratar el cáncer o radiación ultravioleta (UV), preferentemente UVB emitida por el sol.

El término "prevención" como se usa en la presente invención significa evitar completa o parcialmente el aspecto de los procesos patofisiológicos de la piel asociados con estrés oxidativo, exposición excesiva a radiación, en particular a la radiación UV relacionada con el bronceado del cuerpo, en particular a la radiación UVB atribuida al bronceado solar, alergia, respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios.

Como se usa en la presente invención, el término "fotoprotección" hace referencia a la administración de la composición de la invención antes de que el sujeto se exponga a radiación, principalmente radiación UVB, disminuyendo o mitigando el riesgo de sufrir daños. Por tanto, el término "fotoprotección" se entiende en la presente invención que está comprendido dentro del término "prevención".

Por otro lado, el término "tratamiento" está ligado a la administración de la composición de la invención después de que el sujeto ha sufrido los síntomas de enfermedad, daño o lesión cutánea. A modo de ejemplo, el término "tratamiento" se aplica, preferentemente, a la administración de cualquiera de las composiciones divulgadas en la presente invención a una persona que ha estado expuesta a radiación, principalmente a radiación UVB, reparando las partes dañadas de la piel y restableciendo su función e integridad originales. Además, el término "tratamiento" está ligado a la administración de la composición de la invención después de que un sujeto que sufre enfermedad, daños o lesiones cutáneas asociados a procesos inflamatorios.

PTER, opcionalmente QTER, o cualquier sal aceptable de los mismos, se puede formular en combinación con otros compuestos activos. Entre estos otros compuestos activos se prefieren los analgésicos, agentes antiinflamatorios, antialérgicos, inmunomoduladores, agentes de cicatrización y filtros de radiación. Para la lista de filtros UV adecuados como ingredientes de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención que acompañan a PTER y, opcionalmente, a QUER, o cualquier sal aceptable de los mismos, los autores hacen referencia a las sustancias de absorción de UV (A y/o B) divulgadas en el documento WO 2008067928. Los filtros UV más preferidos se seleccionan de:

Tabla 1

Filtro UV	Otras denominaciones
Ácido p-aminobenzoico	PABA
Padimato O	OD-PABA, octildimetil-PABA, σ -PABA
Ácido fenilbencimidazol sulfónico	Ensulizole, Eusolex 232, PBSA, Parsol HS
Cinoxato	2-etoxietil-p-metoxicinamato
Dioxibenzona	Benzofenona-8
Oxibenzona	Benzofenona-3, Eusolex 4360, Escalol 567
Homosalato	Homometilsalicilato, HMS
Antranilato de mentilo	Meradimato
Octocrileno	Eusolex OCR, ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico, 2-etilhexiléster
Metoxicinamato de octilo	Octinoxato, EMC, OMC, Etilmetoxicinamato, Escalol 557, 2-etilhexil-parametoxicinamato, Parsol MCX
Salicilato de octilo	Octisalato, salicilato de 2-etilhexilo, Escalol 587,
Sulisobenzona	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico, ácido 3-benzoil-4-hidroxi-6-metoxibencenosulfónico, benzofenona-4, Escalol 577
Salicilato de trolamina	Salicilato de trietanolamina
Avobenzona	1-(4-metoxifenil)-3-(4-terc-butilfenil)propano-1,3-diona, butilmetoxidibenzoilmetano, BMDBM, Parsol 1789, Eusolex 9020
Ecamsule	Mexoryl SX, ácido tereftalidenodicanforsulfónico
Dióxido de titanio	CI77891
Óxido de cinc	
4-metilbencilidenalcanfor	Enzacamene, Parsol 5000, Eusolex 6300, MBC
Tinosorb M	Bisotrizol, metilen-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, MBBT
Tinosorb S	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenol triazina, Bemotrizinol, BEMT, anisotriazina
Neo Heliopan AP	Bisdisulizol disódico, tetrasulfonato de fenildibencimidazol disódico, bisimidacilato, DPDT
Mexoryl XL	Drometrizol trisiloxano
Benzofenona-9	Uvinul DS 49, CAS 3121-60-6, Sodio Dihidroxidimetoxi Disulfobenzofenona
Uvinul T 150	Octiltriazona, etilhexil triazona, ET
Uvinul A Plus	Benzoato de dietilaminohidroxibenzoilhexilo
Uvasorb HEB	Iscotrizino Dietilhexil butamido triazona, DBT
Parsol SLX	Dimetico-dietilbenzalmalonato, polisilicona-15
Isopentenil-4-metoxicinamato	

En la presente invención se llevaron a cabo varias técnicas, tales como la determinación del grosor de los pliegues cutáneos o la epidermis, tanto antes como después de la exposición a radiación, con el fin de aclarar la eficacia o la eficiencia de las composiciones de la invención en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos. Todas estas técnicas son bien conocidas en la materia y pertenecen al conocimiento general habitual. Además, ambas técnicas se usan de forma rutinaria para analizar la capacidad de diferentes compuestos para prevenir o tratar enfermedades, daños o lesiones cutáneas. Cuanto menor es el grosor o los pliegues de la epidermis, más eficaz es el tratamiento. Como se puede ver en los ejemplos se puede usar el compuesto activo PTER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición tópica para prevenir y/o tratar enfermedades, daños o lesiones cutáneas. Además, la combinación de los compuestos activos PTER y QUER o cualquier sal aceptable de los mismos muestra un efecto sinérgico que mejora la función de cada compuesto activo tomado por separado en algunos de los ensayos como se explica más adelante. Por tanto, el término "sinérgico", cuando se usa en relación con la presente invención, significa que el efecto terapéutico global de una combinación de PTER y QUER, o cualquier sal aceptable de los mismos, cuando se administra como terapia de combinación para prevenir y/o tratar enfermedades, daños o lesiones cutáneas causadas por la exposición a radiación, es mayor que los efectos terapéuticos de estos compuestos activos cuando cada uno se administra de forma independiente.

Como se muestra en los ejemplos, se llevó a cabo la determinación del grosor de los pliegues de la piel. La **Figura 1** muestra que la combinación de PTER + QUER, y también PTER por separado, es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que la cremas comerciales: Vichy (VICHY Capital Soleil 50+ UVB+UVA), Heliocare (Heliocare ultra 90 UVB/UVA) e Isdin (ISDIN Extrem 40 protección alta frente a UVA y UVB), la combinación de PTER + QUER que muestra resultados ligeramente mejores. Las 3 cremas comerciales se usan para efectos de comparación a lo largo de la presente memoria descriptiva. Asimismo, a lo largo de la presente solicitud, RESV también se compara, en el ensayo con las mismas condiciones, con PTER y PTER+QUER. RESV se ha divulgado previamente como agente quimioprotector del cáncer de piel (Moammir Hasan Aziz, Shannon Reagan-Shaw, Jianqiang Wu, B. Jack Longley and Nihal Ahmad; FASEB J. express article 10.1096 (2005): 1-18). En la **Figura 1**, PTER solo o la combinación de PTER+QUER muestran más eficacia para la fotoprotección de la piel después o antes de la exposición a UVB que RESV.

Por tanto, la combinación de PTER + QUER, o PTER por separado se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades cutáneas inducidas por la exposición a la radiación solar. PTER absorbe particularmente el componente de UVB de dicha radiación, pero también QUER (véase la **Figura 13**) que, adicionalmente, también tiene un espectro de absorción en la longitud de onda correspondiente al componente UV de la radiación solar, parcialmente responsable también de la carcinogénesis debido a la exposición a la radiación (solar). Por tanto, el efecto sinérgico observado en algunos de los ensayos de la presente memoria de la combinación PTER+QUER.

Además, la **Figura 1** también muestra que la combinación PTER + QUER es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales ((Vichy, Heliocare e Isdin), y también que PTER solo. Por tanto, la combinación de PTER + QUER podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos inducidos por la radiación ultravioleta.

Como se muestra en los ejemplos, se llevó a cabo la determinación del grosor de la epidermis antes de la irradiación (24 horas). La **Figura 2** muestra que el uso de PTER por separado o en combinación con QUER es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que la cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin). Por tanto, PTER por separado o en combinación con QUER se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades cutáneas inducidas por radiación ultravioleta B.

Además, la **Figura 2** también muestra que la combinación DE PTER + QUER o PTER por separado es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin), mostrando la combinación de PTER + QUER resultados ligeramente mejores. Por tanto, la combinación de PTER + QUER, así como PTER por separado, podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos inducidos por la radiación ultravioleta B.

Como se muestra en los ejemplos, se llevó a cabo la determinación del grosor de la epidermis antes de la irradiación (1 semana). La **Figura 3** muestra que el uso de PTER por separado es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que la cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin). Por tanto, PTER por separado se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades, daños o lesiones cutáneas inducidas por radiación ultravioleta B.

Además, la **Figura 3** también muestra que la combinación DE PTER + QUER o PTER por separado es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin), mostrando la combinación de PTER + QUER resultados ligeramente mejores. Por tanto, la combinación de PTER + QUER, así como PTER por separado, podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos inducidos por la radiación ultravioleta B.

Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas. En una realización preferida, la presente invención se refiere también a PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel. Otra realización preferida de la invención se refiere a PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas. Otra realización preferida de la invención se refiere a PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel. Otra realización preferida de la invención se refiere a PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cutáneas producidas por la exposición a radiación. Otra realización preferida de la invención se refiere a PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar en la prevención y/o tratamiento de dermatosis o psoriasis. El uso anterior se prefiere mediante administración tópica.

La segunda realización de la presente invención se refiere al uso de PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas. En una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel. En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas. En una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel. En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cutáneas causadas por la exposición a radiación. En una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o

tratamiento de dermatosis o psoriasis. Las composiciones farmacéuticas fabricadas preferidas son las que se van a administrar por vía tópica.

5 La tercera realización de la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende PTER para administración tópica y, más preferentemente, formulada en forma de liposomas. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende PTER formulado en combinación con QUER. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula en forma de formulaciones de protección solar o crema para después del sol.

10 La cuarta realización de la presente invención hace referencia a un procedimiento para fabricar formulaciones de liposomas, que comprende: Disolver el compuesto activo PTER, o cualquier sal aceptable del mismo, y lecitina en un disolvente orgánico, evaporar el disolvente, añadir el tampón PBS, recoger y someter a ultrasonidos los liposomas formados, diluir a 1:1 con una emulsión de estabilizante, preferentemente un carbómero y, más preferentemente, Carbopol, añadir opcionalmente un conservante, preferentemente Phenonip. En una realización preferida, el procedimiento para fabricar formulaciones en liposomas también comprende la disolución de QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, en combinación con PTER en la primera etapa. Carbopol es un carbómero. El carbómero también es un nombre genérico para polímeros sintéticos de ácido acrílico usados como estabilizantes de emulsión o agentes espesantes en sustancias farmacéuticas y productos cosméticos. Pueden ser homopolímeros de ácido acrílico, reticulados con un alléter de pentaeritrol, alléter de sacarosa o alléter de propileno.

20 Phenonip es un líquido transparente conservante que funciona en muchas aplicaciones. Es único en cuanto a que es soluble en aceite y se puede dispersar en agua. Este conservante es especialmente eficaz cuando se usa junto con productos basados en aceite pero también funciona extremadamente bien en soluciones acuosas. Esto significa que también funciona en productos, como bálsamos y pomadas que solo contienen aceites. Phenonip también puede resistir un intervalo de temperaturas más amplio. Los ensayos muestran que se puede calentar a temperaturas de esterilización sin degradar la calidad de sus efectos conservantes. Funciona en un amplio intervalo de pH de 3-8. La tasa de uso varía del 1% al 3% del peso de la fórmula total (en función de la aplicación). Phenonip está compuesto por y se marcará como: fenoxietanol, metilparaben, etilparaben, butilparaben, propilparaben.

30 La quinta realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas, que comprende la administración de PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel, que comprende la administración de PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas, que comprende la administración de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel, que comprende la administración de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cutáneas provocadas por la exposición a radiación, que comprende la administración de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de la dermatosis o psoriasis, que comprende la administración de PTER, en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo. Más preferentemente, el procedimiento de la invención se aplica tópicamente.

45 **Breve descripción de las figuras**

50 **Figura 1.** Muestra el grosor de los pliegues de la piel (%) de ratones tratados con diferentes composiciones antes (columna de la izquierda) o después (columna de la derecha) de la exposición a UVB. Cremas comerciales (Vichy, Heliocare -Helio- e Isdin). C+UVB= Control irradiado sin tratamiento alguno; C Lipo+UVB= Control irradiado en el que solo se aplican liposomas (sin contener compuesto activo alguno). RESV= Resveratrol; P+Q= PTER+QUER.

55 **Figura 2.** Muestra el grosor (μm) de la epidermis tratada con diferentes composiciones antes (columna de la izquierda) o después (columna de la derecha) de la exposición a la irradiación (24 horas). Cremas comerciales (Vichy, Heliocare -Helio- e Isdin). Control= Sin irradiación, sin tratamiento; C + UVB= Control irradiado sin tratamiento alguno; C Lipo+UVB= Control irradiado en el que solo se aplican liposomas (sin contener compuesto activo alguno). RESV= Resveratrol; P+Q= PTER+QUER.

60 **Figura 3.** Muestra el grosor (μm) de la epidermis tratada con diferentes composiciones antes (columna de la izquierda) o después (columna de la derecha) de la exposición a la irradiación (1 semana). Cremas comerciales (Vichy, Heliocare -Helio- e Isdin). C Lipo+UVB= Control irradiado en el que solo se aplican liposomas (sin contener compuesto activo alguno). RESV= Resveratrol; P+Q= PTER+QLTER.

65 En las figuras 1-3, el asterisco* mostrado en el histograma de barras representa una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$), cuando se comparan con los valores control.

Figura 4. Muestra el incremento de los pliegues con respecto al día 0 (1 semana después de la pre-exposición a TNCB y el inicio de la exposición continuada en días alternos) en el ensayo con respecto a la inducción de dermatitis atópica experimental con TNCB.

5 **Figura 5.** Muestra la pérdida de fluido transepidérmico 24 horas después de la 4ª exposición a TNCB en el ensayo con respecto a la inducción de dermatitis atópica experimental con TNCB.

Figura 6. Muestra las lesiones 24 horas después de la 4ª exposición a TNCB en el ensayo con respecto a la inducción de dermatitis atópica experimental con TNCB.

10 **Figura 7.** Ilustra el protocolo desarrollado en el ensayo sobre la inducción de dermatitis atópica experimental con TNCB.

15 **Figura 8.** Muestra el incremento de los pliegues cutáneos en referencia al día 0 del tratamiento con TPA en el ensayo con respecto a la inducción de psoriasis experimental con TPA

Figura 9. Muestra la pérdida de fluido transepidérmico (TEWL) 24 horas después de la 7ª exposición a TPA en el ensayo concerniente a la inducción de psoriasis experimental con TPA.

20 **Figura 10.** Muestra la evolución de las lesiones con la exposición a TPA en el ensayo concerniente a la inducción de psoriasis experimental con TPA.

- A. Imagen de un ratón 24 horas después de 3 exposiciones diarias de 2 nmoles de TPA;
- B. Imagen del mismo ratón 24 horas después de 6 exposiciones diarias de 2 nmoles de TPA;
- C. Imagen de psoriasis real en el dedo de un paciente (Imagen del Dermatology Image Atlas);
- D. Imágenes de psoriasis real en la rodilla de un paciente (Imagen del Dermatology Image Atlas).

25 **Figura 11.** Muestra el protocolo desarrollado en el ensayo concerniente a la inducción de psoriasis experimental con TPA.

30 **Figura 12.** Muestra el protocolo desarrollado en el ensayo concerniente a la inducción de hipersensibilidad experimental por contacto con oxazolona.

35 **Figura 13.** Muestra la absorción de polifenoles, específicamente el espectro de absorción de diferentes soluciones de 1 mM de cada uno de los polifenoles (PTER, Resveratrol y QUER), en etanol puro, en el ensayo sobre la evaluación de la capacidad del filtro mecánico de los polifenoles.

40 **Figura 14.** Muestra el estado de los ratones tras la exposición crónica a UV-B en el ensayo sobre la evaluación del papel fotoprotector de los polifenoles. Es una fotografía de los diferentes grupos experimentales después de 25 semanas de exposición crónica a 180 mJ/cm² (tres veces a la semana). Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B.

45 **Figura 15.** Muestra la evolución del desarrollo de las lesiones en el ensayo sobre la evaluación del papel fotoprotector de los polifenoles. Los primeros signos de lesiones precancerosas de más de 1 mm de diámetro en los diferentes grupos experimentales después de 30 semanas de exposición crónica a 180 mJ/cm² (tres veces a la semana). Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B.

50 **Figura 16.** Muestra el estudio anatomopatológico de la piel tras la exposición crónica a UV-B. Evaluación anatomopatológica de secciones histológicas de ratones tras 30 semanas de exposición crónica a 180 mJ/cm² (tres veces a la semana). Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B.

55 **Figura 17.** Muestra los pliegues de la piel después de la administración continua del tratamiento en el ensayo sobre la evaluación del efecto de los diferentes polifenoles sobre la dermatitis La aplicación de los tratamientos 10 µmoles/ratón de polifenoles y de 0,5 µmoles/ratón de dexametasona se realizó a diario en un tercio de la zona dorsal de los ratones durante 6 días consecutivos. El pliegue de la piel se midió con la ayuda de un compás vernier. * p>0,001 con respecto al control. ANOVA seguido por un test Tukey.

60 **Figura 18.** Muestra las secciones histológicas que representan las diferentes condiciones de experimentación en el ensayo sobre la evaluación de la protección frente a una exposición grave a la radiación UV-B. La aplicación de tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se realizó 20 minutos antes o

65

después de la irradiación con 360mJ/cm² de UV-B. Se sacrificó a los ratones 24 horas después de la irradiación con UV-B. Esta figura indica los cambios en el grosor de la epidermis.

