

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 559**

51 Int. Cl.:

A61K 8/67 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2001 E 01957886 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1333800**

54 Título: **Composiciones de acondicionamiento de la piel que contienen compuestos para reproducir el efecto del ácido retinoico sobre la piel**

30 Prioridad:

30.06.2000 US 215301 P

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

10.12.2014

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**GRANGER, STEWART PATON;
SCOTT, IAN RICHARD;
IOBST, SUSANNE TEKLITS;
LICAMELI, LISA y
DONOVAN, ROBERT MARK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 559 T3

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

DESCRIPCIÓN

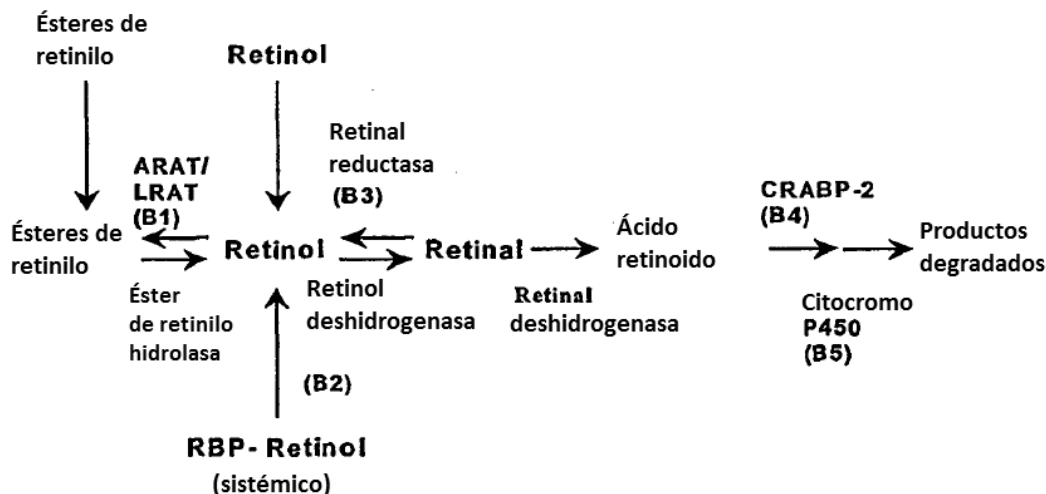
Composiciones de acondicionamiento de la piel que contienen compuestos para reproducir el efecto del ácido retinoico sobre la piel

5 La presente invención se refiere a composiciones cosméticas de acondicionamiento de la piel que contienen ciertos compuestos que reproducen el efecto del ácido retinoico sobre la piel

10 El retinol (vitamina A) es un compuesto endógeno que aparece de forma natural en el cuerpo humano y es esencial para la diferenciación de las células epiteliales normales. Se han usado ampliamente derivados naturales y sintéticos de la vitamina A para el tratamiento de una variedad de trastornos de la piel y se han usado como agentes de reparación o renovación de la piel. El ácido retinoico se ha empleado para tratar una variedad de estados de la piel, por ejemplo, acné, arrugas, psoriasis, manchas de edad y decoloración. Véase, por ejemplo, Vahlquist, A. et al., J. Invest. Dermatol., Vol. 94, Holland D.B. y Cunliffe, W.J. (1990), pág. 496-498; Ellis, C.N. et al., "Pharmacology of Retinols in Skin", Vasel, Karger, Vol. 3, (1989), pág. 249-252; Lowe, N.J. et al., "Pharmacology of Retinols in Skin", Vol. 3, (1989), pág. 240-248; Solicitud de patente PCT N° WO 93/19743.

15 Se cree que los ésteres de retinol y el retinol se convierten metabólicamente en la piel en ácido retinoico según el siguiente mecanismo:

Metabolismo del retinol en la superficie: nombres de las enzimas



20 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que ciertos compuestos potencian la conversión de los ésteres de retinilo y el retinol en ácido retinoico. Los compuestos se denominan colectivamente "refuerzos" y se codifican como grupos B1 a B5 de acuerdo con el mecanismo de refuerzo del compuesto particular. El mecanismo de los grupos de refuerzo es el siguiente: inhibición ARAT / LRAT (AcilCoenzima A (CoA): retinol acil transferasa/lecitina: retinol acil transferasa) (B1), potenciando la actividad la retinol deshidrogenasa (B2), inhibiendo la actividad de la retinal reductasa (B3), antagonizando CRABP-II (proteína de unión al ácido retinoico celular II) la unión del ácido retinoico (B4) e inhibiendo el citocromo P450 dependiente de la oxidación de ácidos retinoico (B5).

