

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 516**

51 Int. Cl.:

A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 36/16 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 12187576 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2583662**

54 Título: **Composición a base de meroterpeno destinada a las pieles grasas, con tendencia acneica o afectadas por acné**

30 Prioridad:

18.10.2011 FR 1159412

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

03.11.2014

73 Titular/es:

THOREL, JEAN-NOËL (100.0%)
3 Rue Larochele
75014 Paris, FR

72 Inventor/es:

THOREL, JEAN-NOËL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 517 516 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición a base de meroterpeno destinada a las pieles grasas, con tendencia acneica o afectadas por acné

5 Campo de la invención

La presente invención tiene por objeto una composición de uso cosmético o dermatológico basada en meroterpeno, asociada de manera ventajosa a un flavonoide y/o un poliol.

10 En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que dicha composición estaba especialmente adaptada al tratamiento de las pieles grasas o de tendencia acneica, o con acné, dicho de manera correcta.

De manera notable, una composición de este tipo se caracteriza por un conjunto de acciones complementarias útiles para este tipo de tratamiento:

- 15 - efecto protector del meroterpeno en la oxidación del escualeno;
- acción antimicrobiana, especialmente frente a la bacteria anaerobia gram-positiva *Propionibacterium acnes*, mediante un mecanismo directo e indirecto (a través de los ácidos grasos de sebo con actividad antibiótica);
- efecto antiinflamatorio sobre la inflamación inducida por *P acnes*;
- 20 - aumento de la cantidad de escualeno no oxidado en el sebo;
- aumento de la cantidad de ácidos grasos del sebo implicados en la función de barrera, contribuyendo especialmente a limitar la penetración de los microorganismos y la comedogenia;
- disminución en la cantidad de ácidos grasos del sebo implicados en la comedogenia y la irritación.

25 Estado de la técnica

El acné es una patología inflamatoria crónica que afecta el folículo pilosebáceo que aqueja al rostro, el tórax y la espalda. Es una enfermedad muy frecuente, ya que afecta aproximadamente a un 80% de los adolescentes.

30 Existen diferentes formas clínicas del acné vinculadas a las poblaciones afectadas: acné polimorfo juvenil o acné vulgar que puede ser oclusivo y/o inflamatorio de gravedad y duración variables; el acné del adulto que aparece en el hombre o la mujer, habitualmente de tipo inflamatorio; el acné del recién nacido, el lactante y del niño pequeño; las formas graves (acné nodular, acné conglobata, acné fulminante).

35 Desde un punto de vista clínico, el acné es, por definición, una afección polimorfa que combina lesiones oclusivas (microquistes, comedones), y/o lesiones inflamatorias (pápulas, pústulas o nódulos) que pueden coexistir o sucederse unas a otras en caso de un brote. Su gravedad varía de formas leves a graves.

La fisiopatología del acné implica 3 fases que evolucionan con el tiempo:

- 40 1) hipersecreción sebácea, que es el síntoma común a todas las formas de acné;
- 2) la formación de lesiones oclusivas (la comedogénesis): el canal excretor del folículo pilosebáceo se obstruye, debido a una anomalía, y la hiperproducción de sebo que produce la glándula sebácea ya no puede salir a la superficie de la epidermis, lo que ocasiona una dilatación del folículo pilosebáceo y, posteriormente, a la formación de lesiones oclusivas (microcomedones infraclínicos, que evolucionan a un
- 45 comedón macroscópico). Los comedones son 2 tipos:
 - comedones abiertos (o puntos negros)
 - comedones cerrados (o microquistes): pequeña elevación blanquecina de 2 a 3 mm de diámetro.
- 3) formación de lesiones Inflammatorias donde *P acnes*, que prolifera en las lesiones oclusivas, desempeña un papel importante en la producción de sustancias inflamatorias, especialmente de IL-8 (Nagy y col., 2005) y de FNT- α (Graham y col., 2004). Esto implica una afluencia de neutrófilos polinucleares responsables de la destrucción de la pared del folículo y una difusión de la inflamación hacia las capas subyacentes. Estas lesiones inflamatorias pueden ser superficiales (pápulas y pústulas) o profundas (nódulos).

55 Con un grado menor de gravedad, las pieles con tendencia acneica, se caracterizan por la presencia de pocos comedones diseminados y escasas pápulas pequeñas.

La piel grasa o hipersebácea es el síntoma común a todas las formas de acné, y se caracteriza por una producción excesiva de sebo que ocasiona un tacto graso, un aspecto brillante con poros cutáneos dilatados, especialmente en la zona central del rostro.

60 El sebo es un producto de secreción graso, rico en ácidos grasos y, en particular en escualeno, un hidrocarburo alifático de 30 átomos de carbono, precursor del colesterol. El sebo desempeña un papel positivo importante, especialmente en la protección de la piel, pero también se ha establecido que existe una correlación entre la cantidad de secreción de sebo y la gravedad del acné.

65

Además, los estudios han demostrado que determinados componentes del sebo podrían desempeñar un papel activo en el acné.

5 De este modo, la cantidad de escualeno está aumentada en pacientes acnéicos, donde se encuentra en forma oxidada. Sin embargo, el escualeno oxidado es el causante del espesamiento del sebo, de la hiperqueratinización de los folículos pilosebáceos, de la hiperproliferación de *P. acnes* y de la inducción de la reacción inflamatoria local responsable del desarrollo de las lesiones del acné (Saint Léger y col., 1986; Chiba y col., 1999 y 2000; Ottaviani y col., 2006).

10 Para limitar los efectos potencialmente negativos del escualeno peroxidado, la piel adopta una estrategia de autodefensa liberando vitamina E en la superficie de la piel. Sin embargo, y por razones desconocidas, el nivel de vitamina E está reducido en los pacientes acnéicos, reforzando de este modo la función de la peroxidación del escualeno en el desarrollo del acné (Thiele y col., 1999; Picardo y col., 2009; Ottaviani y col., 2010).

15 Además, el sebo incluye ácidos grasos que tienen actividad antibacteriana, especialmente con respecto a *P. acnes*, en particular el ácido sapiénico, que es el ácido graso más abundante en el sebo (Drake y col., 2008) y el ácido láurico (Nakatsuji y col., 2009). Además, se ha demostrado recientemente que el ácido láurico estimula intensamente la síntesis del péptido antimicrobiano HBD-2 en sobrenadantes de sebocitos. Estos datos indican que el ácido láurico tiene una actividad antimicrobiana directa sobre *P. acnes* e indirecta a través del aumento de las defensas innatas de la piel sobre los sebocitos (Nakatsuji y col., 2010).

20 El ácido linoleico, también presente en el sebo, es un ácido graso esencial que contribuye a la integridad de la barrera cutánea. Sin embargo, se ha descrito en la bibliografía que existe una deficiencia del mismo en las lesiones del acné. Esta reducción está asociada con la gravedad del acné, en la formación de comedones, la estimulación de la lipogénesis y la pérdida de función de barrera que puede ocasionar el aumento de la permeabilidad cutánea a los microorganismos (Horrobin, 1989; Ottaviani y col., 2010).

25 Otro ejemplo se refiere al ácido oleico que es un componente de la película hidrolipídica. En la piel acnéica, la presencia de ácido oleico está aumentada. Sin embargo, este es comedógeno (Choi y col., 1997; Katsuta y col., 2009) e irritante (Boelsma y col., 1996).