Figura 19. Muestra el incremento de los pliegues cutáneos 24 horas después de la primera administración de TNCB en el ensayo con respecto a la protección en un modelo experimental de dermatitis atópica inducida por TNCB. La aplicación de tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 24 horas antes (día 0) de la aplicación de 100 µl de 1% de TNCB en ratones ya sensibilizados a 1 TNCB. El pliegue cutáneo se midió con un calibrador y se calculó el incremento con respecto al día 0. * p>0,05 con respecto al control; †p>0,05 con respecto al control tratado con TNCB. ANOVA seguido por un test Tukey.

Figura 20. Muestra la evolución de las lesiones en el modelo de dermatitis atópica en el ensayo sobre la evaluación macroscópica de las lesiones. La aplicación de tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 24 horas antes de la aplicación de 100 µl de 1% de TNCB en ratones ya sensibilizados a 1 TNCB. La medición de la pérdida de agua para transmisión epidémica (TEWL) se evaluó con el sistema Tewameter TM 210 (CK electronics, Alemania). * p>0,05 con respecto al control; †p>0,05 con respecto al control tratado con liposomas vacíos. ANOVA seguido por un test Tukey.

Figura 21. Muestra la evaluación de los ratones en el modelo de dermatitis atópica en el ensayo sobre la evaluación macroscópica de las lesiones. La aplicación de tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 24 horas antes de la aplicación de 100 µl de 1% de TNCB cada 2 días en ratones ya sensibilizados a 1 TNCB. Y hasta 4 aplicaciones de TNCB.

Figura 22. Muestra el incremento de los pliegues cutáneos 24 horas después de la administración de oxazolona, en el ensayo con respecto a la protección contra un modelo de hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona. La aplicación de tratamientos (1 µmoles/ratón de polifenoles, 20 mg de diprosone) se realizó 24 horas antes (día 0) de la aplicación de 20 µl de 2,5% de oxazolona en etanol en los oídos de los ratones, sensibilizados previamente a oxazolona. El pliegue cutáneo se midió con un calibrador y se calculó el incremento con respecto al día 0. * p>0,05 con respecto al control tratado con oxazolona; †p>0,05 con respecto al control tratado con diprosone antes de la aplicación de oxazolona. ANOVA seguido por un test Tukey.

Figura 23. Muestra la evolución del incremento de los pliegues cutáneos en la referencia al día 0 mediante el procedimiento en el ensayo sobre la protección contra un modelo de psoriasis inducida por TPA. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA. Esta guía de administración se repitió durante 6 días consecutivos. El pliegue cutáneo se midió con un calibrador y se calculó el incremento con respecto al día 0.

Figura 24. Muestra el incremento de los pliegues cutáneos 24 horas después de la primera administración de TPA en el ensayo con respecto a la protección en un modelo de psoriasis inducida por TPA. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA. El pliegue cutáneo se midió con un calibrador y se calculó el incremento con respecto al día 0. * p>0,05 con respecto al control. ANOVA seguido por un test Tukey.

Figura 25. Muestra el pliegue cutáneo 24 horas después de la tercera administración de TPA en el ensayo con respecto a la protección en un modelo de psoriasis inducida por TPA. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA. El pliegue cutáneo se midió con un calibrador y se calculó el incremento con respecto al día 0. * p>0,05 con respecto al control; †p>0,05 con respecto al grupo tratado con TNCB. ANOVA seguido por un test Tukey.

Figura 26. Muestra la vista macroscópica de los ratones en el modelo de psoriasis en el ensayo con respecto a la protección en un modelo de psoriasis inducida por TPA. Las fotos se tomaron **(A)** 24 horas después de la administración de TPA y **(B)** 24 horas después de la 7ª administración de TPA. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA.

Figura 27. Muestra la evaluación del descamado 24 horas después de siete administraciones de TPA en el ensayo con respecto a la protección en un modelo de psoriasis inducida por TPA. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA. El aspecto del descamado de la piel se cuantificó en una escala de 0-3, siendo 0 nada, 1, leve; 2, moderado, 3, grave. Y el medio de cada grupo indicó el grado de inflamación.

Figura 28. Muestra el análisis histológico del procedimiento en la psoriasis. La aplicación de los tratamientos (10 µmoles/ratón de polifenoles, 0,5 µmoles/ratón de dexametasona) se realizó 30 minutos antes de la aplicación de 2 nmol/ratón de TPA. Imagen de una vista microscópica de un corte de 5 µm con tinción de hematoxilina-eosina de los ratones a las 24 horas (A) y 72 horas (B) después de su tratamiento con 2 nmoles de TPA a día durante 7 días.

Descripción detallada de la invención

Se llevaron a cabo estudios para evaluar la capacidad de las composiciones de la invención para prevenir enfermedades cutáneas (tal como el cáncer de piel) inducidas por radiación con ultravioleta B mediante irradiación aguda a una dosis de 360 mJ/cm².

Protocolo para la exposición a radiación UVB.

Para realizar la exposición a UVB se usó una cámara actualizada especialmente (Crosslinker equipada con 5 tubos que emite 80% de la radiación como UVB, con una emisión máxima a 312 nm).

Se usaron protocolos de exposición aguda a UVB: Los ratones fueron sometidos a una única exposición de 0 mJ/cm². El estudio se realizó a las 24 horas de la exposición. Este protocolo se usó para evaluar el efecto fotoprotector de los compuestos estudiados. Con el mismo protocolo de fase aguda, se irradió a los ratones de todos los grupos. Después, los ratones permanecieron en el área de almacenamiento animal durante una semana para ver la evolución de la respuesta inflamatoria y el edema.

Administración y dosis de los compuestos en estudio.

Para los estudios de exposición a UVB (crónica o aguda) se realizó una administración tópica en la parte dorsal del ratón. Los protectores solares comerciales se aplicaron directamente en el ratón. Los polifenoles en el estudio se administraron en una preparación de liposomas diluidos a 1:1 con el polímero Carbopol que será el vehículo para estos liposomas. Cada dosis de polifenol administrada fue de 10 µmol/ratón, como ácido libre.

Parámetros indicadores de daños cutáneos.

1. Formación de edema: el grosor de los pliegues cutáneos se determinó con un compás 24 horas después de la primera exposición.
2. Estudio del grosor de la epidermis tras la exposición a irradiación aguda (360mJ/cm² 24 horas y 7 días después de la irradiación).
3. Estudios histológicos: Medición en las imágenes obtenidas de las secciones histológicas del grosor de la epidermis.

Estudios histológicos.

Para los estudios de la exposición aguda se tomaron muestras de piel de la parte dorsal del ratón. Estas muestras se fijaron con 4% de paraformaldehído (24 horas) y se incluyeron en parafina. Después de cortar las muestras, éstas se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Estudio del espectro de absorción de los diferentes compuestos.

Se preparó una solución de 1 mM de cada polifenol (PTER, Resveratrol y QUER) en etanol absoluto (calidad HPLC; Quima) y el espectro de absorción se estudió entre 200 y 800 nm usando un Multiskan Spectrum (ThermoScientific).

Procedimientos de fotocarcinogénesis (exposición crónica a radiación UV-B).

El papel de la radiación UV-B en la formación de tumores es bien conocido. La exposición continua a UV-B estimula la formación de estrés oxidativo/nitrosativo junto con alteraciones en el ADN, proteínas etc. que activa varios factores de transcripción (entre ellos NF-κB y AP-1), incremento de la actividad de la telomerasa, estrés etc., que a su vez induce carcinogénesis,

Además, la exposición a UV-B incrementa la expresión y los niveles de proteínas antiapoptóticas, que se correlacionan con el incremento de la proliferación y determinados marcadores de inflamación.

Los ratones elegidos para este estudio fueron SKH-1. Estos ratones tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores tras la exposición crónica a dosis bajas de radiación UV (comparable a la exposición a la que podría estar sometido un ser humano a diario).

El protocolo usado fue el protocolo normalizado, en el que se irradió a varios ratones tres veces a la semana con una dosis de 180 mJ/cm² con exposiciones durante 24 semanas; no obstante, durante el ensayo el protocolo se modificó alargando el tiempo de exposición hasta 28 semanas, con el fin de obtener más pruebas del efecto fotoprotector sobre los diferentes tratamientos usados.

La dosis de exposición fue 180 mJ/cm², ya que se ha determinado en ensayos anteriores que esta era la dosis eritémica mínima (DEM) para este tipo de roedor.

En este estudio se incluyeron una serie de diferentes fotoprotectores comerciales:

- 5
- Vichy: Capital Soleil SPF-50+ (Vichy Laboratoires).
 - Isdin: Photoprotector Isdin Extrem (SPF-40 (Isdin SA)
 - Heliocare: Heliocare gel Protection Ultra 90 (Difa Cooper S.P.A.)
- 10 Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B.

Los grupos, de 20 ratones, para esta evaluación fueron:

- 15
- No tratados.
 - Compuesto de referencia Vichy anterior: 200 µl de Isdin aplicado 20 minutos antes de la irradiación.
- 20
- Compuesto de referencia Isdin previo: 200 µl de Isdin aplicado 20 minutos antes de la irradiación.
 - Compuesto de referencia Heliocare anterior: 200 µl de Heliocare aplicado 20 minutos antes de la irradiación.
- 25
- Medio anterior: 200 µl de liposomas sometidos al vacío aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
 - Resveratrol anterior: 200 µl de liposomas de Resveratrol (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- 30
- PTER anterior: 200 µl de liposomas de PTER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
 - QUER anterior: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
 - PTER + QLTER anterior: 200 µl de liposomas de PTER + QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.

35 UV-B induce edema y eritema a corto plazo. Esta inflamación es crucial para el proceso de hiperproliferación.

40 Las células de la piel expuestas a UV tienen niveles más altos del factor de transcripción nuclear NF-κB, este factor controla el resultado de COX-2 y iNOS, entre otras, una razón por la cual la UV-B es una clara causa de inflamación cutánea.

Con el objetivo de evaluar los efectos de los compuestos fotoprotectores estudiados, ratones SKH-1 hembra de entre 6 y 8 semanas de edad se sometieron a una única exposición de 360 mJ/cm².

45 Para la exposición a irradiación ultravioleta B (UVB) se usó una cámara específicamente preparada, disponible en el laboratorio de los inventores (Crosslinker; Bio-Link BLX 254) equipada con 5 tubos que emite 80% de la radiación como UVB, con una emisión máxima a 312 nm.

Los dos protocolos de exposición a UV-B usados fueron:

- 50
- Exposición intensa después de una única exposición de 360 mJ/cm². El estudio se realizó a 24 horas después de la exposición. Este protocolo se usó para evaluar el efecto fotoprotector de los compuestos estudiados.
 - Exposición intensa después de una única exposición de 360 mJ/cm². El estudio se realizó a 1 semana después de la exposición. Los ratones permanecieron en las jaulas durante una semana para ver la evolución de la respuesta inflamatoria y edematosa.
- 55

60 Como referencia se usaron varios productos fotoprotectores comerciales (Vichy, Isdin y Heliocare). Los compuestos de referencia, además de los productos objeto de este estudio, se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos después o 20 minutos antes de la irradiación con UV-B, para determinar si la reacción observada se debía a un efecto del filtro solar o no.

Los grupos, de 5 ratones, para esta evaluación fueron:

- 65
- No tratados.

- Compuesto de referencia Vichy anterior: 200 µl de Isdin aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- Compuesto de referencia Vichy posterior: 200 µl de Isdin aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- Compuesto de referencia Isdin previo: 200 µl de Isdin aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- Compuesto de referencia Isdin posterior: 200 µl de Isdin aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- 5 • Compuesto de referencia Heliocare anterior: 200 µl de Heliocare aplicado 20 minutos antes de la irradiación.
- Compuesto de referencia Heliocare posterior: 200 µl de Heliocare aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- Medio anterior: 200 µl de liposomas sometidos al vacío aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- Medio posterior: 200 µl de liposomas al vacío aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- 10 • Resveratrol anterior: 200 µl de liposomas de Resveratrol (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- Resveratrol posterior: 200 µl de liposomas de Resveratrol (10 µmol en total) aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- PTER anterior: 200 µl de liposomas de PTER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- 15 • PTER posterior: 200 µl de liposomas de PTER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- QUER anterior: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- QUER posterior: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- 20 • PTER + QLTER anterior: 200 µl de liposomas de PTER + QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos antes de la irradiación.
- PTER + QUER posterior: 200 µl de liposomas de PTER + QUER (10 µmol en total) aplicados 20 minutos después de la irradiación.
- 25 A las 24 horas o 1 semana de la administración de los diferentes tratamientos se sacrificó a los ratones y su piel se fijó con 4% de PFA.

Grosor de la oreja

- 30 El edema se calculó como la diferencia entre el grosor que se produjo en las orejas, antes de los resultados de la reacción, y su grosor 24 horas después, y se midió con un calibrador.
- El cambio se expresó como el incremento relativo en relación con el día 0.

35 Evaluación macroscópica de la piel.

Los ratones se observaron a diario para detectar cualquier cambio de aspecto de la piel o cualquier cambio general.

- 40 Asimismo, en determinados días específicos antes de su sacrificio, los ratones fueron evaluados por un veterinario que analizó las lesiones cutáneas y las cuantificó en función de:

- Eritema: enrojecimiento de la piel condicionado por la inflamación debido al exceso de irrigación sanguínea por la dilatación de los vasos sanguíneos.
- Excoriación: o irritación de la piel con un aspecto hojaldrado, incremento del descamado de la piel que podría tener como resultado hiperqueratosis.
- 45 • La profundidad de la lesión que podría alcanzar la dermis y producir llagas o úlceras.

- 50 Cada variable se evaluó en una escala de 0-4, o para ninguna, 2 para moderada, 3 marcada y 4 muy marcada. La adición de los 3 valores de cada ratón indicó el grado de inflamación.

Durante el proceso de fotocarcinogénesis, la presencia de diferentes tumores se siguió y cuantificó durante el proceso. Cualquier lesión de más de 1 mm de diámetro se consideró una lesión.

55 Análisis microscópico.

Se usaron técnicas histoquímicas para estudiar los tejidos cutáneos de los diferentes procedimientos a nivel microscópico.

- 60 Los tejidos se fijaron en 4% de formaldehído en PBS durante 24 horas a 22 °C. Después de fijar los tejidos, se les tuvo que deshidratar en cantidades elevadas de etanol y se colocaron en una mezcla hidrófoba y de xileno para permitir que la parafina entre en los tejidos para proporcionar una consistencia suficiente para cortarla muy fina en un microtomo.

Las muestras en parafina se procesaron con el microtomo y se obtuvieron cortes de aproximadamente 5-10 μm . Las muestras se expandieron sobre una gota de gelatina a 37°C y se recogieron en diapositivas de información generalizadas,

- 5 Para otros procedimientos fue necesario eliminar la parafina a temperaturas superiores a 60 °C, seguido de lavado de las muestras con xileno, y rehidratando con etanol.

La hematoxilina es un colorante catiónico, mientras que la eosina es un colorante aniónico que pertenece a los xantenos. Por tanto, el núcleo se tiñe de azul y el citoplasma en rosa.

10

El protocolo usado para la tinción de las muestras fue:

- 15
1. Incubación con hematoxilina de Mayer durante 10-15 minutos.
 2. Lavar con agua corriente hasta que tome un color azulado.
 3. Incubar con eosina (1% y durante 2-4 minutos.
 4. Eliminar la eosina restante en etanol 70.
 5. Deshidratación.
 6. Aclarar con xilol durante 3 minutos.
 7. Dejar que las bacterias se secan en el horno a 37 °C.
- 20

Análisis estadístico.

25 Todos los resultados se expresaron como desviación estándar \pm medias. La desviación estándar se representó en forma de barras de error, en alguno casos solo se mostraron las semibarras positivas para simplificar los gráficos.

25

Los datos se analizaron en base a las variaciones (ANOVA) de uno o más factores o ensayos, según sea adecuado. La homogeneidad de las variantes se analizó con la prueba de Levene. La hipótesis nula se aceptó para todos los valores de los ensayos en los que el valor F no fue significativo con un valor de p superior a 0,05. Los datos, para los cuales el valor de F fue significativo, se analizaron con la prueba de Turkey con un valor p de 0,05.

30

Los programas informáticos usados fueron Excel para los cálculos y los gráficos, y para la estadística se usó SPSS versión 14.0 para Windows (SPSS Inc), la Universidad de Valencia tiene una licencia de usuario para este.

Ejemplos

35

Ejemplo 1. Modelo experimental de animales.

40 Como modelos de experimentación se usaron ratones de la cepa SKH-1 proporcionados por Charles River Company. Son ratones inmunocompetentes sin pelo. Los grupos experimentales se formaron con ratones hembra de 3 a 4 semanas de edad como se muestra en la **Tabla 2**. Cada grupo experimental de fotoprotección estaba compuesto por entre 5 y 6 animales. En estos estudios, cada grupo experimental estaba compuesto por 20 ratones.

Tabla 2

GRUPO	NOMBRE	TRATAMIENTO	EXPOSICIÓN A UVB
I	Control negativo	Vehículo liposómico	No
IIIt	UVBa	Vehículo liposómico	20 min tras el tto.
IIa	UVBb	Vehículo liposómico	20 min antes del tto
IIIIt	RESa	Liposomas de RES	20 min tras el tto.
IIIa	RESb	Liposomas de RES	20 min antes del tto
IVt	PTERa	Liposomas de PTER	20 min tras el tto.
IVa	PTERb	Liposomas de PTER	20 min antes del tto
Vt	QUERa	Liposomas de QUER	20 min tras el tto.
Va	QUERb	Liposomas de QUER	20 min antes del tto
VIIt	(PTER+QUER) ^a	Liposomas de PTER+QUER	20 min tras el tto.
VIa	(PTER+QUER) ^b	Liposomas de PTER+QUER	20 min antes del tto.
VIIIt	ISDINa		20 min tras el tto.
VIIa	ISDINb		20 min antes del tto.
VIIIIt	HELICAREa		20 min tras el tto.
VIIIa	HELIOCAREb		20 min antes del tto.
IXt	VICHYa		20 min tras el tto.
IXa	VICHYb		20 min antes del tto.