25 Los refuerzos, solos o en combinación unos con otros, potencian la acción de los retinoides mediante el aumento de la conversión de los retinoides en ácido retinoico y la prevención de la degradación del ácido retinoico. Los refuerzos actúan junto con un retinoide (por ejemplo, retinol, ésteres de retinilo, retinal, ácido retinoico), estando este último presente de forma endógena en la piel. Las composiciones incluyen un retinoide en la composición, presentes junto con un refuerzo o una combinación de refuerzos, para optimizar el rendimiento.

30 Varias patentes de Granger et al. describen el uso de reforzadores de retinoide en las composiciones cosméticas para mejorar la eficacia de del retinol y ésteres de retinilo (números de patente de Estados Unidos: 5759556, 5756109, 5747051, 5716627, 5811110; 5536740, 5747051, 5599548, 5955092, 5885595, 5759556, 5693330). Los refuerzos descritos en estas patentes están restringidos a las clases B1 y B5. Además Johnson & Johnson tienen una serie de patentes que describen el uso de moléculas que entran en moléculas de clase 5 de refuerzo (documentos US 5.028.628, US 5.037.829, US 5.151.421, US 476.852, US 5.500.435, US 5.583.136, US 5.612.354).

40 Las moléculas que actúan como refuerzos de retinoides son ingredientes comunes en los productos cosméticos. Existe una considerable técnica anterior que describe su uso en composiciones cosméticas. Hay técnica anterior sustancial que describe el uso de dos o más de estas moléculas en la misma composición. Algunos de los ejemplos de la técnica anterior son como en los documentos US 5.665.367, US 5.747.049, US 5.853.705, US 5.766.575 y US

5.849.310.

Sin embargo, la técnica anterior no describe la sinergia derivada de combinaciones de moléculas de refuerzo. . Esta observación de un refuerzo sinérgico de la actividad retinoide partir de combinaciones de moléculas de refuerzo fue un hallazgo inesperado. La técnica anterior no describe las concentraciones o proporciones de moléculas de refuerzo o proporciones de moléculas de refuerzo con las de los retinoides. Por lo tanto, la presente invención es novedosa en que mediante la combinación de retinoides cosméticos con moléculas de refuerzo, a las concentraciones o proporciones más adecuadas, se obtiene una mejora sustancial en la eficacia de los retinoides.

5

Las clases de propulsores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a ellos, los refuerzos enumerados en las Tablas B1 a B5.

10 Mejores Grupos de refuerzos

Compuestos B1

1. Amidas de ácidos grasos	Estas están fácilmente disponibles comercialmente y tienen la ventaja añadida de ser agentes tensioactivos y, por lo tanto, ayudan a generar emulsiones adecuadas para preparaciones cosméticas.
2. Ceramidas	Estas, además, pueden actuar como precursores de las ceramidas de barrera en el estrato córneo
3. Carotenoides	Estos pueden ofrecer cierta protección UV y actuar como colorantes naturales.
4. Flavanoides	Antioxidantes naturales.
5. Fragancias cíclicas	Estas están fácilmente disponibles comercialmente y, además, se pueden utilizar para dar fragancia al producto.
6. Fragancias no cíclicas	Estas se pueden utilizar para dar fragancia al producto.
7. Análogos de fosfolípidos	Estos pueden usarlos las células de la piel para alimentar la generación de componentes de la barrera.
8. Ureas	Estas están fácilmente disponibles comercialmente y también pueden actuar como conservantes para el producto.

Compuestos B2

1. Fosfatidilcolina	Los más preferidos como activadores más activos de la retinol deshidrogenasa
2. Esfingomielina	

15 **Compuestos B3**

Ácido araquidónico Ácido linoleico Ácido linolénico Ácido mirístico	Ácidos grasos que pueden ser útiles en el mantenimiento de la barrera del estrato córneo
Ácido linoleico Ácido linolénico	Ácidos grasos esenciales
Ácido araquidónico Ácido mirístico	Ácidos grasos no esenciales
ácido glicirretínico	Ácido carboxílico policíclico triterpeno que se obtiene fácilmente a partir de fuentes vegetales.
Fosfatidiletanolamina	Se pueden incorporar en las membranas celulares.