30 Un primer enfoque para tratar el acné consiste en controlar la proliferación bacteriana, especialmente de *P. acnes*. De este modo, se prevén sustancias activas que incluyen cinc debido a su actividad bactericida directa, a menudo combinadas con un tratamiento antibiótico oral.

35 Además, el documento WO 2005/004891 describe una asociación de aplicación tópica de agentes antioxidantes que pueden fluidificar el sebo y, de este modo, reducir los síntomas del acné.

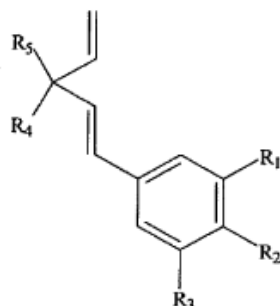
40 En la actualidad existe una gran oferta de posibles tratamientos, que tienen limitaciones, debidas especialmente a su eficacia o los efectos adversos asociados. Por consiguiente, existe una necesidad evidente de desarrollar nuevas soluciones para el tratamiento de las pieles grasas e incluso del acné.

Descripción de la invención

45 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición cosmética o dermatológica que incluye como mínimo un meroterpeno asociado a un flavonoide y a un poliol.

50 De este modo, la presente invención se dirige a la combinación de estos tres principios activos, es decir, un meroterpeno, un flavonoide y un poliol.

Un primer componente de una composición de ese tipo es meroterpeno. Los meroterpenos son terpenos que incluyen un ciclo aromático y que tienen la estructura química siguiente:



donde R_1 , R_2 y R_3 se selecciona, cada uno de ellos independientemente, del grupo constituido por H, OH, OR₆ o CH₂R₆, donde R₆ es un alquilo C₁-C₈ lineal o ramificado, R₄ y R₅ cada uno de ellos independientemente es un grupo alquilo o alqueno C₁-C₂₀ lineal o ramificado.

- 5 Ejemplos destacados de meroterpenos son el bakuchiol, compuesto en el que $R_1=R_3=H$, $R_2=OH$, $R_4=CH_3$ y $R_5=CH_2CH_2CH=C(CH_3)_2$, y la colirifolina, compuesto en el que $R_1=R_3=H$, $R_2=OH$, $R_4=R_5=CH_3$, o sus derivados.

Un meroterpeno destacado es el bakuchiol, por ejemplo, el producto Sytenol® comercializado por la empresa SYTHEON LTD. En este producto, el principio activo tiene una pureza superior al 95%.

- 10 Los meroterpenos se obtienen por lo general a partir de plantas o extractos vegetales, incluso aunque también se pueden obtener a partir de hongos o producirse de forma sintética. Las plantas o extractos vegetales que sirven como fuente de meroterpenos son, por ejemplo, *Psoralea coryfolia*, *Psoralea grandulosa* y *Otholobium Pubescens* (Fabacea). En la práctica, el meroterpeno se puede presentar en forma de material aislado o purificado, con una pureza como mínimo igual al 60% en peso, e incluso con una pureza de al menos el 95% en peso, o se puede añadir en forma de un extracto vegetal purificado incluyendo ventajosamente de 1 a 70% en peso de meroterpeno con respecto al peso total del extracto.

- 20 El meroterpeno aplicado en el marco de la invención es el bakuchiol. De forma ventajosa, el bakuchiol se aísla a partir de semillas de *Psoralea coryfolia*.

De manera ventajosa, el meroterpeno representa de 0,01 al 5% en peso de la composición, ventajosamente de 0,1 a 2%, aún más ventajosamente 0,25%.

- 25 Como se muestra más adelante en la invención, la combinación de este principio activo con al menos uno, incluso los otros dos componentes de la composición potencia el efecto antibacteriano especialmente con respecto a *P. acnes* del meroterpeno. En la práctica, esto permite disminuir su concentración con respecto a su uso como único agente antimicrobiano.

- 30 El segundo componente es un flavonoide, que está ampliamente distribuido en el reino vegetal, especialmente entre las plantas. En el contexto de la presente invención, una fuente destacada de flavonoides es un extracto de ginkgo, especialmente de ginkgo biloba. Se trata ventajosamente de un extracto foliar. De este modo, se puede utilizar en el marco de la invención el producto comercializado por Greentech que corresponde a un extracto glicólico de hojas de ginkgo biloba con un 5% de materia seca.

- 35 De forma ventajosa, la composición comprende un extracto vegetal que incluye el flavonoide, incluyendo dicho extracto una cantidad de 0,0001 al 20% en peso de la composición, ventajosamente de 0,001 a 10%, por ejemplo 2%, aún más ventajosamente 0,1%. En el presente documento, se entiende por "extracto vegetal" la materia seca que comprende el flavonoide en su disolvente.

- 40 Una composición incluye, además, un poliol, ventajosamente manitol. Otro poliol de interés es el sorbitol, incluso el xilitol.

- 45 El manitol aplicado puede ser, por ejemplo manitol en polvo, de origen vegetal (maíz, patata, trigo), con una pureza superior al 98%, tal como el que comercializa IMCD bajo la denominación Pearlitol®.

En el contexto de la invención, el poliol, preferentemente manitol, representa de forma típica de 0,0001 al 10% en peso de la composición, ventajosamente de 0,001 a 2%, aún más ventajosamente 0,01%.

- 50 De manera notable, la composición de acuerdo con la invención se presente en una forma adaptada a la administración por vía tópica cutánea: crema, emulsión, directa o inversa, disolución, suspensión, gel, leche, loción, en particular crema, gel o loción.

- 55 En consecuencia, la presente composición puede incluir cualquier aditivo o excipiente adaptado a su formulación y a su aplicación, como, por ejemplo agentes suspensoros, emulsionantes, polímeros aniónicos, catiónicos o no iónicos, anfóteros, proteínas, vitaminas tensioactivas, aceites minerales o vegetales, ceras, gomas, resinas, agentes espesantes, acidificantes o alcalinizantes, disolventes, estabilizadores del pH, agentes anti-UV, conservantes, perfumes, auxiliares convencionales en el campo de la cosmética y la dermatología.

- 60 La composición también puede incluir además de los 3 ingredientes mencionados anteriormente, otros principios activos tales como un agente antibacteriano, especialmente el cinc.