^b hace referencia a "antes"
^a hace referencia a "después"

Además, se realizaron ensayos *in vivo* en ratones SKH1-E hembra desnudas de 4 semanas de edad de Charles River, o en ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad.

5 Los estudios se realizaron en la Universidad de Valencia, Central Support Service of Experimental Research (CSSER) en el área de experimentación animal del servicio de producción de animales, a excepción de los estudios realizados por TNO Quality of Life (Leiden, Países Bajos), de hipersensibilidad a la oxazolona.

10 Una vez que los animales se aclimataron tras un periodo de 2 semanas, los experimentos se realizaron en cuartos equipados con barreras de protección en condiciones controladas con temperaturas de: 22 ± 2 °C, humedad relativa: 65-80%, 12 cambios de aire/hora y un fotoperiodo de 12/12 horas, de conformidad con el reglamento internacional actual [Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609, OJ L 358. 1, 12 de diciembre de 1987), Instituto Nacional de Salud (Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, Publ. Del NIH N° 85-23, 1985, USA)].

15 Se sacrificó a los animales mediante dislocación cervical. Las muestras se tomaron de los cuartos traseros para análisis histológico y se fijaron en 4% de formaldehído durante la noche. Las partes de las muestras se conservaron en N₂ líquido para los procedimientos de exposición a UV-B intensa y para la posterior evaluación de la inflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo.

20 Posteriormente se tomaron 20 µl de sangre y se añadieron a 80 µl of de N-etilmaleimida (NEM).

25 Tras la incubación durante aproximadamente 10 minutos se añadieron 100 µl de ácido perclórico (APC). Las muestras se conservaron en hielo después de agitar enérgicamente. Por último, todas las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20°C hasta el análisis de la proporción GSH (forma reducida del glutatión) / GSSG (forma oxidada del glutatión). La proporción GSH/GSSG es un parámetro que refleja el estado redox intracelular y en concreto el estado redox del tiol intracelular. Por tanto, se usan los cambios en esta proporción para evaluar el estrés oxidativo.

30 Se tomaron cuatro muestras de la piel de los cuartos traseros. Una para análisis histológico (se fijó durante la noche en 4% de formaldehído) y 3 se congelaron con nitrógeno líquido para el análisis bioquímico.

Ejemplo 2 - Preparación de liposomas.

35 Con independencia del o los polifenoles, la metodología de preparación de liposomas se usó de igual forma: lecitina de soja, diclorometano como disolvente orgánico en el caso de PTER y/p QUER y éter etílico como disolvente orgánico para resveratrol debido a su incapacidad para disolverse en diclorometano. La evaporación del disolvente orgánico se realizó usando un evaporador rotatorio conectado al vacío y una temperatura de 40 °C. Después de eliminar el disolvente orgánico, los liposomas se resuspendieron en BS diluido a 1 mM. En la concentración final de los liposomas, antes de añadir Carbopol, la concentración de cada polifenol fue polifenoles 20 µM determinada mediante HPLC/EM-EM.

40 Las etapas para preparar los liposomas se pueden resumir del siguiente modo:

1. Pesar los polifenoles y la lecitina

PTER	QUER	RESV	LECITINA
0,512 g	0,676 g	0,458 g	2,376

45 2. Disolver el polifenol y la lecitina en 40 ml de diclorometano (en el caso de PTER y/o QUER) o 140 ml de éter etílico (en el caso del resveratrol).

50 3. Introducir la solución en un matraz evaporador rotatorio y se fijó al dispositivo. Una vez que todo el disolvente se ha evaporado, cortar el vacío previsto y esperar durante 15 minutos, para eliminar todos los restos de disolvente que puedan haber aparecido.

4. Añadir 20 ml de PBS diluido (1mM) en el matraz evaporador rotatorio volver a fijar el dispositivo, pero esta vez sin vacío.

5. Los liposomas formados se recogen en un tubo de 50 ml.

55 6. Sonicación de liposomas (6 segundos, 25 ciclos, con un intervalo de 3 segundos entre cada ciclo; *alta intensidad*).

7. Dilución 1:1 con Carbopol (concentración final de 10 µmoles/200 µl)

8. Para evitar la posible contaminación se añade Phenonip (6 ml de Phenonip por 1000 ml de preparación).

60 Los liposomas control se prepararon del mismo modo que los de PTER y QUER pero solo contienen lecitina (2,376 g).

Los procedimientos para obtener liposomas se realizaron en nuestros laboratorios en colaboración con la Colloids Research Unit (Dept. of Chemistry and Physics; Univ. de Valencia).

Los liposomas se pueden cargar con diversos principios activos, tales como polifenoles. Debido a su capacidad para penetrar en la piel, pueden portar estos principios activos a través de largas distancias en la piel y detenerse en un punto determinado. Esta es la razón por la cual los liposomas se pueden usar en terapia dermatológica. Existen diversos productos que contienen polifenoles que proceden del té verde (Replenix; Kaplan cosmetic Surgery Centers), y resveratrol que procede de uvas (Resveraderm; SesDERMA Laboratorios).

Se usó una mezcla de lecitina de soja para obtener liposomas; esta es una mezcla natural de aproximadamente un 90% de fosfatidilcolina y otros ácidos grasos. GUINAMA S.L (Valencia, España) proporcionó la lecitina de soja (pureza del 99%).

Se usaron disolventes orgánicos polares para solubilidad, tal como diclorometano (Sigma) para el PTER ((CML Europe BV) Y QUER (Sigma) y éter (Sigma) para el Resveratrol (Sigma)

La mezcla ideal para obtener liposomas contenía:

- 5,9 (p/v) de lecitina, 1,28 (w/v) de PTER y 1,69 (p/v) de QUER, disueltos en diclorometano.
- 1,69 (p/v) de lecitina y 1,15 (p/v) de PTER de Resveratrol disueltos en éter.

El empaquetamiento microscópico de los diferentes polifenoles se consiguió mediante la deshidratación de la lecitina de soja a 40 °C en un evaporador rotatorio de vacío, que después se hidrató con una solución de fosfato 1 mM a pH 7 a 20 °C para una concentración final de 0,1 mM por compuesto en la solución final.

Los liposomas se normalizaron en relación con el tamaño de las partículas observando la morfología con un microscopio. La concentración de los polifenoles en la suspensión de liposomas se cuantificó mediante HPLC-EM/EM.

La solución era Carbopol 940 (Guinama) estabilizado en una dilución 1:1, añadiendo 0,6% (v/v) del conservante antimicrobiano Phenonip (Guinama), que obtuvo una solución de liposomas con 10 μ moles para cada polifenol / 200 μ l.

La administración de los liposomas se realizó aplicando y suavizando una película homogénea de la crema en la parte dorsal del ratón con una micropipeta automática.

Los compuestos se aplicaron de acuerdo con el protocolo de administración descrito en cada procedimiento en el que:

- Liposomas vacío: liposomas sin carga.
- Liposomas de PTER: 1 μ mol/ 20 μ l de crema.
- Liposomas de QUER: 1 μ mol/ 20 μ l de crema.
- Liposomas de PTER + QUER: 1 μ mol de cada compuesto/ 20 μ l de crema.
- Liposomas de Resveratrol: 1 μ mol/ 20 μ l de crema.

Ejemplo 3. Determinación del pliegue cutáneo 24 horas después de la irradiación.

El pliegue cutáneo se midió realizando un pliegue sobre la piel de la parte dorsal de los ratones, desde la axila a las caderas; el pliegue se midió con un calibrador (compás pie de rey).

El incremento del pliegue se calculó mediante la diferencia entre el punto inicial, antes de los efectos de la reacción, y el grosor en cada punto.

La **Fig. 1** muestra los resultados obtenidos en la medición del grosor de la piel de los cuatros traseros de los ratones (en los que se han aplicado varios tratamientos). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y se contrastaron con el test de Tukey y se agruparon de acuerdo con las diferencias significativas. Las desviaciones estándar se incorporan en la **Fig. 1**. Como se muestra en la **Fig. 1**, la combinación de PTER + QUER, y también PTER por separado, es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin) y que RESV. Por tanto, la combinación de PTER + QUER, o PTER por separado se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades cutáneas inducidas por radiación a ultravioleta B.

Además, la **Figura 1** también muestra que la combinación PTER + QUER o PTER por separado es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin), y que RESV. Por tanto, la combinación de PTER + QUER podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos inducidos por la radiación ultravioleta.

Ejemplo 4. Medición del grosor de la epidermis después de irradiación (24 horas)

Para medir el grosor de la epidermis para evaluar la posible hiperplasia se usó un programa de ordenador, Image J, calibrado con la ayuda de una cámara Neubauer que permitió la medición de la epidermis. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y se contrastaron con el test de Tukey y se agruparon de acuerdo con las diferencias significativas. Como se muestra en la **Fig. 2**, el uso de PTER solo es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin). Por tanto, PTER solo se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades, daños o lesiones cutáneas inducidas por radiación ultravioleta B.

Además, la **Fig. 2** también muestra que la combinación PTER + QUER es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales ((Vichy, Heliocare e Isdin), y que RESV. Por tanto, la combinación de PTER + QUER, así como PTER por separado, podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos inducidos por la radiación ultravioleta B. En este experimento, control significa ausencia de radiación y ausencia de tratamiento.

Ejemplo 5. Medición del grosor de la epidermis después de irradiación (1 semana)

La evaluación del grosor de la piel se llevó a cabo usando un software informático (IMAGE J). Los resultados obtenidos mediante ANOVA se contrastaron con el test de Tukey y se agruparon de acuerdo con las diferencias significativas. Como se muestra en la **Figura 3**, el uso de PTER por separado es más eficiente como fotoprotector cuando se aplica antes de la exposición a UVB, que las cremas comerciales (Vichy, Heliocare e Isdin). Por tanto, PTER por separado se podría usar de forma eficaz en la prevención de enfermedades, daños o lesiones cutáneas inducidas por radiación ultravioleta B.

Además, la **Figura 3** también muestra que la combinación PTER + QUER es más eficiente en el tratamiento de enfermedades, lesiones o daños cutáneos causados por radiación, cuando se aplica después de la exposición a UVB, que las cremas comerciales ((Vichy, Heliocare e Isdin), y que RESV. Por tanto, la combinación de PTER + QUER, así como PTER por separado, podría usarse de forma eficiente en el tratamiento de enfermedades cutáneas inducidas por la radiación ultravioleta B.

Ejemplo 6. Inducción de dermatitis atópica experimental con TNCB.

Con respecto al agente "2-cloro-1,3,5-trinitrobenzeno o 2,4,6-trinitroclorobenceno" (TNCB), también conocido habitualmente como cloruro de Pycrill, este es un agente químico que induce un proceso alérgico combinado con la inflamación de la piel de los ratones. Además, la administración continua de pomada de TNCB aumentó la producción de linfocitos T, mastocitos e IgE en suero, como se produce entre pacientes humanos con dermatitis atópica.

Para producir lesiones de dermatitis atópica, se usó el protocolo descrito por Matsumoto, aplicando 100 µl de una solución de 1% de TNCB en acetona [3 aplicaciones de 33 µl (con la ayuda de un dispensador de una micropipeta automática) para prevenir que se extienda el volumen y para mantener el área de la lesión más localizada] en la parte dorsal de los ratones SKH-1.

En contraste con el protocolo propuesto por Matsumoto, en el que el tratamiento con TNCB duró 32 días tras un periodo de prueba previo con TNCB, se desarrolló un protocolo que consiste en una prueba con TNCB y una semana después 4 dosis seguidas de TNCB cada 2 días. Protocolos más cortos produjeron un incremento del pliegue cutáneo como se muestra en la **Figura 4**, como en la pérdida de fluido transepidérmico como se muestra en la **Figura 5**, siendo estas lesiones obvias a nivel macroscópico como se muestra en la **Figura 6**.

Por tanto, el protocolo desarrollado en este procedimiento fue el mostrado en la **Figura 7**. Como tratamiento estándar, se usó dexametasona (de Sigma, solución 25 mM en acetona). La administración de los productos a analizar y el tratamiento estándar se administraron en días alternos, comenzando 24 horas antes de la primera aplicación continua de TNCB y después de exponer a los ratones a TNCB (1 semana antes).

Los grupos, de 5 ratones, para esta evaluación fueron:

- No tratados.
- Compuesto de referencia: 0,5 µmoles de dexametasona (20 µl de una solución 25mM en acetona).
- Medio: 200 µl de liposomas sometidos a vacío.
- Resveratrol: 200 µl de liposomas de Resveratrol (10 µmol en total).
- PTER: 200 µl de liposomas de PTER (10 µmol en total).
- QUER: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total).
- PTER + QUER: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total).

A las 24 horas (Día 9) después de la última administración de los diferentes tratamientos se sacrificó a los ratones y su piel se fijó con 4% de PFA.

Ejemplo 7. Inducción experimental de psoriasis con TPA.

Para la inducción de la psoriasis se usó el agente "acetato de 12-O-tetradecanoilforbol-13" (TPA). En relación con el agente, "acetato de 12-O-tetradecanoilforbol-13" (TPA), también conocido habitualmente como "13-acetato de forbol 12-miristato" (PMA), es decir el diéster de forbol y un promotor fuerte de los tumores usados habitualmente en investigación biomédica para activar la transducción de señales mediante la enzima quinasa de la proteína C (PKC).

En referencia a la dosis de TPA necesaria para desarrollar la enfermedad en ratones SKH-1 sin pelo, algunos autores han usado dosis elevadas de 10-17 nmoles/ratón, la reproducción conseguida de la hiperplasia es similar a cómo se produce en ratones Balb/C, previamente afeitados, con psoriasis, y este modelo se usa ampliamente en los estudios de psoriasis. No obstante, estos modelos se usaron para evaluar los parámetros bioquímicos o moleculares después de solo una administración de TPA. Dado que nuestro objetivo era evaluar el progreso de las lesiones causadas por psoriasis en combinación con el uso de polifenoles, se usó un modelo de exposición continua y una concentración más débil de TPA a una dosis diaria de 2 nmoles de TPA durante un periodo de una semana, lo que permitió a los inventores observar el progreso de la psoriasis.

La inducción se realizó con 2 nmol es de TPA/ratón en un área de 1 cm² aplicando 10 µl de la solución 200 µM en acetona. Este protocolo de aplicación se llevó a cabo teniendo en cuenta que cuando se aplican 20 µl como se indica en el modelo, el volumen aumentó considerablemente y perdió su concentración, por lo que se decidió concentrarlo más.

Protocolos más cortos produjeron un incremento del pliegue cutáneo como se muestra en la **Figura 8**, como en la pérdida de fluido transepidérmico (TEWL= como se muestra en la **Figura 9**, siendo estas lesiones obvias a nivel macroscópico como se muestra en la **Figura 10**.

Por tanto, el protocolo desarrollado en este procedimiento fue el mostrado en la **Figura 11**. Como tratamiento estándar, se usó dexametasona (de Sigma, solución 25 mM en acetona). La administración del tratamiento estándar y los productos a analizar se administraron 30 minutos antes de la aplicación de TPA, comenzando ambos el mismo día.

Los grupos, de 6 ratones, para esta evaluación fueron:

- No tratados.
- Compuesto de referencia: 0,5 µmoles de dexametasona (20 µl de una solución 25mM en acetona).
- Medio: 200 µl de liposomas sometidos a vacío.
- Resveratrol: 200 µl de liposomas de Resveratrol (10 µmol en total).
- PTER: 200 µl de liposomas de PTER (10 µmol en total).
- QUER: 200 µl de liposomas de QUER (10 µmol en total).
- PTER + QUER: 200 µl de liposomas de PTER + QUER (10 µmol en total).

A las 24 horas (Día 7) después de la última administración de los diferentes tratamientos y TPA, se sacrificó a 3 ratones de cada grupo y su piel se fijó con 4% de PFA. Los ratones restantes se mantuvieron en tratamiento sin exposición a TPA, para verificar si la piel se recuperaba más rápida con el tratamiento que por sí sola. A las 24 horas (Día 9) después de la última administración de los diferentes tratamientos se sacrificó al resto de los ratones y su piel se fijó con 4% de PFA.

Ejemplo 8. Inducción experimental de hipersensibilidad por contacto a oxazolona.

La aplicación de oxazolona tras la sensibilización a la misma sustancia produce una reacción de hipersensibilidad por contacto que aparece como una reacción eccematosa con infiltración de linfocitos y macrófagos, con edema de la epidermis.

Los ratones BALB/c se sensibilizan el día 0 mediante la aplicación, en el abdomen afeitado, de 100 µl de oxazolona al 1,5% en acetona (peso/v). Antes de la inducción de hipersensibilización se midió el grosor de la oreja con la ayuda de un calibrador (o compás pie de rey) (micrómetro Mitutoyo). La reacción se produjo el día 7 aplicando 20 µl de oxazolona al 2,5% en etanol (10 µl en cada lado de la oreja derecha).

Por tanto, el protocolo desarrollado en este procedimiento fue el mostrado en la **Figura 12**. Como medida de control se usó la oreja izquierda a la que se aplicaron 20 µl de etanol. Y se usó un tratamiento estándar, crema Diprosone[®] (Schering Plough B.V., Utrecht, Países Bajos), que contiene 0,5 mg de betametasona/ g.

Los grupos, de 8 ratones, para esta evaluación fueron:

- No tratados.
- Compuesto de referencia: 10 mg de crema Diprosone® en cada lado de la oreja, aplicados 30 minutos después de aplicar oxazolona el día 7.
- 5 • Medio: 10 µl de liposomas vacíos en cada lado de la oreja, aplicados 30 minutos antes de aplicar oxazolona el día 7.
- Resveratrol anterior: 10 µl de liposomas de Resveratrol en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 30 minutos antes de aplicar oxazolona el día 7.
- Resveratrol posterior: 10 µl de liposomas de Resveratrol en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 3-4 horas después de aplicar oxazolona el día 7.
- 10 • PTER anterior: 10 µl de liposomas de PTER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 30 minutos antes de aplicar oxazolona el día 7.
- PTER posterior: 10 µl de liposomas de PTER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 3-4 horas después de aplicar oxazolona el día 7.
- 15 • QUER anterior: 10 µl de liposomas de QUER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 30 minutos antes de aplicar oxazolona el día 7.
- QUER posterior: 10 µl de liposomas de QUER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 3-4 horas después de aplicar oxazolona el día 7.
- PTER + QUER anterior: 10 µl de liposomas de PTER + QUER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 30 minutos antes de aplicar oxazolona el día 7.
- 20 • PTER + QUER posterior: 10 µl de liposomas de PTER + QUER en cada lado de la oreja (1 µmol en total) aplicados 3-4 horas después de aplicar oxazolona el día 7.

A las 24 horas de la administración de la oxazolona día 1), se sacrificó a los ratones y ambas orejas se fijaron con 4% de PFA.

25 **Ejemplo 9. Pérdida de agua transdérmica.**

Algunas afecciones de la piel se caracterizan por un compromiso de las propiedades mecánicas de la piel, tal como en la esclerodermia y la psoriasis.

30 Sin embargo, la evaluación objetiva de estas características es compleja y la determinación de la pérdida de agua transepidérmica (PTEA o TEWL) evaluada mediante el sistema Tewameter TM 210 (CK electronics, Alemania) se considera un indicador de las funciones de las "barreras" cutáneas (g/h/cm²).

35 El fundamento físico de este tipo de medición se basa en la ley de difusión establecida por Adolf Fick en 1885:

$$\frac{dm}{dt} = -D \times A \times \frac{dp}{dx}$$

en la que:

- 40 A = superficie en m²
- m = transporte de agua (en g)
- t = tiempo (h)
- D = constante de difusión (= 0,0877 g/m·h·mm Hg)
- p = presión de vapor atmosférico (mm Hg)
- 45 x = distancia de la piel al punto de medición (m)

La ley de difusión dm/dt indica la masa por cm² transportado en un intervalo de tiempo que se proporcional al área A y la variación de la concentración por la distancia dc/dx. D representa el coeficiente de difusión de vapor de agua en el aire. Esta ley es válida únicamente dentro de una zona de difusión homogénea, que tiene la forma aproximada de un cilindro vacío. La densidad de gradiente resultante se registra indirectamente mediante dos equipos de detectores (temperatura y humedad relativa) analizados mediante un microprocesador.

En la sonda del sistema Tewameter TM 210 , los detectores de temperatura e hidratación, así como el circuito para medir y los datos para calibración, se localizan en el interior del sensor. El cabezal del sensor está hecho de un cilindro hueco y estrecho (diámetros= 100 mm, longitud= 20 mm) y su función es reducir la turbulencia del agua en el sensor.

Después de inmovilizar a los ratones, la sonda se colocó en su parte dorsal, en la misma área tratada con diferentes agentes químicos. Las lecturas de la TEWL se realizaron de forma continua hasta que se estabilizaron las métricas, que pueden producir entre 30-60 segundos de lectura.

Ejemplo 10. Efecto fotoprotector y anticarcinogénico durante la exposición crónica a irradiación UV-B.**Capacidad de filtro mecánico de los polifenoles.**

5 Con el fin de estudiar la capacidad de los polifenoles usados en este estudio, los inventores decidieron evaluar la absorción de la luz a través del espectro de luz ultravioleta como se muestra en la **Figura 13**.

Se confirmó que Resveratrol, así como PTER, tienen picos o máximos de absorción en el intervalo de la luz ultravioleta B, por el contrario QUER se absorbe en una proporción mayor en las longitudes de onda de la luz UV-A.

10

Función fotoprotectora de los polifenoles.

La siguiente fase del estudio era evaluar el componente fotoprotector (añadiendo los polifenoles antes de la exposición a UV-B) contra la posible capacidad de reparación de los polifenoles contra la fotocarcinogénesis (añadiendo polifenoles tras la exposición a UV-B).

15

Para este fin se evaluó la capacidad fotoprotectora después de la exposición crónica a UV-B como se muestra en la **Figura 14**. Se sometió a los ratones a 3 exposiciones a la semana durante 28 semanas hasta una dosis de 180 mJ/cm² de UV-B por exposición. Con este protocolo se inducen neoplasias que comienzan a mostrarse a partir de la semana doce. A lo largo del procedimiento, las lesiones precancerosas se evaluaron y se cuantificaron como se muestra en la **Figura 15**.

20

Si se comparan los efectos de los diferentes tratamientos en relación con los signos de lesiones, los inventores serán capaces de apreciar que en el grupo control, así como el tratado con liposomas vacíos, a partir de la semana 12 de exposición continua a UV-B, más del 50% de los ratones tenían tumores. Por el contrario, el tratamiento con polifenoles retrasó la manifestación de los tumores hasta aproximadamente la semana 20 en el caso de Resv y QUER. No obstante, con PTER y tras 30 semanas de exposición crónica a UV-B, solo el 10% de los ratones presentó lesiones, con PTER solo o en combinación con QUER. Este efecto protector fue superior al hallado en los fotoprotectores comerciales.

25

30

En relación con el número de lesiones por ratón, PTER y el combinado con QUER fueron los que proporcionaron la mayor protección, ya que el número de lesiones por ratón era nulo en comparación con cualquiera de los demás tratamientos. La Tabla 3 que figura a continuación muestra las lesiones por ratón: primeros signos de lesiones precancerosas de más de 1 mm de diámetro en los diferentes grupos experimentales después de 30 semanas de exposición crónica a 180 mJ/cm² (tres veces a la semana). Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B. Grupo de 20 ratones.

35

Tabla 3

40

	semanas	nºde grupo (media)	tumor/ratón	x
		20	24	30
Control		4,4	9,2	13,8
Liposomas libres		5,7	8,2	12,9
Liposomas con PTER		0,0	0,1	0,0
Liposomas con QUER		0,3	2,2	4,6
Liposomas con resveratrol		0,3	1,2	3,8
Liposomas con PTER + QUER		0,0	0,1	0,1
Vichy:		0,0	0,3	0,7
Heliocare:		0,0	0,5	1,06
Isdin:		0,1	0,5	0,6

Estudios anatomopatológicos.

45 En relación con el análisis histopatológico de los tumores inducidos por irradiación crónica de UV en ratones SKH1, se confirmó que el tratamiento con UV-B producía una fuerte acantosis debido, principalmente, al proceso inflamatorio; esto dio paso los primeros signos de tumores, principalmente de tipo carcinoma y no melanoma.

La gran mayoría de los dos cánceres de piel no melanoma son: carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas.

50

El uso de fotoprotectores comerciales protegí principalmente frente a la inflamación, aunque solo Vichy disminuyó el posible desarrollo de tumores.

El uso de polifenoles tenía efectos antiinflamatorios y anti-formación de tumores; PTER fue el compuesto que proporcionó los mayores beneficios. No obstante, en comparación con su homólogo resveratrol se observó una gran diferencia a nivel del efecto antiinflamatorio y de anti-formación de tumores. También presentó mejores resultados cuando se comparó con diferentes fotoprotectores comerciales.

Sobre la combinación de PTER y QUER, no se encontraron diferencias entre los usos de PTER solo o combinado en relación con su efecto fotoprotector, pero había una diferencia respecto a su efecto antiinflamatorio, como se comentará más adelante. Como se representa en la **Figura 16**, la **Tabla 4** siguiente muestra el estudio anatomopatológico de la piel tras la exposición crónica a UV-B, específicamente tras 30 semanas de exposición crónica a 180 mJ/cm² (tres veces a la semana). Tanto los compuestos de referencia como los sujetos de este estudio (10 µmoles/ratón de polifenoles o 200 µl de cada fotoprotector) se aplicaron en la parte dorsal de los ratones durante 20 minutos antes de su exposición a UV-B. Grupos de 20 ratones. Cada parámetro se midió de acuerdo con el grado de gravedad (+) leve -(+++ grave

Tabla 4

	UV	P Q + UV	Resv + UV	Isdin + UV	Heliocare + UV
Tumor (nº ratones x grupo)	13,8	0,1	3,8	0,7	1,1
Estroma					
Displasia		+	++	++	++
Fibrosis	Reactivo				
Acantosis	/+/+++		+++/>++	++	+++/>++
Acantolisis					
Paraqueratosis	+++		+		+
Inflamación	+++		++	++	++

Ejemplo 11. Efecto sobre la dermatitis.

Antes de evaluar los resultados de diferentes tratamientos en diferentes modelos de dermatitis, tenían que evaluarse los posibles efectos secundarios de la administración continua de polifenoles sobre la piel de los ratones como se muestra en la **Figura 17**. Con este fin, la dosis para esta evaluación diaria se administró durante 6 días consecutivos.

Como se puede observar, el tratamiento solo no afectó a los pliegues cutáneos después de un tratamiento crónico, no obstante, el uso crónico de corticoides (tal como dexametasona) sí tuvo efectos secundarios sobre la estructura de la piel.

Protección frente a la exposición aguda a radiación UV-B.

Habiendo visto la característica antiinflamatoria de los polifenoles como protección frente a la fotocarcinogénesis, la función antiinflamatoria se estudió tras una exposición intensa a UV-B. Los resultados obtenidos con medidas del grosor de la piel de las regiones dorsales de los cuatro ratones se muestran en la **Figura 1**.

Los polifenoles PTER y RESV individualmente y la combinación con PTER+QUER mostró un efecto beneficioso tras la exposición a irradiación UVB dado que se redujo la formación de edema.

Este incremento del grosor de la piel podría deberse al volumen causado principalmente por algún proceso inflamatorio o por la hiperproliferación de las células de la epidermis. Por tanto, fue necesario medir el grosor de la epidermis, como se muestra en la **Figura 2**.

Se observó una diferencia significativa en el grosor de la epidermis de os ratones tratados con polifenoles con respecto al grupo tratado únicamente con UV-B. De hecho, el tratamiento con PTER con o sin QUER produjo resultados mejores incluso que los fotoprotectores comerciales y Resveratrol.

En relación con el tiempo de aplicación del tratamiento no se observaron diferencias importantes entre las aplicaciones antes o después de la exposición a UV-B, a excepción de Resveratrol, que mostró un resultado diferente en relación con el tiempo de aplicación con respecto a su buen efecto de fotoprotección pero no como reparador.

Asimismo, cuando el grosor de la epidermis se analizó una semana después de la irradiación de 360 mJ/cm² de UV-B, se observó que los ratones tratados con polifenoles antes de la exposición a UV-B estaban protegidos frente al daño producido por la UV-B, mantuvieron los mismos resultados del grosor de la epidermis obtenidos 24 horas después de la irradiación, no hubo diferencias estadísticas. Si los polifenoles se aplicaron tras la irradiación se obtuvieron los mismos resultados, a excepción del QUER, que dio un peor pronóstico si se aplica tras la exposición a UV-B, los resultados fueron similares a los resultados observados en fotoprotectores comerciales, como se muestra en la **Figura 3** y la **Figura 18**.

Protección en un modelo experimental de dermatitis atópica inducida por TNCB.

El incremento de los pliegues cutáneos 24 horas después de la primera administración de TNCB se estudió como se muestra en la **Figura 19**.

En este modelo fue imposible medir el pliegue cutáneo, ya que había lesiones producidas a lo largo del proceso que no permitieron la correcta medición del grosor de la piel. No obstante, se observó que había incrementos del pliegue cutáneo 254 horas después de la primera exposición a TCNB, 1 semana después de la sensibilización previa con TNCB. Como se puede observar en la figura, la dexametasona así como el PTER (solo o combinado con QUER) disminuyó su efecto inflamatorio debido al agente TNCB.

También debería observarse que los liposomas vacíos no tenían efecto sobre los pliegues cutáneos, lo que muestra que los liposomas por sí solos no funcionan como filtros mecánicos, lo que no permite que el TNCB alcance su objetivo produciendo las lesiones esperadas.

Evaluación macroscópica de las lesiones.

Las lesiones se evaluaron con el fin de cuantificar las diferencias entre los diferentes tratamientos, como se muestra en la **Figura 20** y la **Figura 21**.

Se observó que desde el principio de la primera aplicación continua de TNCB, se producían cambios en el aspecto de la piel, cambios en el nivel de hidratación desde el principio de la primera exposición a TNCB y a lo largo del proceso.

A corto plazo, el análisis de los valores de TEWL mostró que para el tratamiento con TNCBA, así como para el pretratamiento con dexametasona o con liposomas vacíos se produjo un incremento estadístico significativo de la hidratación de la epidermis en relación con los valores basales.

No obstante, lo que también mostró el análisis de los resultados fue que en el caso de los tratamientos con polifenoles, especialmente en la combinación PTER-QUER, no se observaron diferencias estadísticas significativas en relación con la piel sin tratar (valor basal). Esto muestra que los polifenoles tienen un efecto hidratante sobre la epidermis, más que el agua sola, o un efecto protector frente a la agresión producida por TNCB.

En este momento, las diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas en relación con los valores obtenidos con TNCB, posiblemente porque había lesiones en todos los grupos, incluido el grupo tratado con dexametasona.

En relación con las lesiones existe una indicación de que los niveles bajos del grado de la lesión fueron en contraste con otros modelos, el protocolo para administrar el TNCB fue de una dosis menor, que también produjo lesiones menores pero más parecidas a las lesiones reales.

El hecho más importante que cabe destacar se refiere a la posible prevención o curación de la dermatitis atópica, la dexametasona no produjo ningún efecto beneficioso en relación con el índice de lesiones o en relación con el incremento del pliegue cutáneo. El PTER produjo lesiones menos graves que con el uso de dexametasona o con respecto a la falta de tratamiento.

Protección contra un modelo de hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona.

Los trastornos de la piel, tales como la hipersensibilidad de contacto, la dermatitis atópica y la psoriasis, se caracterizan por trastornos hiperproliferativos e inflamatorios de la piel.

El tratamiento actual de los trastornos de la piel incluye el uso de agentes antiinflamatorios, tales como glucocorticoides y agentes antiproliferativos. En este estudio se afirma que el uso de polifenoles naturales produce una mejora clínica de la dermatitis como se muestra en la **Figura 22**.

Los efectos de PTER sobre los trastornos de la piel se establecieron de acuerdo con procedimientos realizados en animales que mostraron una hipersensibilidad similar al contacto con la inflamación de la dermis, medido mediante el uso de oxazolona en la prevención del edema de la oreja.

Los resultados de este ensayo farmacológico *in vivo* que emularon los trastornos inflamatorios cutáneos relacionados con el sistema inmunitario indica que los polifenoles, en particular PTER, aplicados a la lesión (aplicados tras la administración de oxazolona) podía prevenir los cambios inflamatorios como resultado de la inflamación inducida por oxazolona. Se pueden observar resultados similares con diprosone.

Ejemplo 12. Efecto sobre la psoriasis inducida por TPA.**Estudio del edema en la psoriasis**

5 Dado que la aplicación de TPA sobre la piel produce vasodilatación, infiltración de leucocitos y edema, es interesante medir no solo la variación del pliegue cutáneo como el peso del tejido sino como perímetro de la inflamación cutánea, como se muestra en la **Figura 23**.

10 A la hora de evaluar el incremento del pliegue cutáneo durante el procedimiento (6 días consecutivos) se observaron 3 grupos diferentes. El primer grupo corresponde al grupo control y el tratado con dexametasona (0,5 µmoles/ratón 30 minutos antes de administrar TPA), no había diferencias entre estos durante el tratamiento, lo que indica que la dexametasona prevenía el desarrollo de psoriasis. El segundo grupo sería el formado por TPA, liposomas vacíos y Resv, en el que al menos durante la primera mitad del procedimiento la evolución fue similar con un incremento en la formación de edema.

15 Y, por último, el tercer grupo formado por el grupo de PTER, QUER y PTER + QUER, en el que se observó una importante disminución del incremento de los pliegues cutáneos, en el grupo de TPA, y significativamente diferente al menos 24 horas después de la primera administración como se muestra en la **Figura 24**.

20 Como se puede observar mediante el incremento del pliegue cutáneo, la aplicación de TPA sobre la piel de los ratones produce edema, una fuerte inflamación significativa, 24 horas después de la administración. La aplicación del producto de referencia, la dexametasona (0,5 µmoles/ratón) 30 minutos antes de la administración tópica de TPA, redujo significativamente el incremento del pliegue cutáneo.

25 Al mismo tiempo, los tratamientos con PTER, QUER y la combinación de ambos también disminuyeron significativamente la aparición de edema. Es importante observar que el uso de liposomas vacíos (no cargados) no tuvo ningún efecto sobre la aparición de edema., lo que indica que el efecto observado para PTER, QUER o PTER + QUER, no se debía a la composición de los liposomas sino que se debía a un efecto específicos de los polifenoles. Este efecto se corroboró en comparaciones con liposomas cargados con el polifenol en cuestión, resveratrol; esto no produjo ningún efecto sobre el incremento del pliegue cutáneo en comparación con el grupo de TPA.

30 Si el pliegue cutáneo se compara con 3 administraciones de TPA, en las que las lesiones a nivel macroscópico son obvias, se obtiene la **Figura 25**.

35 En este momento, fue obvio que el uso de PTER, QUER y una combinación de ambos producen un efecto de disminución sobre la inflamación producida por TPA.

Evaluación macroscópica de las lesiones.

40 Las lesiones se evaluaron con el fin de cuantificar las diferencias entre los diferentes tratamientos, como se muestra en la **Figura 26**.

45 Se da un valor numérico a las lesiones de acuerdo con la exoriación de las lesiones 24 horas después de las 7 administraciones de TPA, ya que esta fue la única alteración observada, no aparecieron indicaciones de eritema o úlceras.

El aspecto escamoso de la piel se cuantificó en una escala de 0-3, siendo 0 nada, 1, leve; 2, moderado, 3, grave. Y el medio de cada grupo indicó el grado de inflamación, como se muestra en la **Figura 2**.

50 Se puede observar que solo los grupos con PTER solo o en combinación con QUER eran los grupos con menos índices de exoriación o escamación.

Análisis histológico de las lesiones.