Ejemplos de formulaciones cosméticas son los siguientes:

- 65 Opción 1

ES 2 517 516 T3

	- Agua	41,23%
	- Gelificante	0,1%
	- Polímeros	4,9%
5	- Emulsionante	3%
	- Glicoles	12%
	- Gluconato de Cinc	3%
	- AHA (Ácidos de Fruta)	20,5%
	- Principios activos diversos	2,66%
	- Bakuchiol	0,25%
10	- Extracto de Ginkgo biloba	0,1%
	- Manitol	0,01%
	- Cuerpos Grasos	12%
	- Perfume	0,25%
15	<u>Opción 2</u>	
	- Agua	53,31%
	- Regulador de pH	3,43%
	- AHA	17%
20	- Gluconato de Cinc	3%
	- Gelificante	0,4%
	- Siliconas	6%
	- Emulsionante	3,5%
	- Polímeros diversos	4%
25	- Principios activos diversos	0,92%
	- Glicoles	8%
	- Bakuchiol	0,25%
	- Extracto de Ginkgo biloba	0,1%
	- Manitol	0,01%
30	- Perfume	0,08%

La presente invención pone de manifiesto una serie de actividades asociadas a dicha composición que la hacen útil como:

- 35 - agente fluidizador del sebo, especialmente gracias a su efecto sobre el aumento de la cantidad de escualeno no oxidado en el sebo;
- agente antimicrobiano, especialmente como antibacteriano con respecto a *Propionibacterium acnes*, por su efecto bactericida directo y a su efecto indirecto sobre la estimulación o la conservación de la cantidad de ácidos grasos del sebo con actividad antimicrobiana (en particular los ácidos sapiénico y láurico);
- 40 - agente anti-inflamatorio con respecto a la inflamación inducida por bacterias, especialmente *Propionibacterium particular*, por su efecto inhibitor de la producción de citoquinas inflamatorias (en particular IL-8 y TNF α);
- agente protector de la función de barrera de la piel, por su efecto estimulante de los ácidos grasos del sebo implicados en la integridad de la función de barrera tales como el ácido linoleico;
- 45 - agente inhibitor de la formación de los comedones (anticomedogénico), especialmente por su efecto inhibitor sobre los ácidos grasos comedogénicos del sebo tales como el ácido oleico;
- agente contra la irritación debida al acné, especialmente por su efecto inhibitor sobre los ácidos grasos irritantes del sebo tales como el ácido oleico.

50 El conjunto de estas propiedades hace que la composición de acuerdo con la invención esté adaptada al tratamiento de enfermedades cutáneas asociadas a la presencia de *Propionibacterium acnes*, y de forma más general al tratamiento de las pieles grasas o con tendencia acnéica, y del acné.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético de las pieles grasas o de 55 tendencia acnéica, y del acné que consiste en aplicar a la piel o el cuero cabelludo una composición tal como se ha descrito anteriormente.

Descripción detallada de la invención

60 La forma en que la invención se puede llevar a cabo y los beneficios derivados de la misma serán más evidentes a partir de las realizaciones ilustrativas siguientes, que se proporcionan como una indicación y no como una limitación, como respaldo de las figuras anexas.

La figura 1 representa la medición del índice de protección (en %) del escualeno mediante el Sytenol®A (Bakuchiol) comparado con la vitamina E, en concentración equimolar.

65 La figura 2 muestra el crecimiento (en %) de *Propionibacterium acnes* en presencia de distintas diluciones (J1 a J9) en diferentes medios:

- en presencia de S = Sytenol®A
- en presencia de Z = cinc;
- en presencia de S + M + G = Sytenol®A + manitol + flavonoides procedentes de un extracto de ginkgo biloba;
- 5 - en presencia de S + M + G + Z = Sytenol®A + manitol + flavonoides procedentes de un extracto de ginkgo biloba+ cinc
- en presencia de un control, concretamente, DMSO que se ha utilizado como disolvente para la disolución del Sytenol®A en el agua.

10 La figura 3 muestra A/ la dosificación de IL-8 (ng/ml) y B/ de TNF α (ng/ml) en los medios de cultivo a J3, en ausencia o en presencia del núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G).

La figura 4 representa la medida de ácido sapiénico: A/ Cantidad de ácido sapiénico durante el tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) a T0, J28 y J56 con placebo. B/ Variación de expresión de ácido sapiénico comparado con J0 después del tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) o placebo (resultados expresados en porcentaje).

15 La figura 5 representa la medida de ácido láurico: A/ Cantidad de ácido láurico durante el tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) a T0, J28 y J56 con placebo. B/ Variación de expresión de ácido láurico comparado con J0 después del tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) o placebo (resultados expresados en porcentaje).

20 La figura 6 muestra la medida de la variación de expresión de escualeno no oxidado comparado con J0 después del tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) o placebo (resultados expresados en porcentaje).

La figura 7 representa la medida de la variación de expresión del ácido linoleico comparado con J0 después del tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) o placebo (resultados expresados en porcentaje).

25 La figura 8 representa la medida de la variación de expresión de ácido oleico comparado con J0 después del tratamiento con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención (S+M+G) o placebo (resultados expresados en porcentaje).

30 A/ Actividad novedosa de los meroterpenos: efecto protector con respecto a la oxidación del escualeno

1/ Objeto del estudio:

El objetivo del estudio es evaluar los efectos de un meroterpeno, en este caso el Sytenol®A, sobre la oxidación del escualeno inducida por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

2/ Materiales y métodos:

El escualeno (Sigma, ST Quentin Fallavier) se pone en contacto con una cantidad definida de peróxido de hidrógeno durante 1 hora para inducir la oxidación, en presencia o ausencia de Sytenol®A al 0,1%, 0,25% o 0,5% (P/V). El control se realiza con un antióxidante lipófilo de referencia, la vitamina E, ensayado a 0,16% (3,8 mM), que corresponde a una concentración equimolar de Sytenol®A al 0,1%.

Al finalizar la oxidación se lleva a cabo una etapa de extracción, a continuación las muestras se analizan por cromatografía en fase gaseosa acoplada a un análisis por espectrometría de masas (GC-MS). El escualeno se determina mediante un conjunto de patrones (10 μ g/ml a 2500 μ g/ml). La cantidad de escualeno oxidado se deduce de las determinaciones del escualeno. Cuánto mayores son las cantidades de escualeno medidas, menos se ha oxidado y viceversa.

3/ Resultados

50 Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

	Índice de protección (%)
Muestra oxidada	0,64
Muestra no oxidada	100,00
Sytenol®A al 0,1% (3,9 mM)	30,02
Sytenol®A al 0,25% (3,9 mM)	37,12
Vitamina E al 0,16% (3,8 mM)	15,17

Los resultados muestran que el Sytenol®A permite proteger el escualeno de la oxidación inducida por H₂O₂ y tiene, por tanto, un poder protector con respecto a la oxidación del escualeno. Este efecto es dependiente de la dosis entre 0,1% y 0,25%.

Como se muestra en la figura 1, a la concentración equimolar de 3,8 mM, el Sytenol®A es 2 veces más eficaz que la vitamina E en términos de protección del escualeno de la oxidación.

B/Actividad del núcleo de los principios activos (S+M+G)

I ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *Propionibacterium acnes*

1/ Objeto del estudio:

El objetivo de este estudio es determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los principios activos y de su asociación en medios sólidos, con respecto a *Propionibacterium acnes*.

2/ Materiales y métodos:

La determinación de la CIM de principios activos a evaluar con respecto a *Propionibacterium acnes* consiste, en un primer momento, en preparar una serie de nueve diluciones de los principios activos a ensayar. Cada dilución se siembra a continuación en una placa Petri y se recubre con gelosa Wilkins-Chalgren. Después de la homogeneización y posterior solidificación, cada una de las placas se inocula con una suspensión calibrada (10^7 UFC/ml) de *P acnes* (depósito por estría), a continuación, las placas se incuban durante 18 h a 37°C en atmósfera anaerobia. La cepa utilizada es *Propionibacterium acnes* CIP A179 (origen = glándula sebácea (1946), fuente CRBIP, Institut Pasteur, París).