55 Este análisis se ilustra en la **Figura 28**.

60 Histológicamente, existe elongación de las crestas de Rete, con un grosor de la parte inferior (hiperplasia psoriasiforme), elongación y edema de las papilas, atrofia epidérmica suprapapilar con pústulas intracorneanas espongiiformes (de Kogoj), falta de estrato granular de hipogranulosis, paraqueratosis, microabsceso intraepidérmico de Munro, capilares papilares tortuosos y dilatados, infiltración linfocítica perivascular y pocos eosinófilos y plasmocitos.

65 La psoriasis es una dermatosis inflamatoria crónica que se caracteriza clínicamente por lesiones en forma de pápulas y eritema de escamación con abundantes escamas de color blanco perla. Su evolución es fastidiosa, aunque generalmente tiene una evolución crónica con periodos de exacerbación y remisión. Ha habido diferentes descripciones clínicas, aunque generalmente no es un marco fijo ya que puede haber variaciones dentro del mismo pacien-

te. Los inventores pueden ver muchas de estas durante los exámenes o durante las diferentes etapas de la evolución de la enfermedad.

5 Durante años se ha sabido que la hiperplasia de la epidermis en la psoriasis es secundaria a la hiperproliferación de los queratinocitos, que se caracteriza por el número de células en germinación en la etapa de proliferación y de la fragmentación del crecimiento en la epidermis. Se ha detectado un incremento del índice de mitosis y del número de células durante la fase clínica.

10 La característica histopatológica típica de una lesión psoriásica estable es la “hiperplasia psoriasiforme epidérmica” (Lever's Histopathology of the Skin. Décima edición). Se caracteriza por una acantosis epidérmica regular con crestas de Rete anchas en la base y estrechas en la parte superior, en la que normalmente se produce un adelgazamiento de la epidermis suprapapilar.

15 En el modelo de los inventores con inducción de psoriasis en el grupo con TPA, se observó esta papilomatosis; no obstante, no había estrechamiento de la epidermis suprapapilar. También se observó paraqueratosis hiperqueratosis,

20 Cuando se realizaron cortes en los ratones que se retiraron del tratamiento no se pusieron de manifiesto lesiones claras a nivel macroscópico; por tanto, no analizaron el nivel de excoiación ya que podría haber conducido a errores. No obstante, el análisis histológico indicó que la piel no era una piel sana. Por tanto, cuando se analizó extensamente, se confirmó que cuando las lesiones psoriásicas entran en un periodo de involución, la cronificación normal tiende a recuperarse, la paraqueratosis comienza a desaparecer y la epidermis comienza a adelgazarse. Asimismo, la papilomatosis desaparece aunque la morfología no alcanzó el nivel de la piel normal.

25 Comparando los diferentes grupos de tratamiento, se observó que el grupo tratado con dexametasona presentaba una epidermis muy fina sin papilomatosis o hiperqueratosis. En algunos puntos tampoco hubo indicios de lesiones en las glándulas sebáceas.

30 En referencia al grupo tratado con PTER, la diferencia más importante fue que no había signos de papilomatosis, pero había acantosis debido a una proliferación masiva. Y si los inventores compararon con el grupo de tratamiento únicamente con TPA o con liposomas vacíos, la acantosis fue menos pronunciada, igual que con la paraqueratosis.

35 Esto no se produjo con el grupo tratado con resveratrol, una estructura similar de PTER, ya que en este grupo la proliferación y la acantosis fueron menos agudas que en el grupo tratado con PTER. Además, comparando los diferentes tratamientos, el grupo tratado con resveratrol se asemeja más al grupo tratado con TPA, que el grupo con PTER.

Asimismo, la combinación de PTER con QUER encontró un fenotipo similar al hallado con PTER solo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. PTER, 3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-trans-resveratrol opcionalmente en combinación con QUER, 3,3,,4' 5,6-pentahidroxi flavona, o cualquier sal aceptable de los mismos, para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas mediante administración tópica.
2. PTER, opcionalmente en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel.
- 10 3. PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, daños o lesiones cutáneas.
- 15 4. PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento del cáncer de piel.
5. PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cutáneas provocadas por la exposición a la radiación.
- 20 6. PTER en combinación con QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento de la dermatosis, preferentemente la psoriasis.
7. Composición farmacéutica que comprende PTER, opcionalmente en combinación con QUER, para administración tópica.
- 25 8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que PTER se formula en combinación con QUER.
9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, formulada en forma de crema de protección solar o crema para después del sol.
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende PTER, de acuerdo con la reivindicación 7, formulada en forma de liposomas.
- 35 11. Procedimiento para fabricar formulaciones liposómicas, que comprende:
- a) Disolver el compuesto activo PTER, o cualquier sal aceptable del mismo, y lecitina en un disolvente orgánico.
 - b) Evaporar el disolvente.
 - c) Añadir tampón PBS.
 - 40 d) Recoger y someter a ultrasonidos los liposomas formados.
 - e) Diluir en una proporción 1:1 con un estabilizante de emulsión, preferentemente un carbómero y, más preferentemente, Carbopol
 - f) Opcionalmente, añadir un conservante, preferentemente Phenonip
- 45 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que QUER, o cualquier sal aceptable del mismo, también se disuelve en la etapa (a).