La preparación de las gelosas se realiza el J1 añadiendo 2 ml de agua osmotizada estéril a una placa Petri (control negativo) o 2 ml de cada dilución de la serie de principios activos 10 veces concentrada y 18 ml de medio con gelosa. Tras la solidificación a temperatura ambiente, las placas se secan durante 30 min a 37°C y a continuación se siembran con la suspensión bacteriana calibrada (10^7 UFC/ml) mediante un hueso calibrado de 10 µl para conseguir un depósito correspondiente a unas 10^4 UFC).

La lectura de las placas se lleva a cabo después 18 horas de cultivo a 37°C para determinar la CIM correspondiente a la más menor concentración de principio(s) activo(s) que inhibe toda cultivo visible de *P acnes*. La presencia de 1 a 3 colonias no se tiene en cuenta.

Los productos evaluados fueron S (Sytenol®A, Sytheon), Z (gluconato de cinc, Azelis), solos, y las asociaciones S + M (manitol, IMCD/SPCI) + G (extracto glicólico de ginkgo bibloba, Greentech) y S + M + G + Z.

El Sytenol®A que tiene carácter lipófilo se diluye en DMSO (disolución madre al 10%) antes de rediluirse en agua osmotizada. El cinc, manitol y el extracto de ginkgo se disluen directamente en agua osmotizada.

Los ensayos también incluyen controles en presencia del disolvente DMSO que se utilizó para disolver el S en el agua. La eritromicina (2 a 0,007528 µg/ml) y el peróxido de benzoilo (0,0128% a 0,00005%) se utilizaron como controles positivos.

La serie de diluciones verificadas son:

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9
S	0,25%	0,1%	0,01%	0,002%	0,001%	0,0005%	0,0001%	0,00005%	0,000025%
M	0,01%	0,004%	0,0004%	0,00008%	0,00004%	0,00002%	0,000004%	0,000002%	0,000001%
G	0,1%	0,04%	0,004%	0,0008%	0,0004%	0,0002%	0,00004%	0,00002%	0,00001%
Z	3%	1,2%	0,12%	0,024%	0,012%	0,006%	0,0012%	0,0006%	0,0003%

3/ Resultados:

Los resultados de las pruebas de crecimiento se representan en la figura 2 y los valores de CIM en la Tabla siguiente:

Productos ensayados	CIM
S	0,001%
Z	0,12%
S (+G al 0,0002% + M al 0,00002%)	0,0005%
S (+G al 0,0002% + M al 0,00002% + Z al 0,006%)	0,0005%
Peróxido de benzoilo	0,008%
Eritromicina	0,0000125%

Según las condiciones experimentales de este estudio, parece que:

- el crecimiento no se ve afectado por la presencia del disolvente DMSO a las concentraciones presentes en las diluciones del Sytenol;
- Los productos Z y S solos tienen capacidad antibacteriana con respecto a *P acnes*.

- La acción antibacteriana de S sobre *P acnes* es más eficaz que Z (CIM con respecto a 0,001% y 0,12%);
- La asociación de G+M con el producto S mejora la eficacia antibacteriana de S;
- La asociación de Z a la mezcla (G+M+S) no mejora la eficacia antibacteriana con respecto a *P acnes* de (S+G+M).

5 Parece que el efecto bactericida directo de la combinación de los 3 principios activos (Sytenol®A + ginkgo biloba + manitol) es mejor que el del Sytenol®A solo, lo que permite reducir la concentración de Sytenol®A en un factor de aproximadamente 2 en la composición antibacteriana.

10 II- EFECTO ANTIINFLAMATORIO SOBRE LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR *Propionibacterium acnés*

1/ Objeto del estudio

15 El objetivo del estudio es evaluar, en un modelo de explantes de piel humana es decir *in vivo*, la actividad antiinflamatoria del núcleo de principios activos (S + M + G).

2/ Materiales y métodos

20 El núcleo de principios activos está formulado en una base neutra en las proporciones másicas siguientes:

- Sytenol®A (S): 0,25%,
- extracto de Ginkgo biloba (extracto glicólico de hojas, Greentech) (G): 0,1%,
- manitol (Pearlitol 060C, IMCD/SPCI) (m): 0,01%,

La composición de acuerdo con la invención tiene la siguiente fórmula:

25	- Agua	83,70974%
	- Cuerpos Grasos	10%
	- Emulsionante	3,5%
	- Silicona	1%
	- Espesante	0,6%
30	- Gelificante	0,1%
	- Conservante	0,65%
	- Regulador de pH	0,00026%
	- Perfume	0,08%
	- Bakuchiol (S)	0,25%
35	- Extracto de ginkgo biloba (G)	0,1%
	- Manitol (M)	0,01%

El placebo tiene la siguiente fórmula:

40	- Agua	84,06974%
	- Cuerpos Grasos	10%
	- Emulsionante	3,5%
	- Silicona	1%
	- Espesante	0,6%
	- Gelificante	0,1%
45	- Conservante	0,65%
	- Regulador de pH	0,00026%
	- Perfume	0,08%

50 Los explantes de piel humana, procedentes de restos quirúrgicos (11 mm de diámetro), se colocan para su supervivencia en un medio específico a 37°C.

El día 0 (J0), los explantes se tratan con la formulación, con 2 mg/cm² durante 3 días.

55 En los días J1 y J2, se aplicó por la mañana un disco de papel de filtro impregnado con 30 µl de liofilizado reconstituido de *P acnes*, durante 1 hora, a la superficie de los explantes, Para estimular la síntesis de 2 citoquinas inflamatorias: TNFα y IL-8. Los explantes testigo, no tratados con *P acnes* y tratados con *P acnes* solamente, se utilizaron como controles del ensayo.

60 A J3, el medio de cultivo de cada explante se extrajo y se conservó a -80°C. Las dosis de TNF α y de IL-8 en los sobrenadantes se determinan mediante ELISA (ELISA TNFα, Cayman Chemical, y ELISA IL-8, RayBiotech). Al finalizar la dosis, se leen las DO a 412 nm y 450 nm, respectivamente, y se calculan las concentraciones de las 2 citoquinas a partir de las series de patrones obtenidos a partir de las proteínas recombinantes.

65 El análisis estadístico se realiza mediante la prueba de Student cuyo umbral de significancia es 0,05.

3/ Resultados

Como se muestra en la Figura 3A, en presencia del núcleo de principios activos de acuerdo con la invención la síntesis de IL-8 se ve significativamente reducida en un 28% (**, p=0,006).

5 Como se muestra en Figura 3B, en presencia del núcleo de principios activos de acuerdo con la invención la síntesis de TNF α se ve significativamente reducida en un 31% (**, p=0,026).

De este modo, si se reduce al mismo tiempo la síntesis de IL-8 y de TNF α , las citoquinas inflamatorias inducidas por *P. acnes*, el nuevo núcleo de principios activos de acuerdo con la invención reduce la inflamación asociada a las lesiones del acné.

III – MODIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL SEBO

1/ Objeto del estudio

15 El objetivo del estudio clínico (*in vivo*) es evaluar los efectos del nuevo núcleo de principios activos de acuerdo con la invención sobre la composición cualitativa y cuantitativa de los lípidos sebáceos en comparación con un producto placebo.

2/ Materiales y métodos

El placebo y la composición de la invención tienen las fórmulas ya indicadas anteriormente en el punto II-2.