FIGURA 1

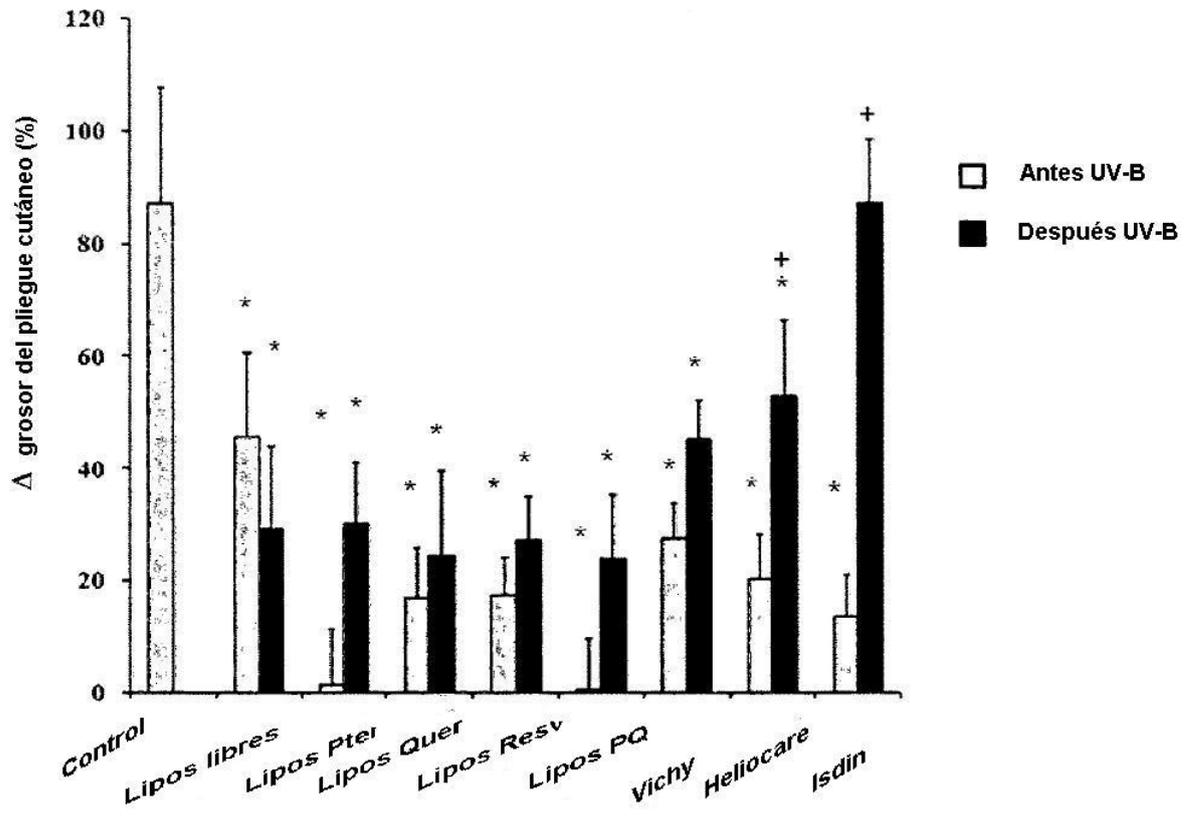


FIGURA 2

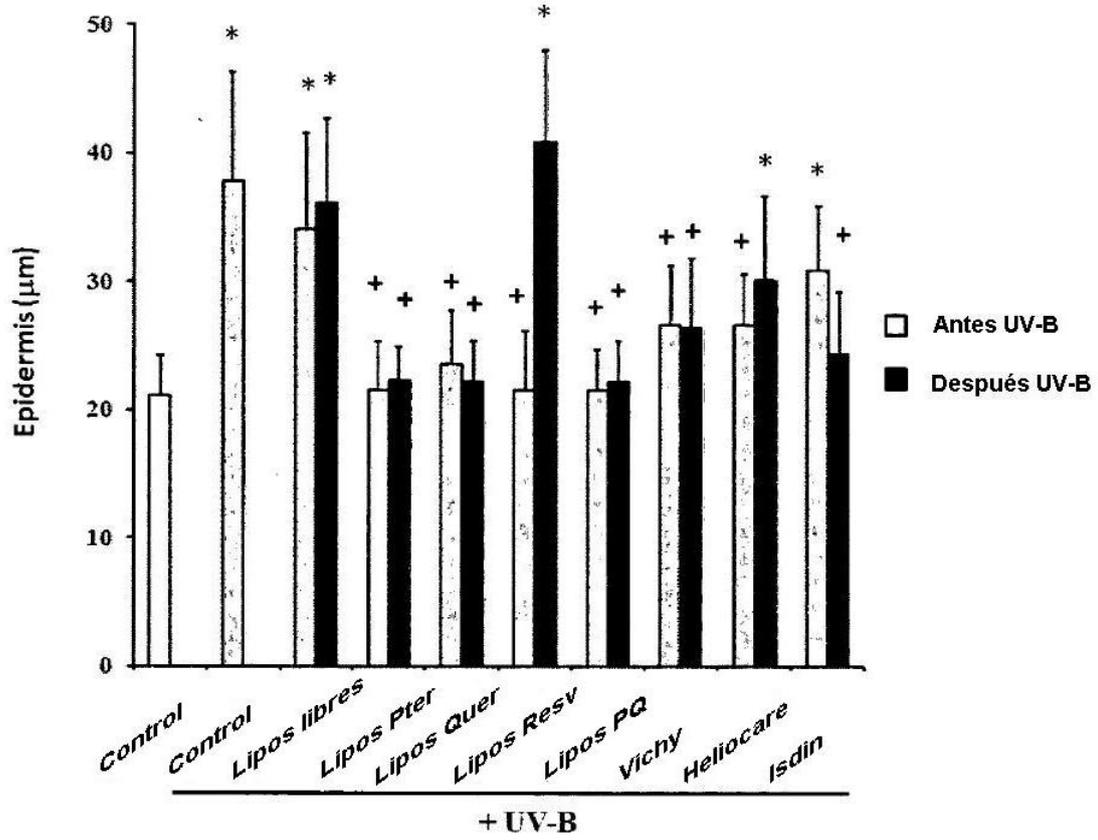


FIGURA 3

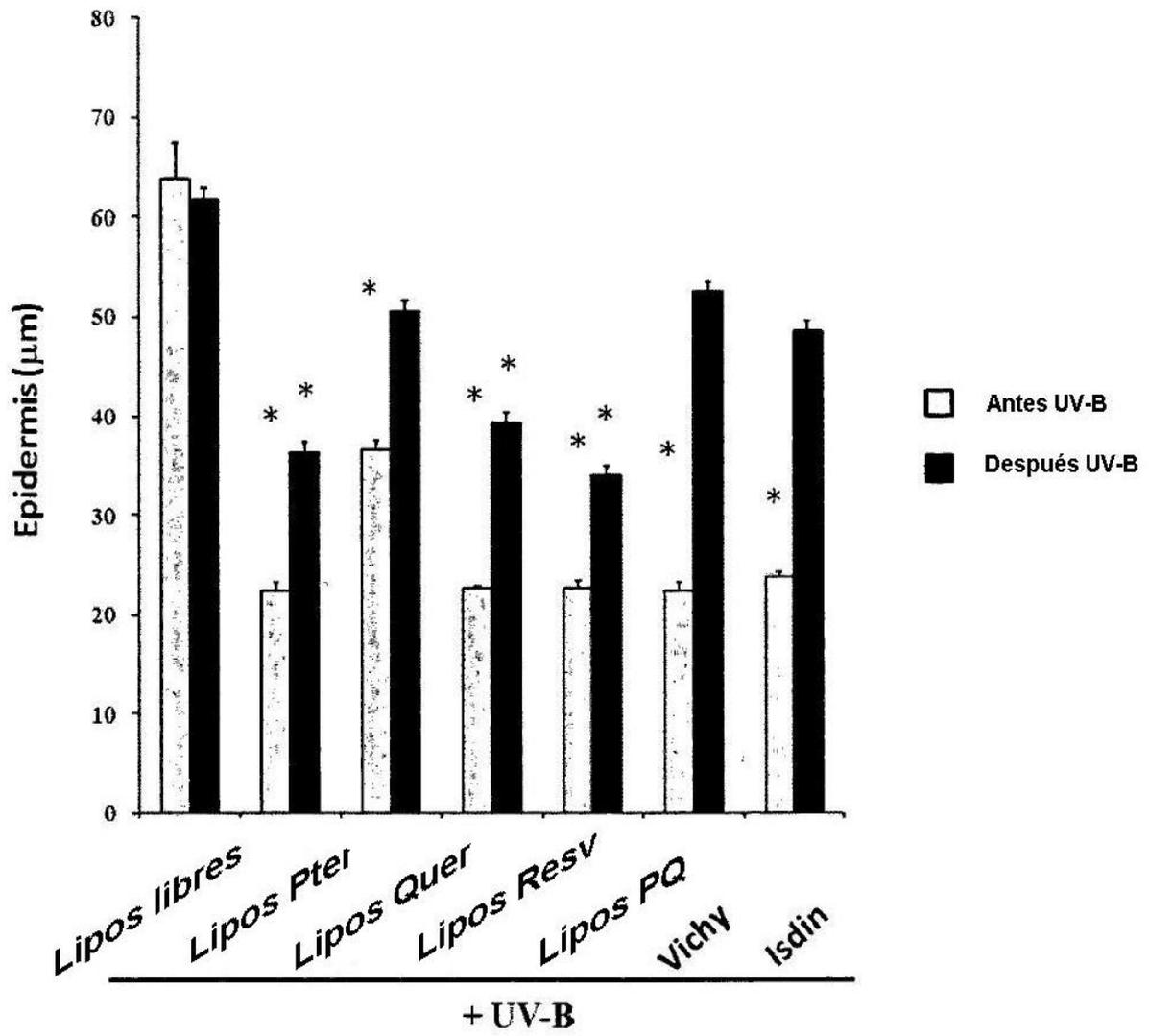


FIGURA 4

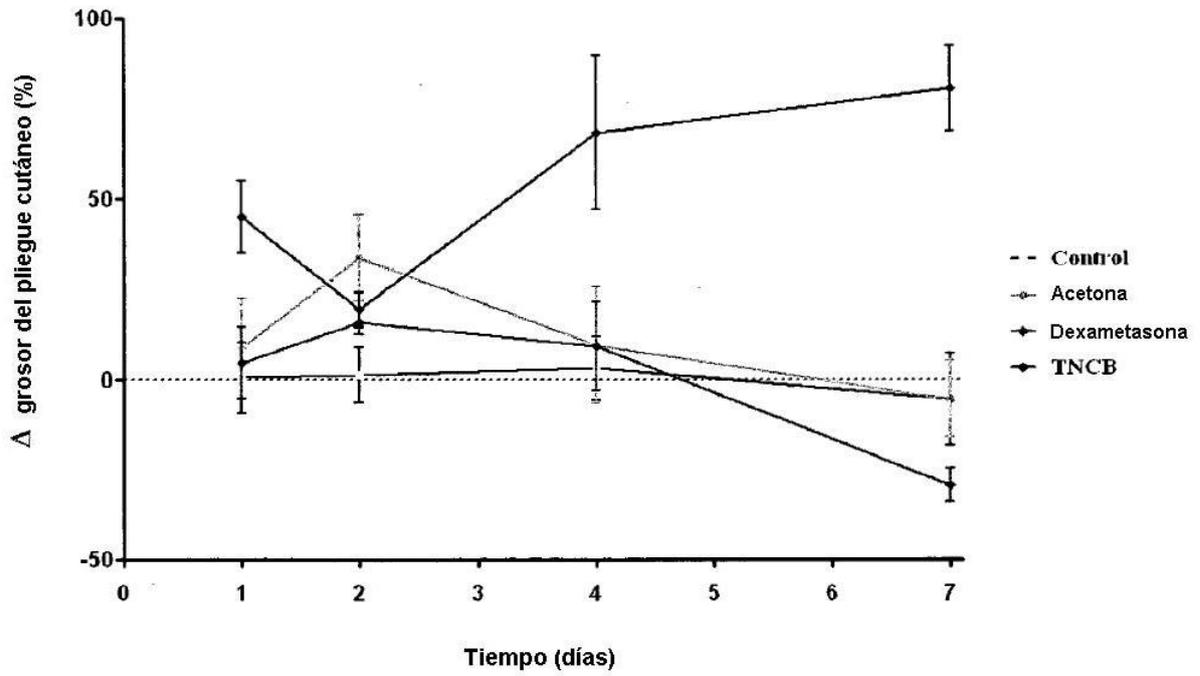


FIGURA 5

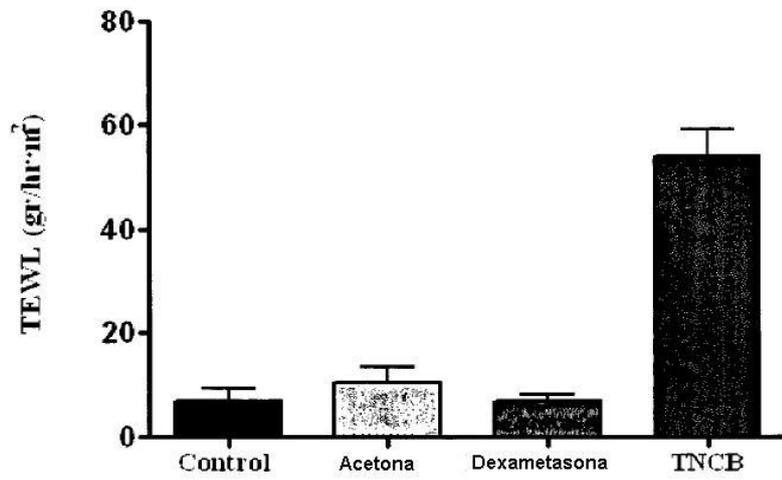


FIGURA 6

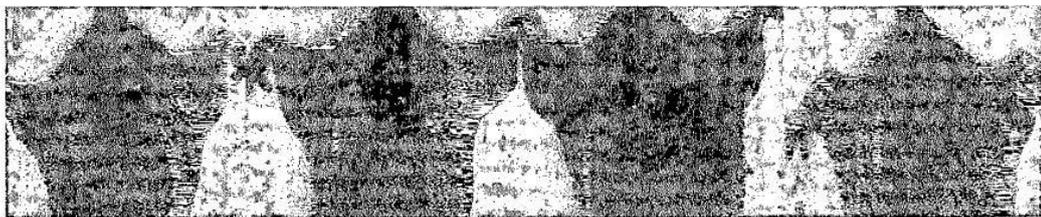


FIGURA 7

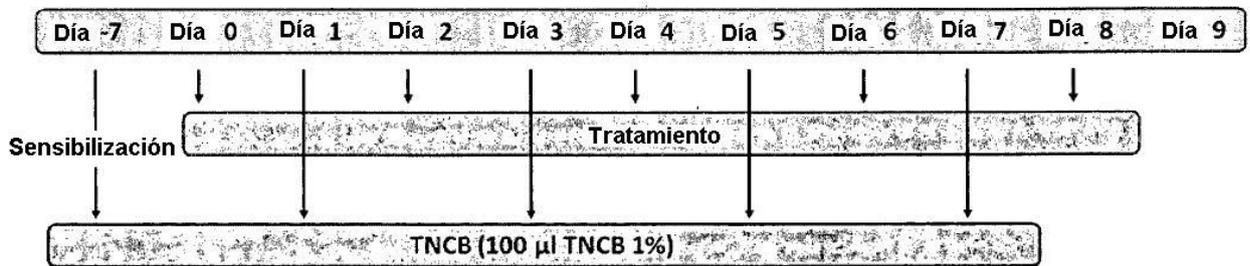


FIGURA 8

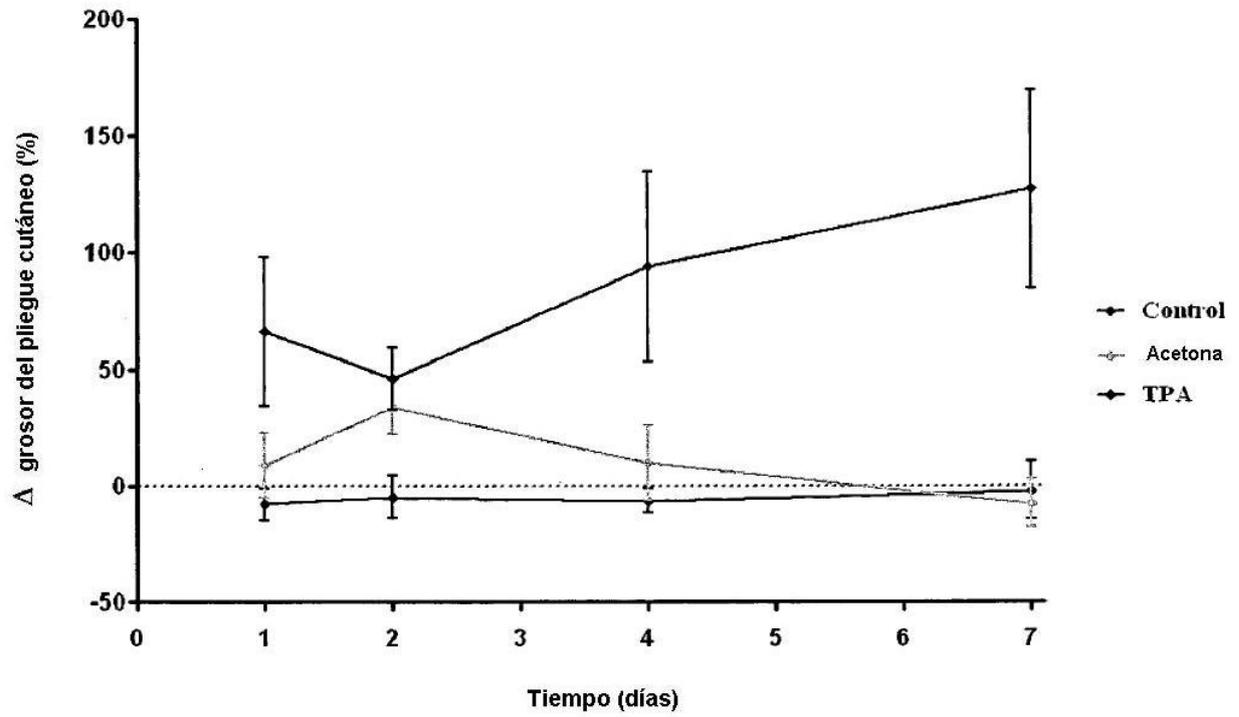


FIGURA 9

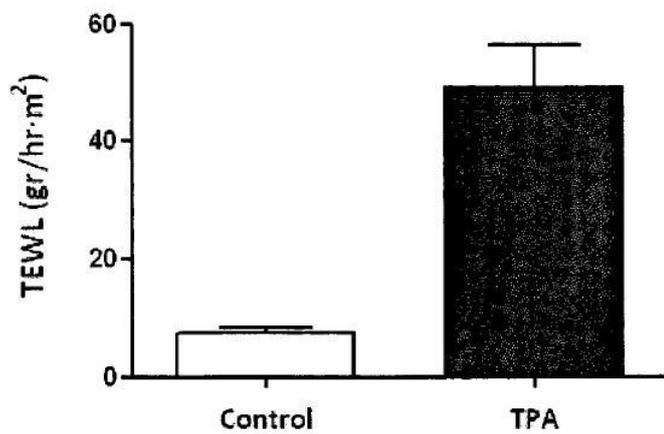


FIGURA 10

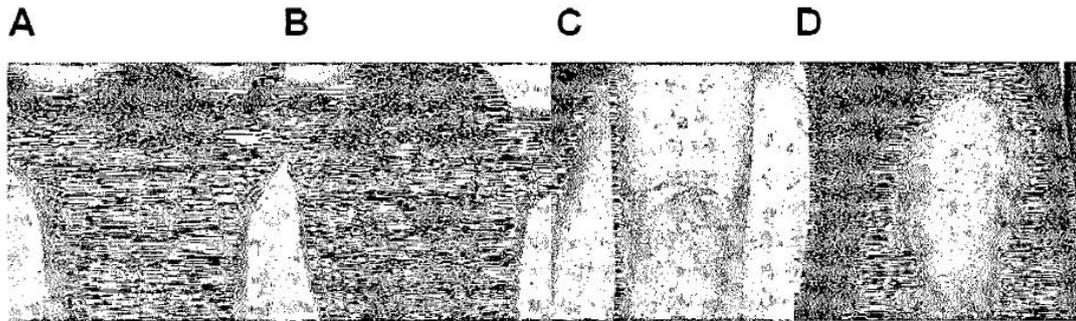


FIGURA 11

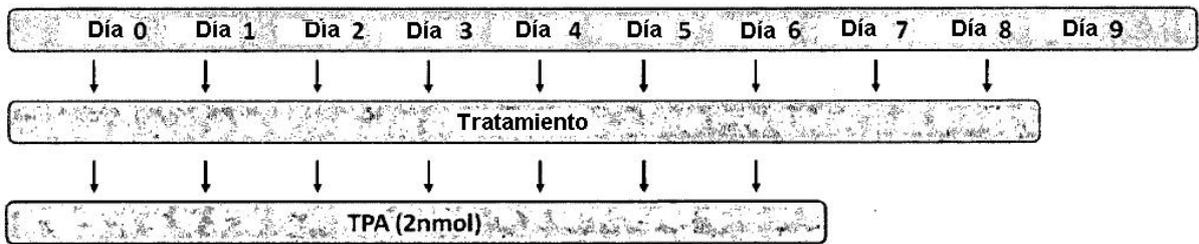


FIGURA 12

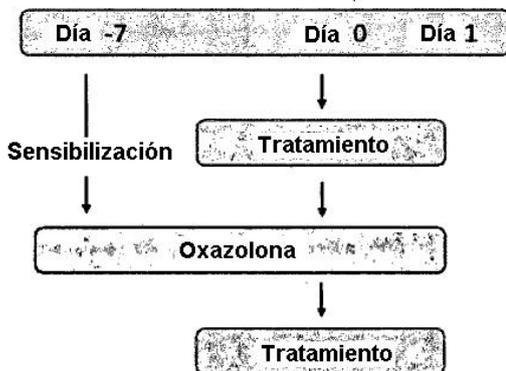


FIGURA 13

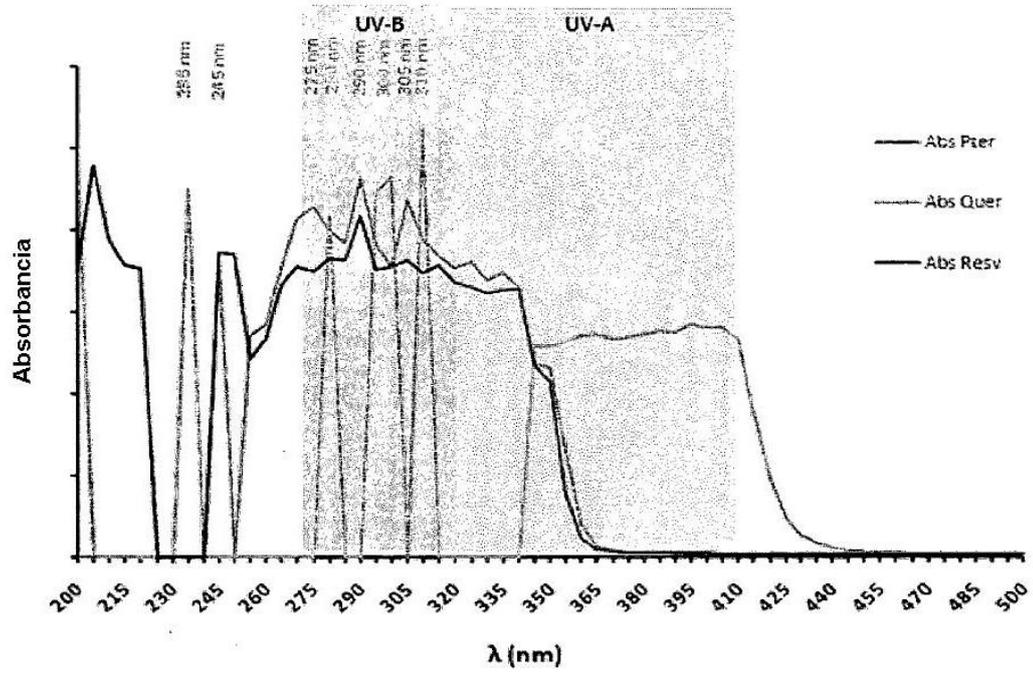


FIGURA 14

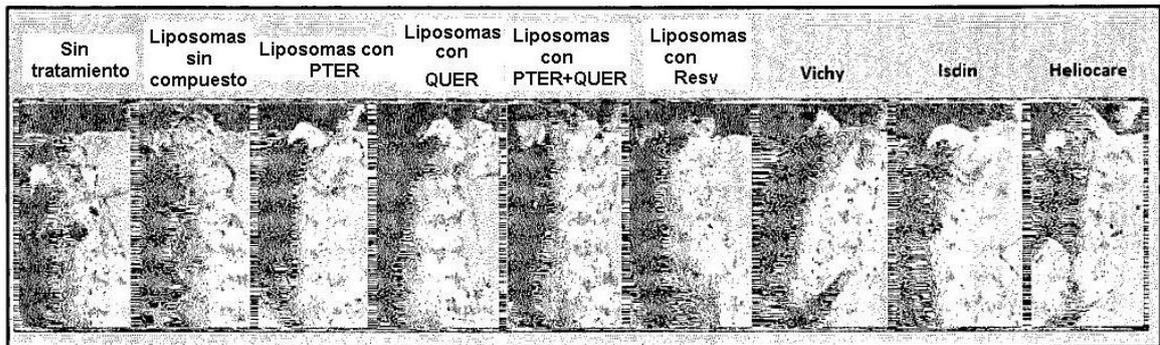


FIGURA 15

Administración crónica de UV-B

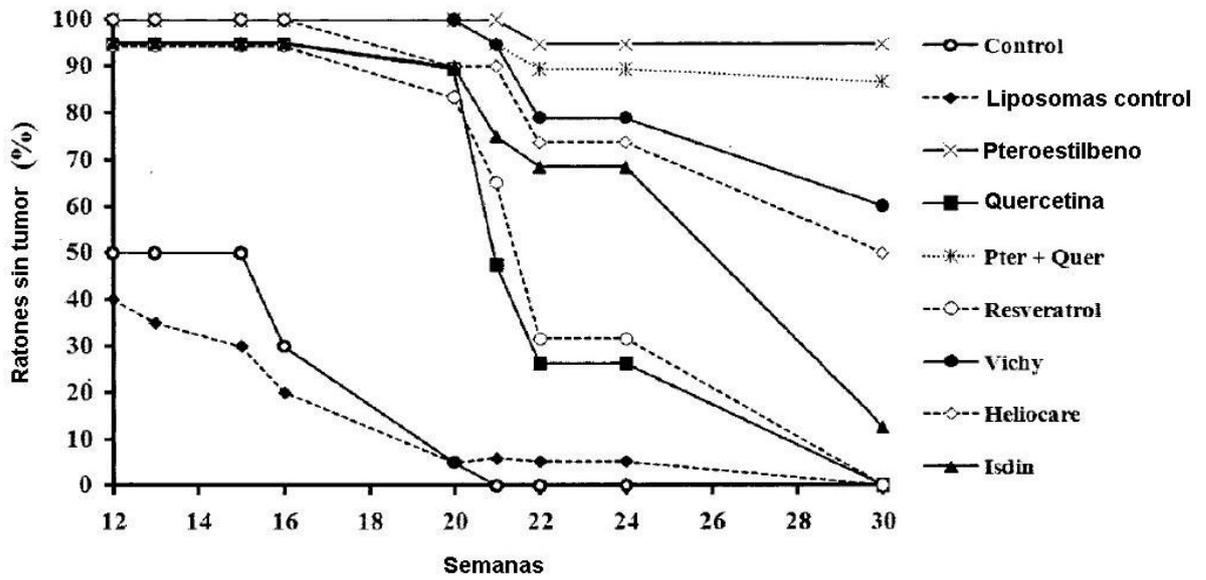


FIGURA 16

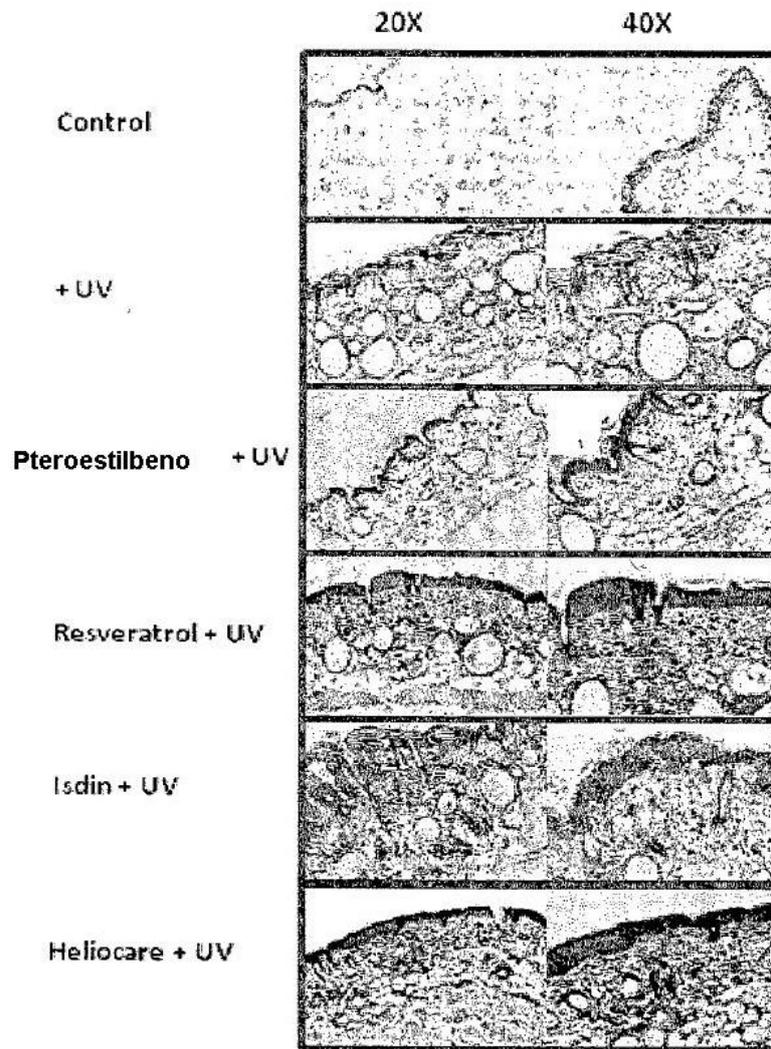


FIGURA 17

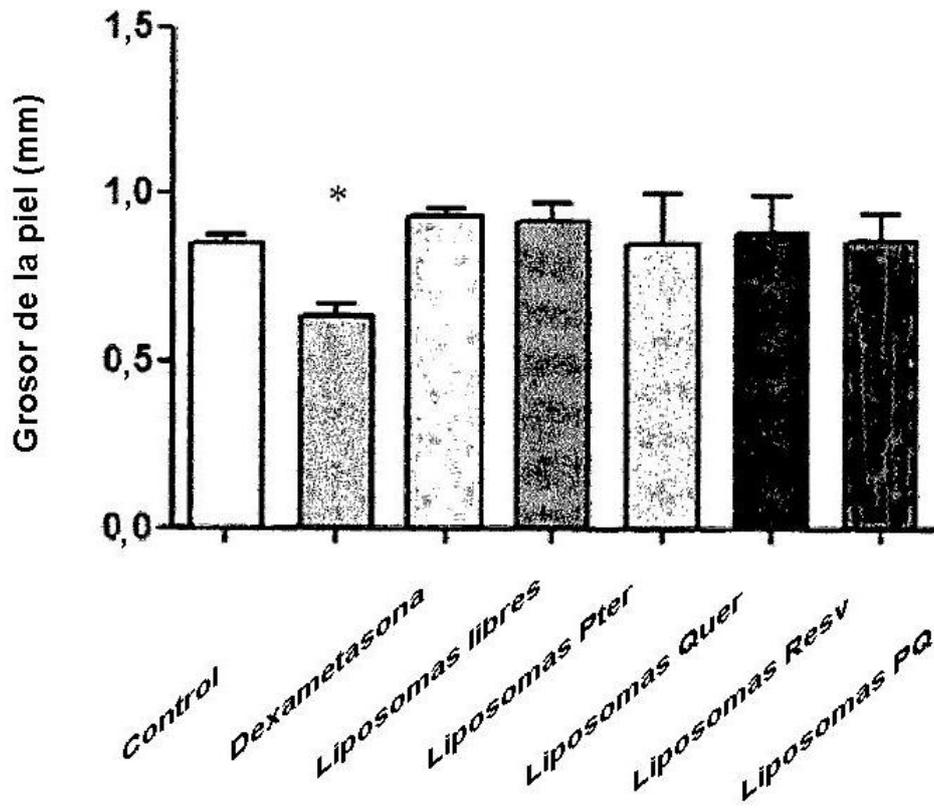


FIGURA 18

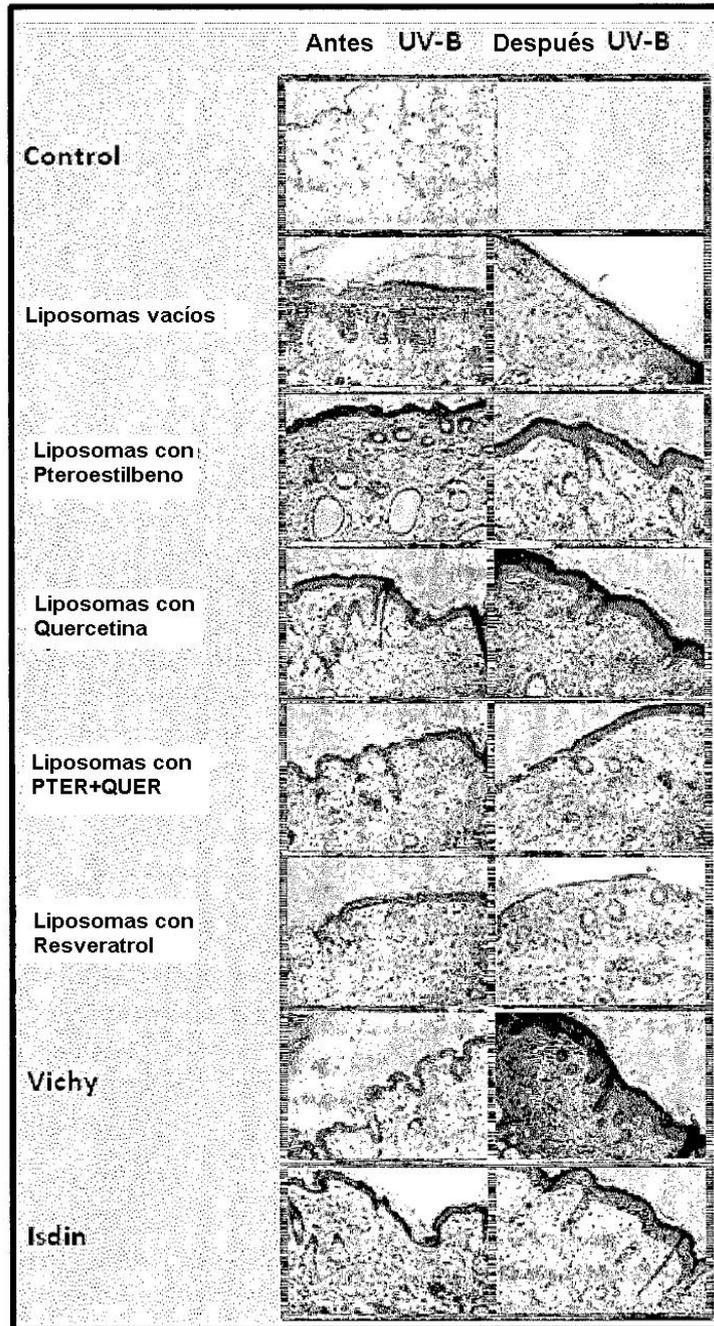


FIGURA 19

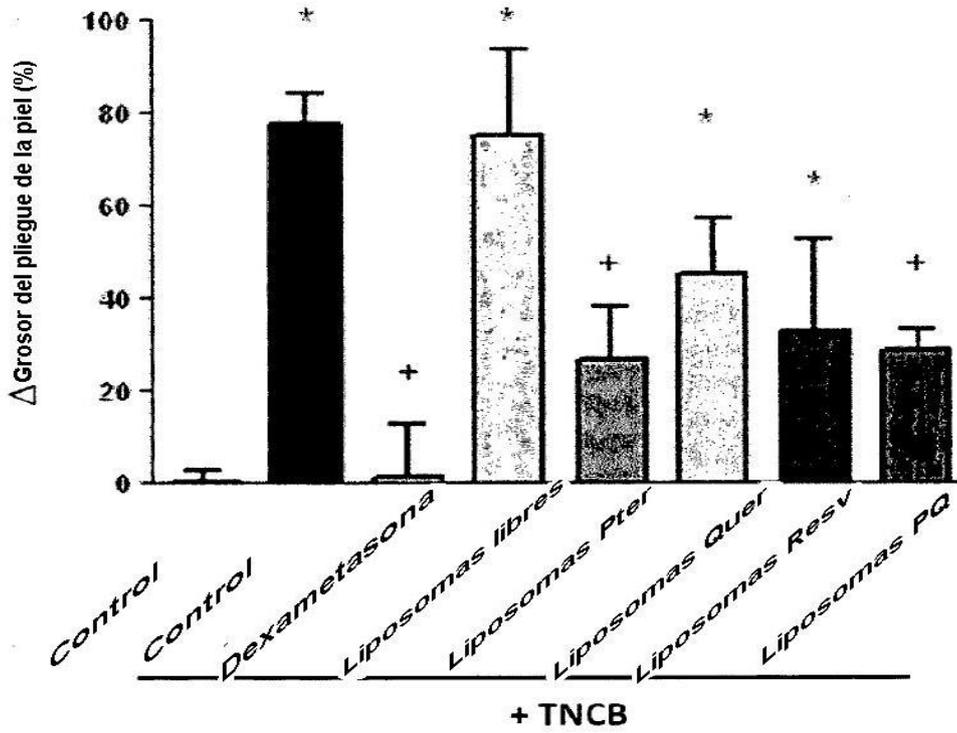


FIGURA 20

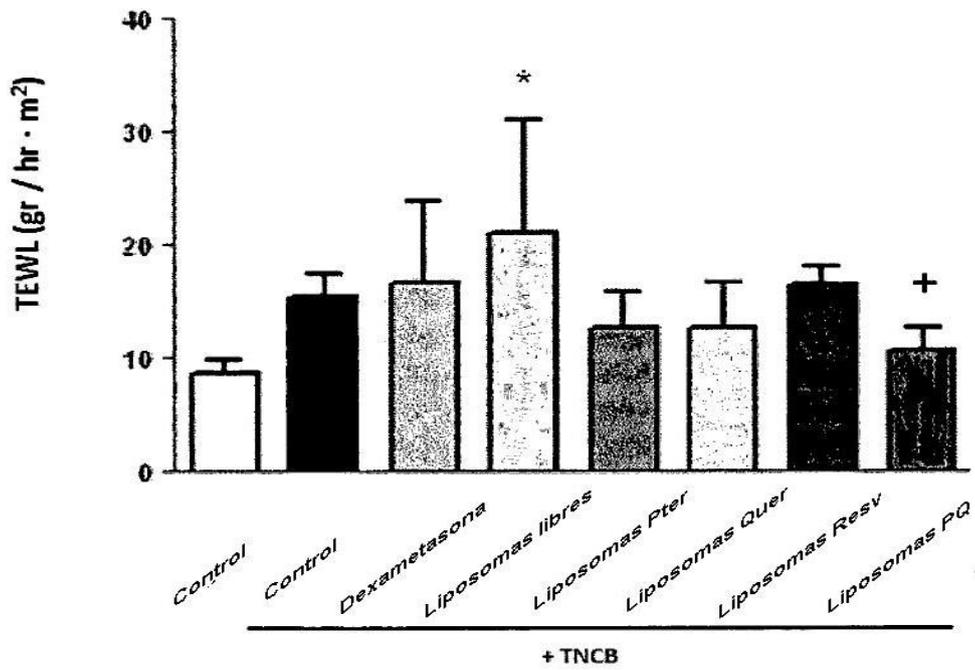


FIGURA 21

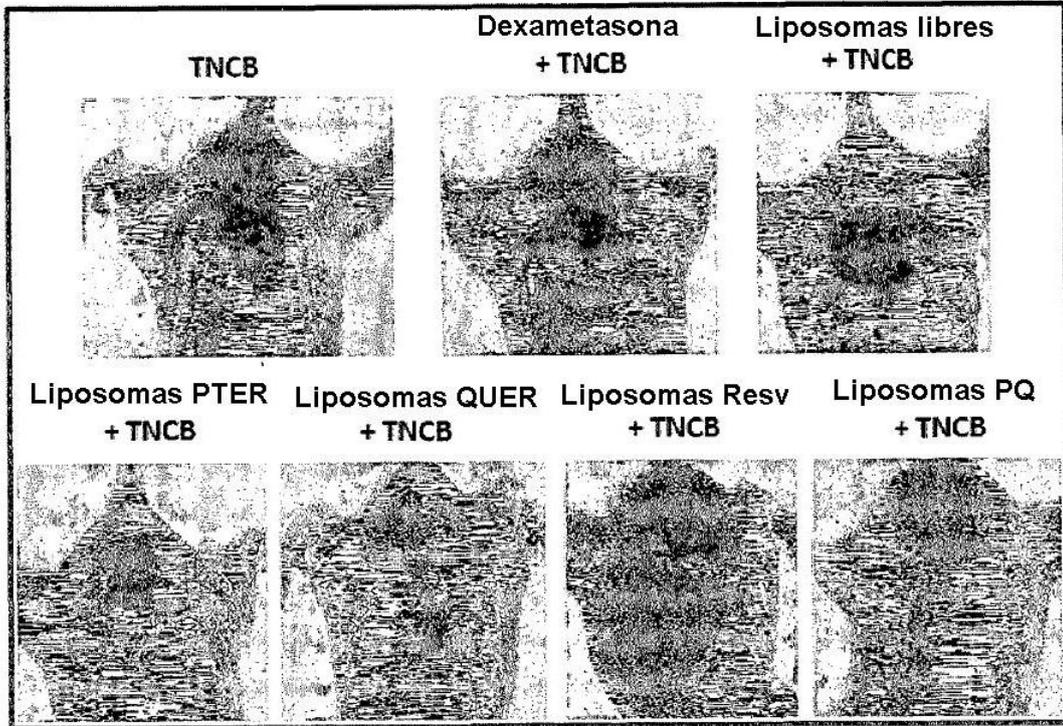


FIGURA 22

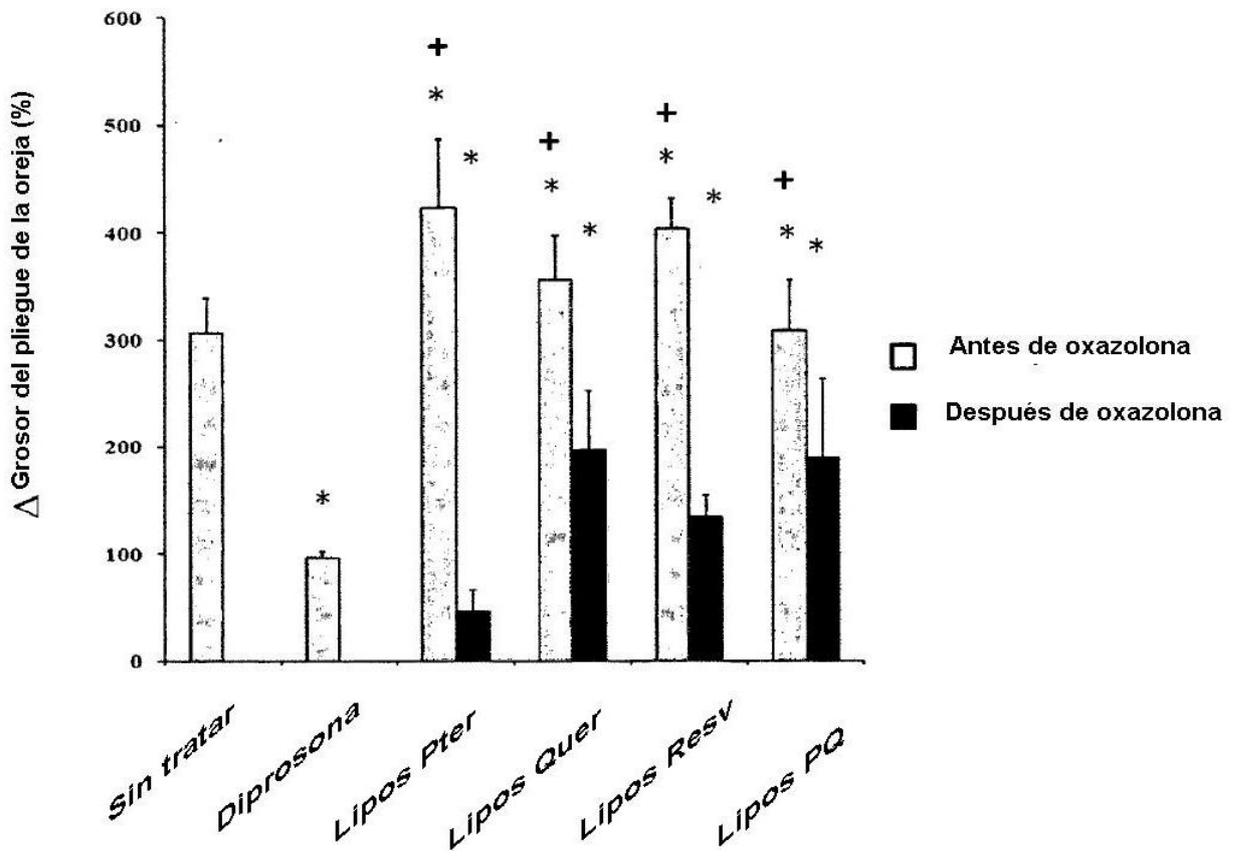


FIGURA 23

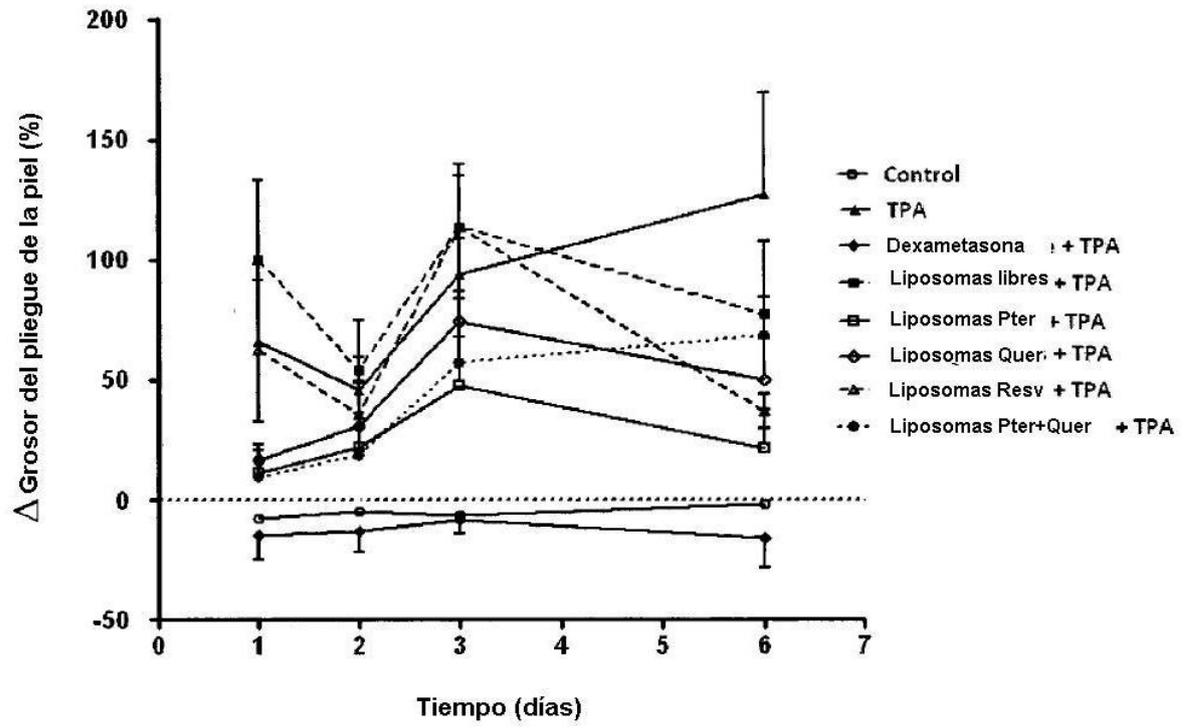


FIGURA 24

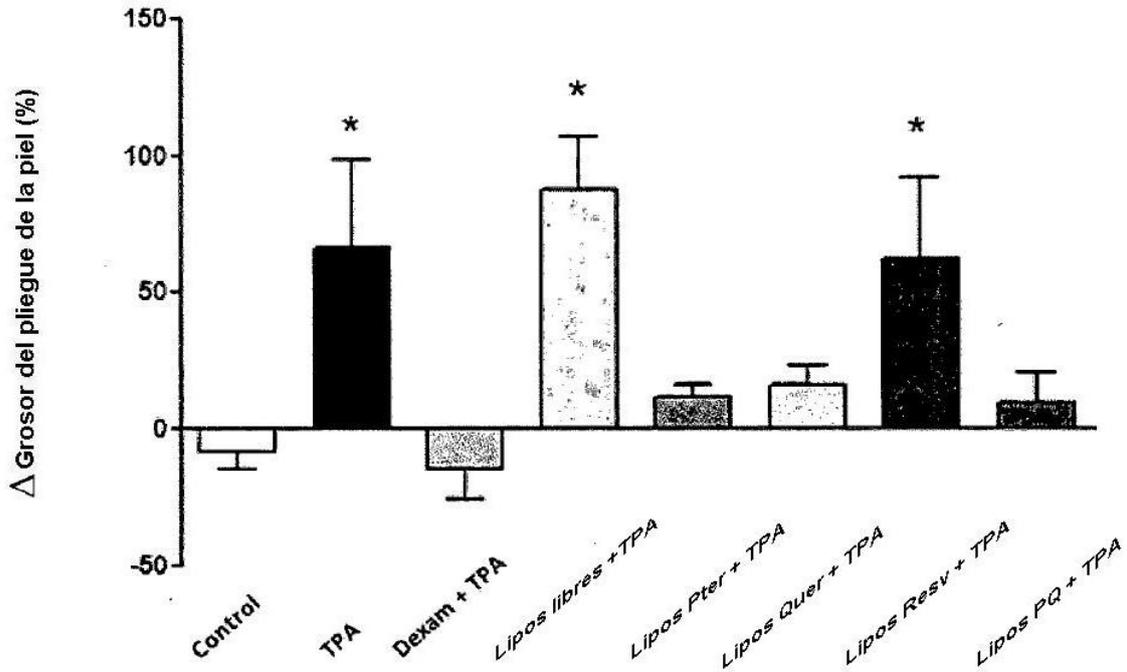


FIGURA 25

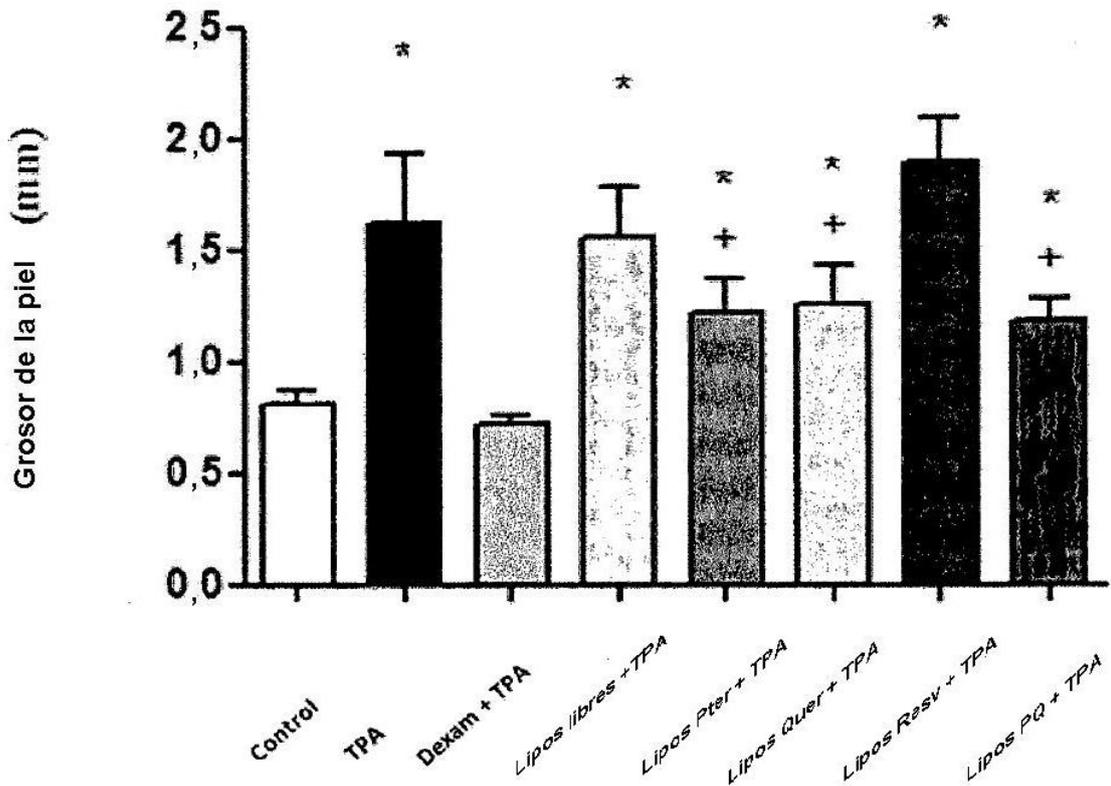


FIGURA 26

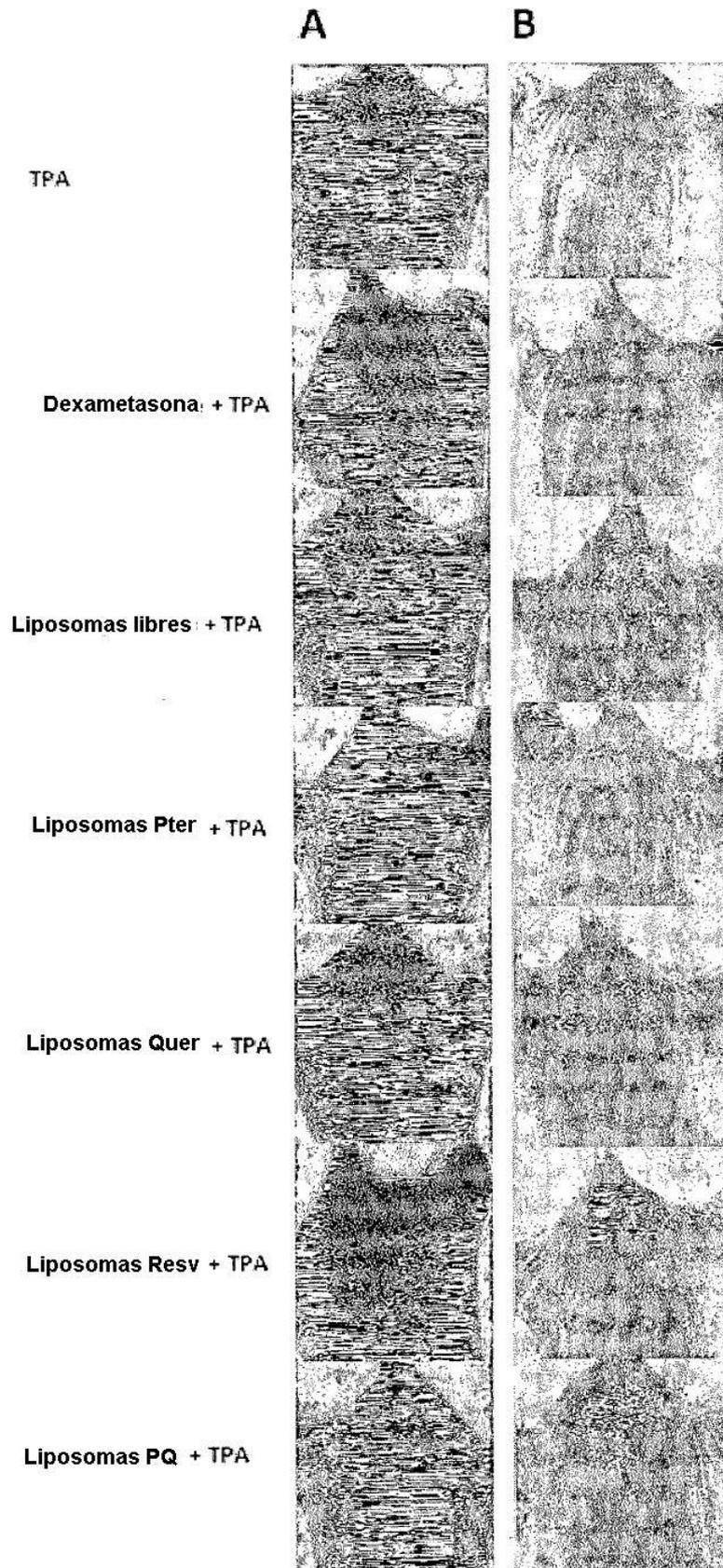


FIGURA 27

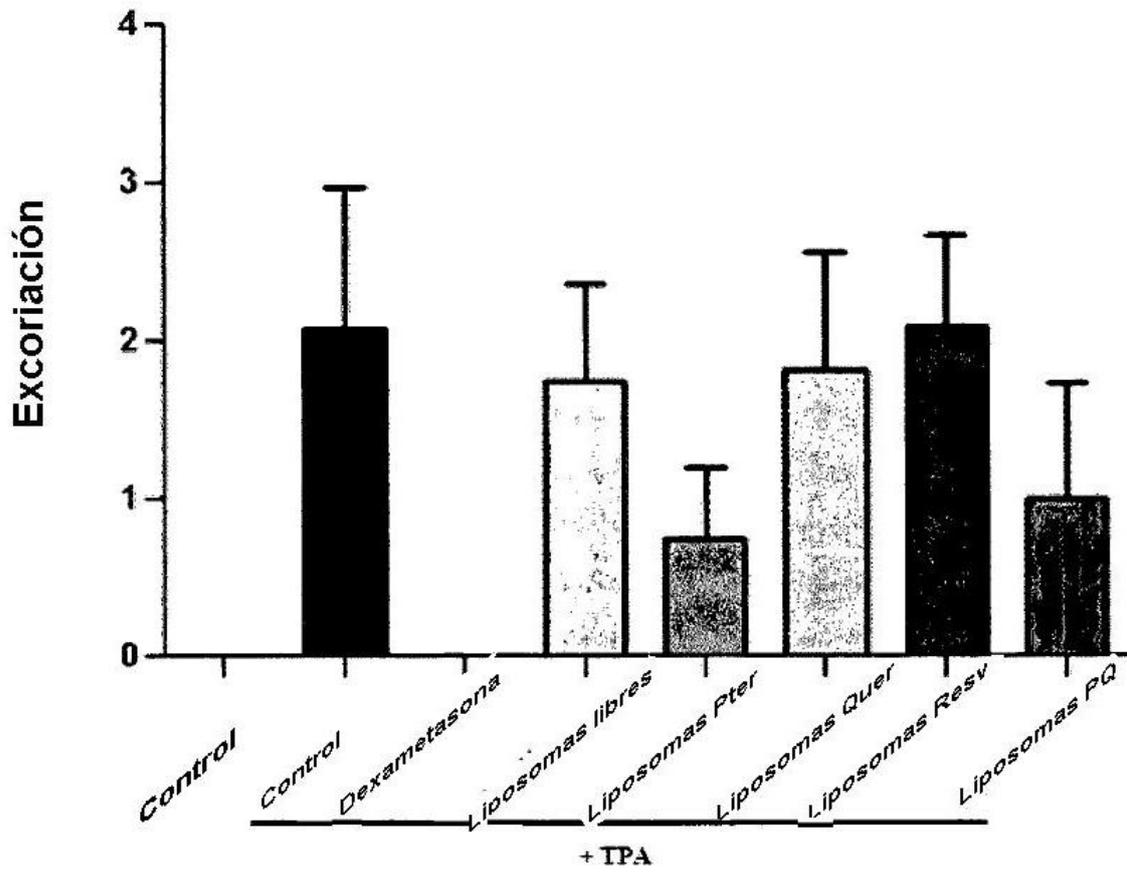
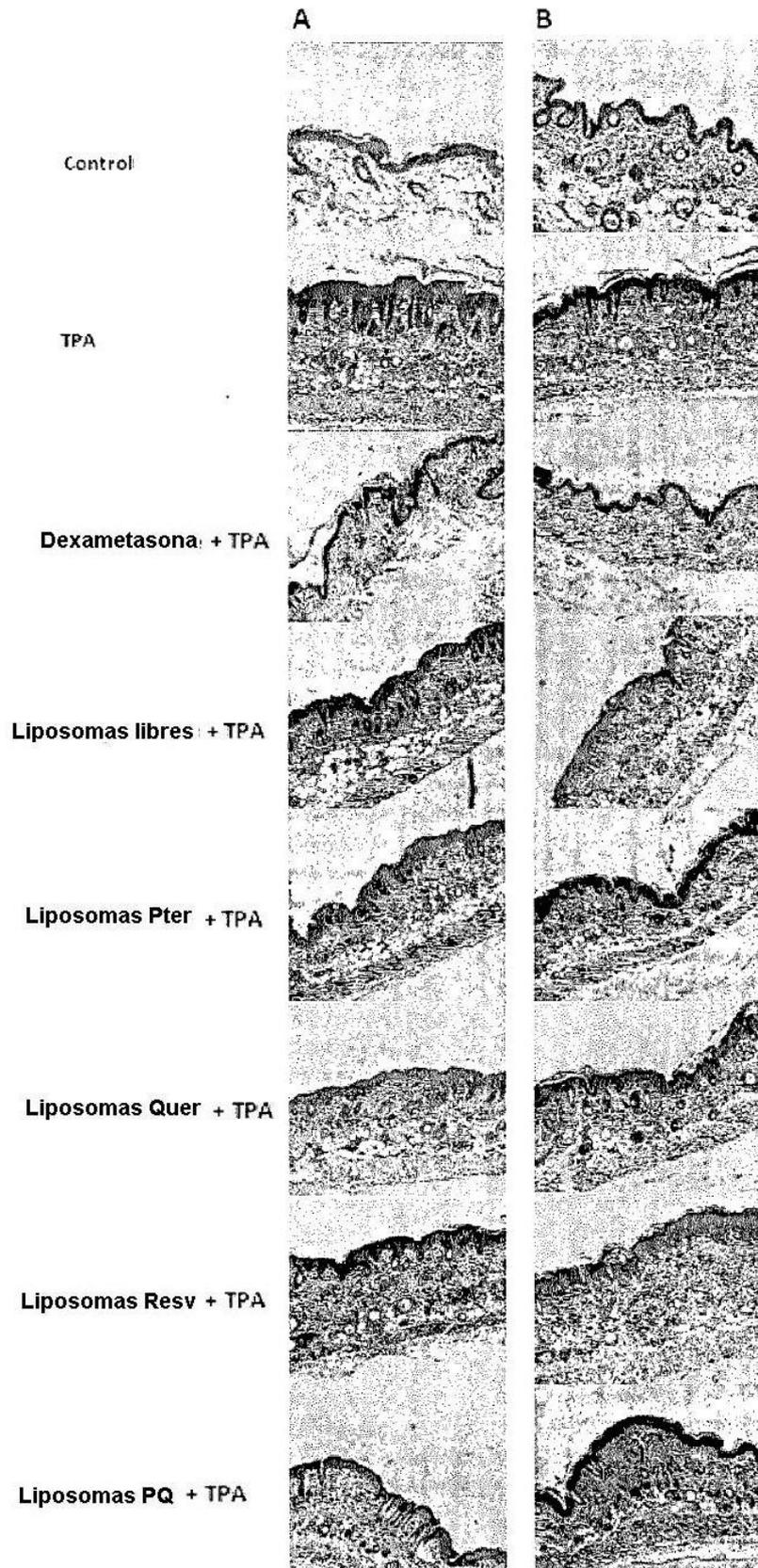


FIGURA 28



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0143705 A2 [0008]
- WO 2008067928 A [0041]

Literatura no patente citada en la descripción

- JANG M ; CAI L ; UDEANI GO ; SLOWING KV ; THOMAS CF ; BEECHER CW ; FONG HH ; FARNSWORTH NR ; KINGHORNAD ; MEHTA RG. *Science*, 1997, vol. 275 (5297), 218-20 [0002]