25 El estudio del efecto del nuevo núcleo de principios activos se lleva a cabo sobre 2 grupos de 19 sujetos con tendencia acnéica. Un grupo fue tratado con el nuevo núcleo de principios activos 2 meses, a razón de 2 aplicaciones diarias. El grupo placebo fue tratado en las mismas condiciones con el excipiente correspondiente pero en ausencia del núcleo de principios activos. Se tomaron muestras de la frente en los días J0, J28 y J56 con un material de vidrio adaptado. Los lípidos se recuperaron mediante un disolvente orgánico inerte y se almacenaron a -20°C hasta su análisis bioquímico.

30 La cuantificación de los lípidos sebáceos se llevó a cabo mediante cromatografía en fase gaseosa acoplada a un análisis por espectrometría de masas (GC/MS). Se han utilizado diferentes métodos analíticos para determinar los ácidos grasos totales, el escualeno, los esteroides, las ceras, los glicéridos y los ácidos grasos libres.

3/ Resultados

1) Modificación de la expresión de ácidos grasos con actividad antimicrobiana:

40 Entre los ácidos grasos cuya expresión se modulará durante el tratamiento con el núcleo de principios activos, se sabe que 2 tienen potentes propiedades antimicrobianas: el ácido sapiénico y el ácido láurico,

1.1. El ácido sapiénico

45 Se observa en la figura 4A que la tasa de ácido sapiénico aumenta en un 37% en comparación con placebo a J28 y del 10% en J56. De este modo, el tratamiento de los voluntarios con el nuevo núcleo de principios activos permite preservar la tasa de ácido sapiénico comparada con J0, mientras que se reduce en el grupo placebo (Figura 4B). En consecuencia, el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención ejerce una acción antibacteriana indirecta, conservando la tasa de ácido sapiénico en el sebo cutáneo.

1.2. El ácido láurico

50 Se observa en la figura 5A que la tasa de ácido láurico es un 36% a J56. De este modo, el tratamiento de los voluntarios con el nuevo núcleo de principios activos permite estimular la tasa de ácido láurico comparada con J0, mientras que se reduce en el grupo placebo en J28 y J56 (Figura 5 B). En consecuencia, el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención ejerce una acción antibacteriana indirecta, al estimular la tasa de ácido láurico en las pieles de tendencia acnéica.

60 El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que, además de las propiedades antimicrobianas directas sobre *P. acnes* (véase el punto 1 anterior), el nuevo núcleo de principios activos de acuerdo con la invención ejerce una actividad antimicrobiana indirecta, al estímulo del ácido láurico y ácido sapiénico, que tienen ambas propiedades antimicrobianas con respecto a *P. acnes*. Además, el ácido láurico puede ejercer una actividad antimicrobiana indirecta estimulando la síntesis de péptidos antimicrobianos (HBD-2) en los cultivos de sebocitos. De este modo, el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención y una actividad contra *P. acnes* multifactorial.

2) Modificación de la expresión del escualeno

65

Se observa en la figura 6 que, tras 56 días de tratamiento, El escualeno no oxidado aumentó en un 17% en comparación con J0 y del 27% en comparación con el placebo. De este modo, al favorecer el escualeno no oxidado, El núcleo de principios activos de acuerdo con la invención contribuye *in vivo* a mejorar las propiedades del sebo especialmente su fluidez.

5

3) Modificación del ácido linoleico

Se observa en la figura 7 que, tras 56 días de tratamiento, el ácido linoleico, que es deficiente, aumenta en un 22,8% en comparación con J0 y un 37% en comparación con el placebo. Al estimular el ácido linoleico, el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención contribuye *in vivo* a fortalecer la función de barrera de la epidermis y a limitar la comedogenia.

10

4) Modificación de la expresión de ácido oleico

Se observa en la figura 8 que, tras 28 días de tratamiento, el ácido oleico se reduce en un 12% en comparación con J0 y en un 40% en comparación con el placebo. Al reducir el ácido oleico, el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención contribuye *in vivo* a limitar la comedogenia y la irritación cutánea asociada con el acné.

15

Diferentes marcadores tales como el ácido láurico, ácido sapiénico, ácido linolénico, ácido oleico y escualeno no oxidado se modularán favorablemente después del tratamiento de voluntarios de piel grasa con el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención. Estos resultados obtenidos *in vivo* muestran que el núcleo de principios activos de acuerdo con la invención cambia la calidad y la cantidad de sebo conducente a una reducción de la comedogenia, una reducción de la lipogénesis, un aumento de la función de barrera y un estímulo de las defensas antimicrobianas para reducir el desarrollo de *P. acnes*.

20

25

REFERENCIAS

Boelsma E, Tanojo H, Boddé HE, Ponc M. Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: Evaluation in vitro and in vivo. *Toxicol In Vitro*. 1996 Dic;10(6):729-42

30

Chiba K y col. Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *J Toxicol Sci* 2000; 25: 77-83.

35

Chiba K, Sone T, Kawakami K, Onoue M. Skin roughness and wrinkle formation induced by repeated application of squalene-monohydroperoxide to the hairless mouse. *Exp Dermatol*. 1999 Dic;8(6):471-9.

Choi EH, Ahn SK, Lee SH. The changes of stratum corneum interstices and calcium distribution of follicular epithelium of experimentally induced comedones (EIC) by oleic acid. *Exp Dermatol*. 1997 Feb;6(1):29-35.

40

Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res*. 2008 Ene;49(1):4-11. Epub 2007 Sep 28. Review.

45

Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol*. 2004 Mar;150(3):421-8.

Horrobin DF. Essential fatty acids in clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 1989 Jun;20(6):1045-53. Review.

50

Katsuta Y, Iida T, Hasegawa K, Inomata S, Denda M. Function of oleic acid on epidermal barrier and calcium influx into keratinocytes is associated with N-methyl D-aspartate-type glutamate receptors. *Br J Dermatol*. 2009 Ene;160(1):69-74. Epub 2008 Sep 19.

55

Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol*. 2005 May;124(5):931-8

Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, Huang CM. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2009 Oct;129(10):2480-8. Epub 2009 Apr 23.

60

Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang CM. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. *J Invest Dermatol*. 2010 Apr;130(4):985-94. Epub 2009 Dic 24.

65

Ottaviani M, Alestas T, Flori E, Mastrofrancesco A, Zouboulis CC, Picardo M. Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2006 Nov;126(11):2430-7. Epub 2006 Jun 15.

Ottaviani M, Camera E, Picardo M. Lipid mediators in acné. *Mediators Inflamm.* 2010;2010. pii: 858176. Epub 2010 Aug 25. Review.

5 Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol.* 2009 Mar;1(2):68-71.

Saint-Léger D *et al.* A possible role for squalene in the pathogenesis of acné. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acné patients. *Br J Dermatol* 1986; 114: 543-552.

10 Thiele JJ, Weber SU, Packer L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol.* 1999 Dec;113(6):1006-10.

REIVINDICACIONES

1. Composición de uso cosmético y/o dermatológico que incluye:
- 5 - bakuchiol,
 - un flavonoide contenido en un extracto de ginkgo biloba; y
 - un poliol.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 *caracterizada* por que bakuchiol representa de 0,01 al 5% en
10 en peso de la composición, ventajosamente de 0,1 a 2%, aún más ventajosamente 0,25%.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 *caracterizada* por que bakuchiol representa de 0,0001 al 20%
en peso de la composición, ventajosamente de 0,001 a 2%, aún más ventajosamente 0,1%.
- 15 4. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores *caracterizada* por que el poliol es manitol.
5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores *caracterizada* por que el poliol es xilitol.
6. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores *caracterizada* por que el poliol representa de
20 0,0001 al 10% en peso de la composición, ventajosamente de 0,001 a 2%, aún más ventajosamente 0,01%.
7. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores *caracterizada* por que se presenta en forma
de crema, gel o loción.
- 25 8. Uso de una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 como:
 - agente anti-oxidante del escualeno; y/o
 - agente fluidizador del sebo; y/o
 - agente protector de la función de barrera de la piel; y/o
 - agente inhibidor de la formación de los comedones.
- 30 9. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como:
 - agente antimicrobiano, especialmente como antibacteriano con respecto a *Propionibacterium acnes*; y/o
 - agente anti-inflamatorio con respecto a la inflamación inducida por bacterias, especialmente
 Propionibacterium acnes; y/o
35 - agente contra la irritación vinculada con el acné.
10. Procedimiento de tratamiento cosmético de pieles grasas o de tendencia acneica que consiste en aplicar a la piel
o al cuero cabelludo una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 11. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del acné.