- ASENSIM ; MEDINA I ; ORTEGAA ; CARRETERO J ; BANO MC ; OBRADOR E ; ESTRELA JM. *Free adic Biol Metal.*, 2002, vol. 33 (3), 387-98 [0002]
- FERRER P ; ASENSI M ; SEGARRA R ; ORTEGA A ; BENLLOCH M ; OBRADOR E ; VAREA MT ; ASENSIO G ; JORDA L ; ESTRELA JM. *Neoplasia*, 2005, vol. 7 (1), 37-47 [0002]
- PRIEGO S ; FEDDIF ; FERRER P ; MENA S ; BENLLOCH M ; ORTEGA A ; CARRETERO J ; OBRADOR E ; ASENSI M ; ESTRELA JM. *Mol Cancer Ther*, 2008, vol. 7 (10), 3330-42 [0002]
- RUBIA CASAGRANDE ; SANDRA R. GEORGETTI ; WALDICEU A. VERRI JR. ; DANIEL J. DORTA ; ANTÓNIO C. DOS SANTOS ; MARIA J. V. FONSECA. *J. Photochem Photobiol B: Biology*, 2006, vol. 84, 21-27 [0007]
- ALENA SVOBODOVÁ ; JITKA PSOTOVÁ ; DANIELA WALTEROVÁ. *Biomed. Papers*, 2003, vol. 147 (2), 137-145 [0007]
- MOAMMIR HASAN AZIZ ; SHANNON REAGAN-SHAW ; JIANQUIANG WU ; B. JACK LONGLEY ; NIHAL AHMAD. *FASEB J.*, 2005, vol. 10 (1096), 1-18 [0043]