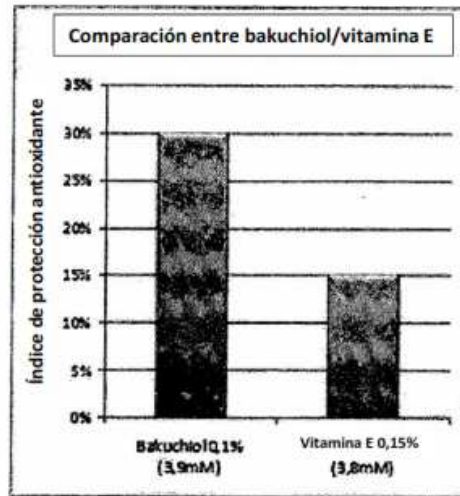


Figura 1

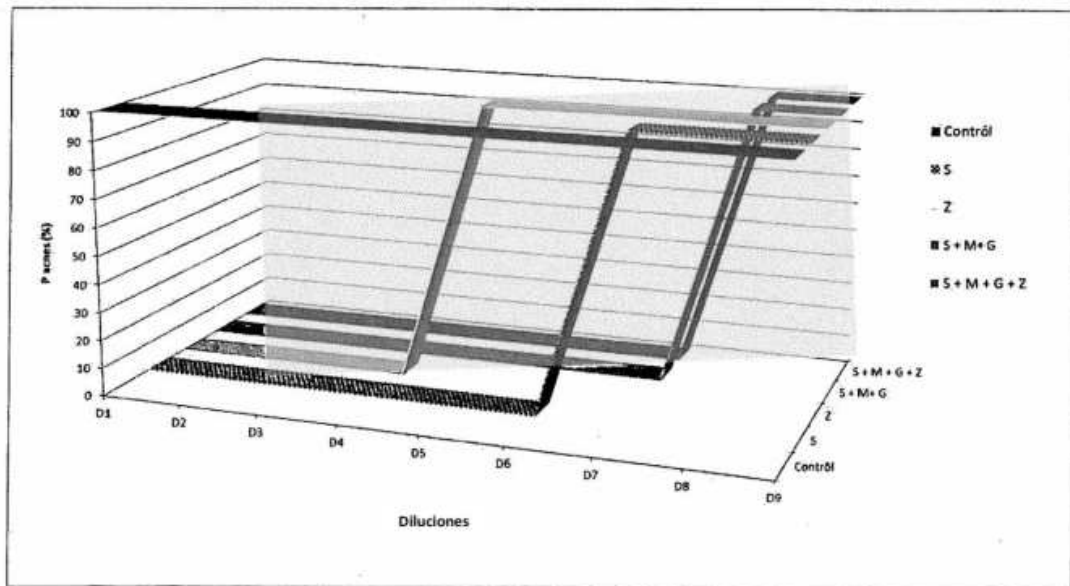


Figura 2

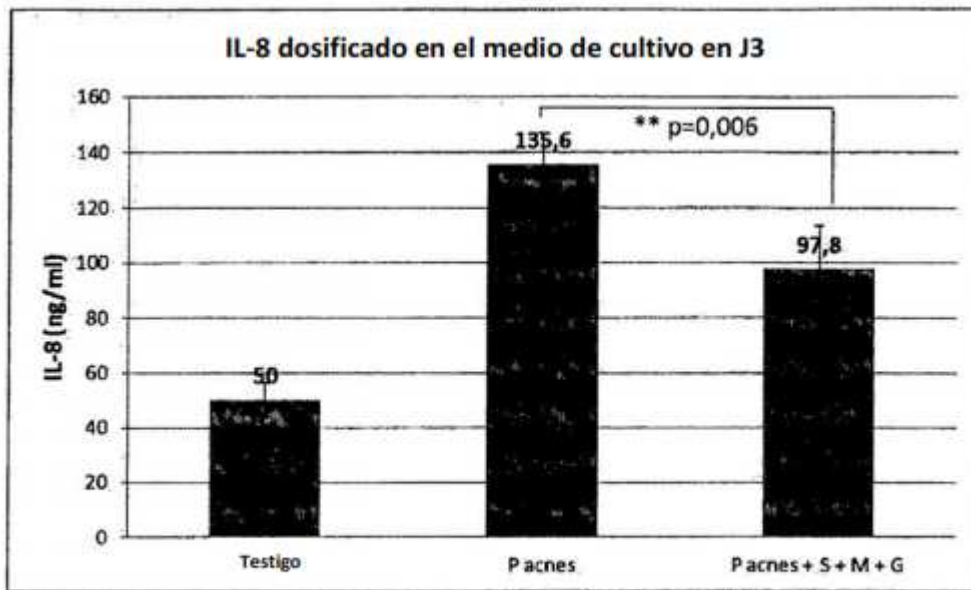


Figura 3A

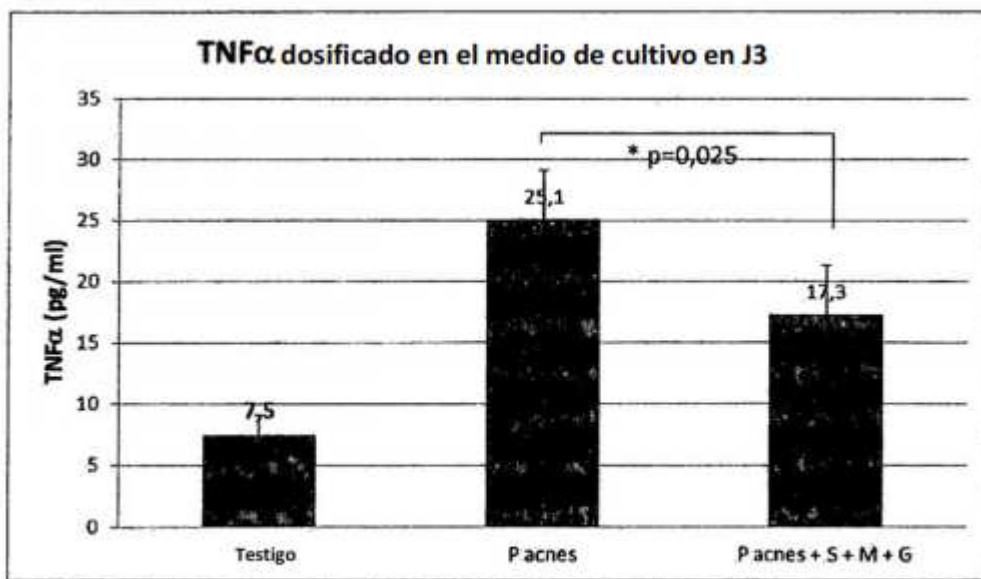


Figura 3B

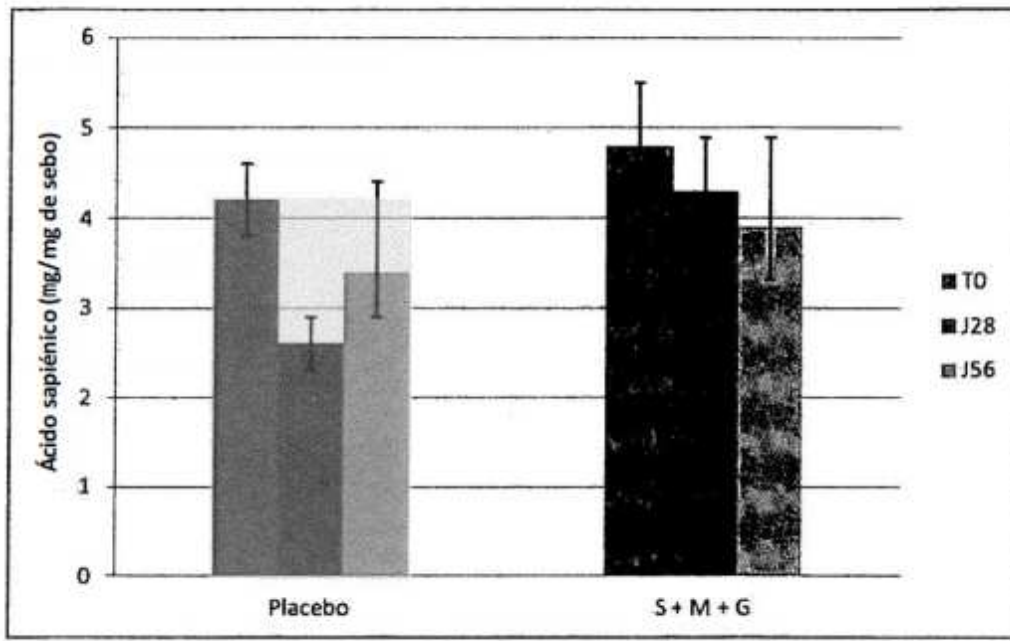


Figura 4A

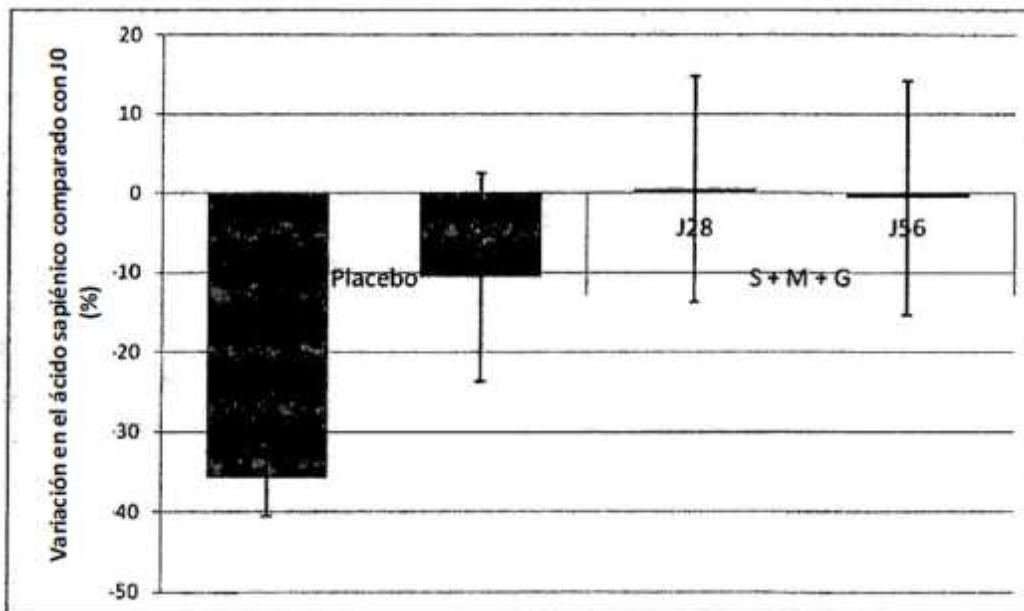


Figura 4B

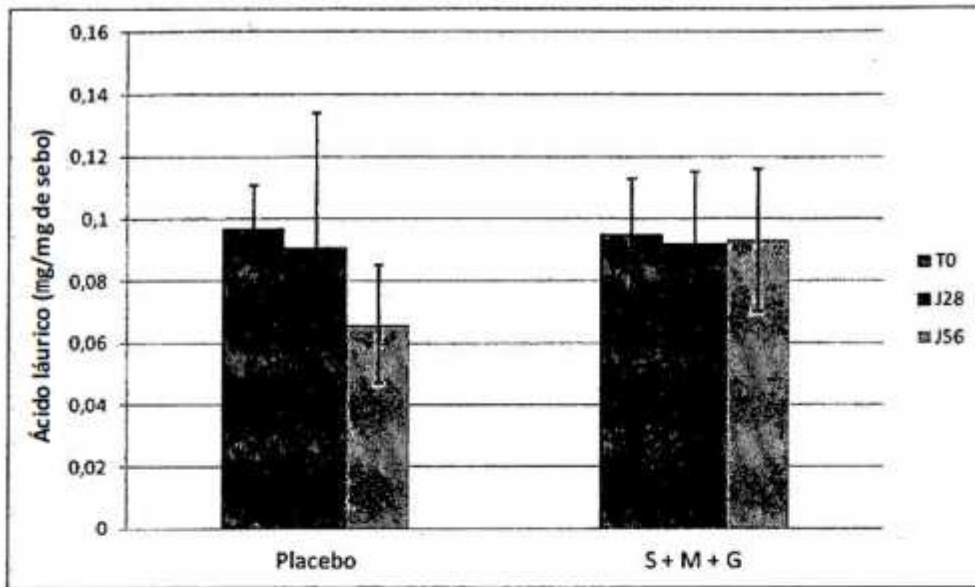


Figura 5A

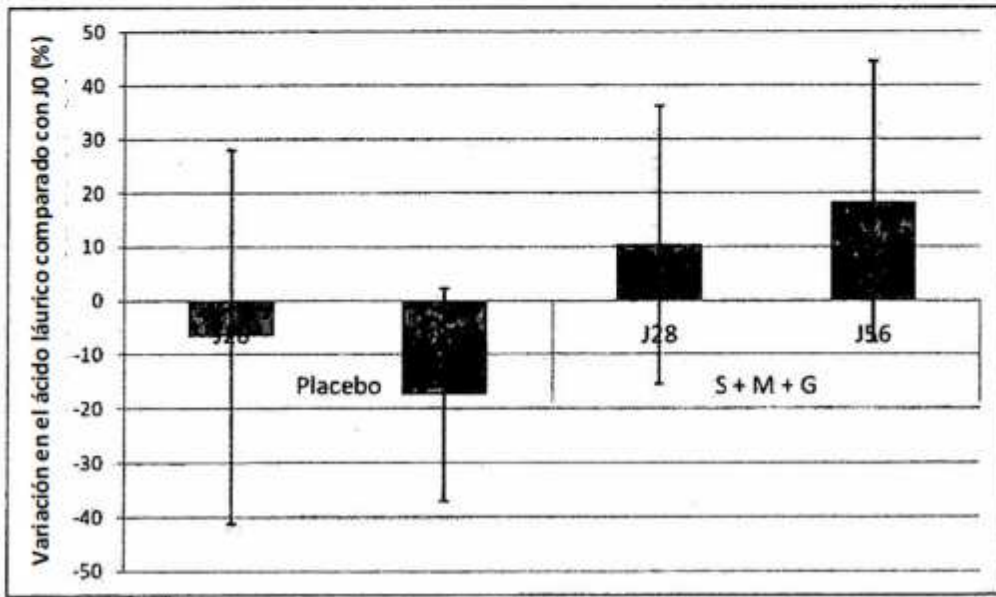


Figura 5B

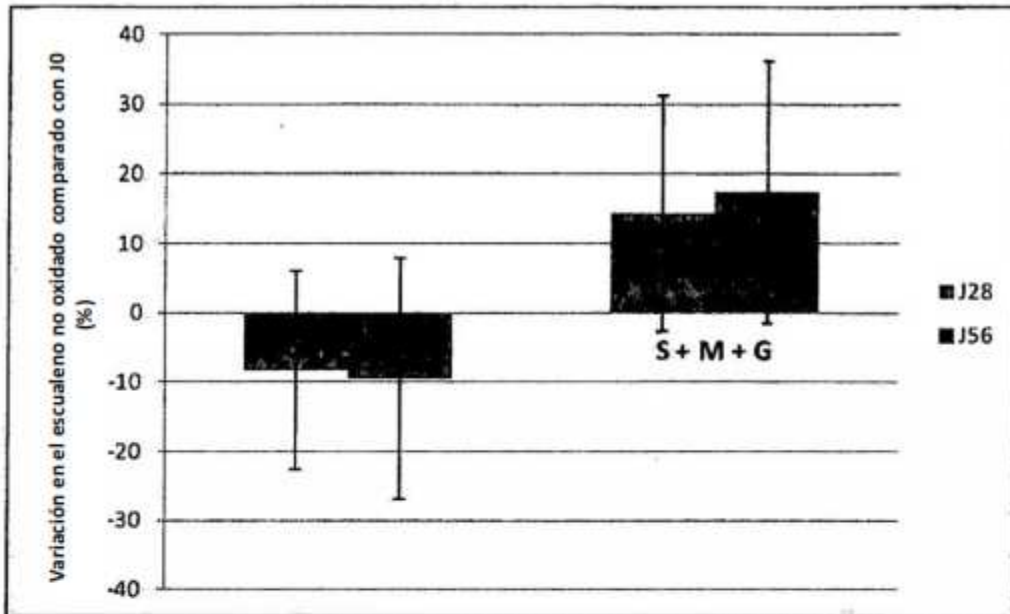


Figura 6

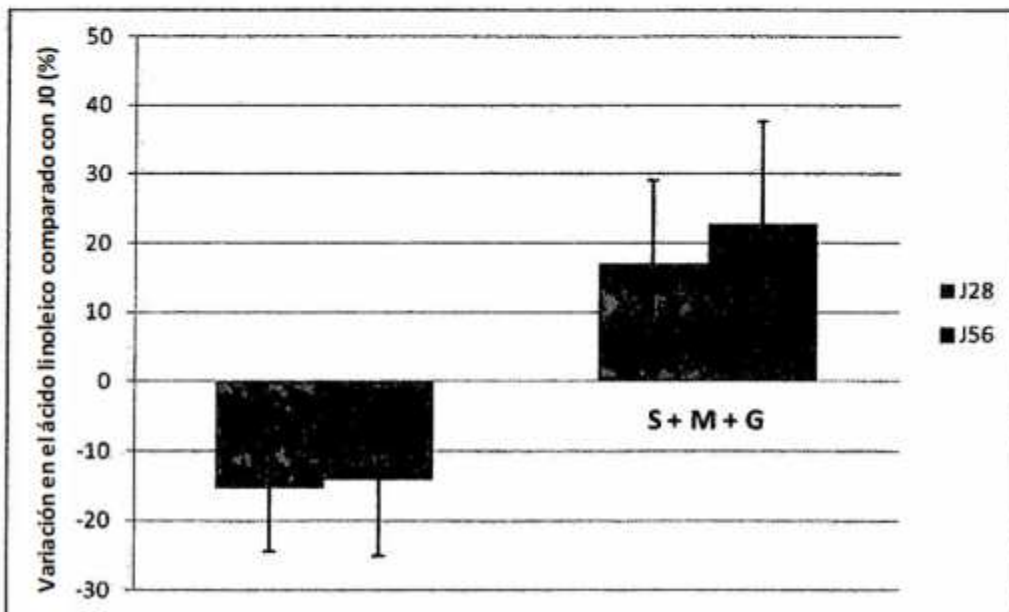


Figura 7

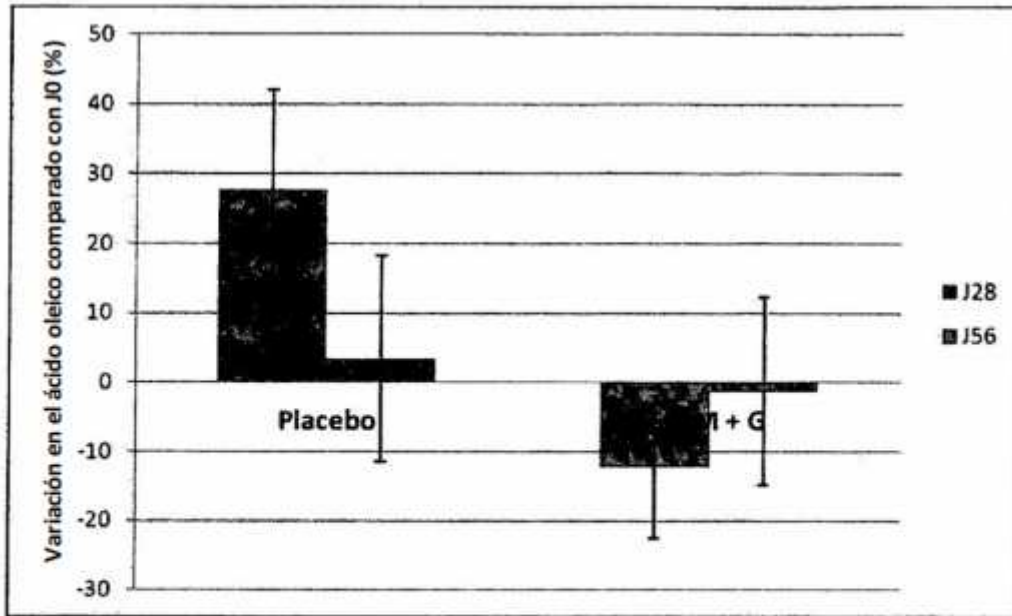


Figura 8