Compuestos B4

Ácido hexadecanodioico Ácido 12-hidroxiesteárico Ácido isoesteárico	Ácidos grasos saturados.
Aceite de linaza Ácido elaídico	Ácidos grasos insaturados
Ácido elaídico Ácido isoesteárico Ácido hexadecanodioico	Sólidos a temperatura ambiente
Aceite de linaza Ácido 12-hidroxiesteárico	Líquidos a temperatura ambiente.

Compuestos B5

Bifonazol Climbazol Clotrimazol Econazol Ketoconazol Miconazol	Antimicóticos
Climbazol	Fácilmente disponibles comercialmente
Laurilhidroxietilimidazolina	Compuestos que están fácilmente disponibles comercialmente y tienen la ventaja añadida de ser agentes tensioactivos y, por lo tanto, ayudan a generar emulsiones adecuadas para preparaciones cosméticas.
Quercetin	Flavanoide de origen natural que tiene propiedades antioxidantes
Cumarina	Colorante natural
Quinolinas Isoquinolinas	
Metirapona	

5 La presente invención incluye, en parte, una composición de acondicionamiento de la piel que contiene de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, preferentemente de 0,001 % a 10 %, más preferentemente de 0,001 % a 5 % en peso de la composición de un refuerzo o una combinación de refuerzos y un vehículo cosméticamente aceptable.

10 Los refuerzos o combinaciones de los mismos incluidos en las composiciones de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) un refuerzo seleccionado de entre el grupo que consiste en B2; B3; B4;

(b) combinaciones binarias de refuerzos seleccionados del grupo que consiste en:

B1/B2; B1/B3; B1/B4; B1/B5; B2/B3, B2/B4; B2/B5,
B3/B4; B3/B5; B4/B5

15 (c) combinaciones ternarias de refuerzos seleccionados del grupo que consiste en:

B1/B2/B3; B1/B2/B4; B1/B2/B5; B1/B3/B4; B1/B3/B5;
B1/B4/B5; B2/B3/B4; B2/B3/B5; B2/B4/B5; B3/B4/B5

(d) combinaciones cuaternarias de refuerzos seleccionados del grupo que consiste en:

20 B1/B2/B3/B4; B1/B2/B3/B5; B1/B2/B4/B5;
B1/B3/B4/B5; B2/B3/B4/B5;

y

(e) una combinación de cinco grupos de refuerzos:

B1/B2/B3/B4/B5.

Las composiciones preferidas incluyen de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, en peso de la composición de un retinoide.

5 Los compuestos incluidos en la presente invención como refuerzos se seleccionan basados en la capacidad de estos compuestos para pasar, a una cierta concentración indicada en la Tabla A, ensayos in vitro por enzimas específicas como se describe a continuación en las secciones 2.1 a 2.7.

10 El término "acondicionamiento" según se usa en la presente invención se refiere a la prevención y al tratamiento de una o más de los siguientes estados: piel seca, piel fotodañada, aparición de arrugas, manchas de edad, piel envejecida. Las composiciones también son útiles para aumentar la flexibilidad del estrato córneo, para aclarar el color de la piel, para controlar la excreción de sebo y para aumentar, en general, la calidad de la piel. . La composición se puede usar para mejorar la descamación de la piel y la diferenciación epidérmica.

La presencia de los compuestos seleccionados en la composición de la invención mejora sustancialmente el comportamiento de un retinoide.

15 Las composiciones de la invención contienen un retinoide que se selecciona de ésteres de retinilo, retinol, retinal y ácido retinoico, preferentemente retinol o el éster de retinilo. El término "retinol" incluye los siguientes isómeros de retinol: todo-trans-retinol, 13-cis-retinol, 11-cis-retinol, 9-cis-retinol, 3,4-dideshidro-retinol, 3,4-didehidro-13-cis-retinol; 3,4-didehidro-11-cis-retinol; 3,4-didehidro-9-cis-retinol. Los isómeros preferidos son todo-trans-retinol, 13-cis-retinol, 3,4-dideshidroretinol, 9-cis-retinol. El más preferido es todo-trans-retinol, debido a su amplia disponibilidad comercial.

20 El éster de retinilo es un éster de retinol. El término "retinol" se ha definido anteriormente. Los ésteres de retinilo adecuados para uso en la presente invención son los ésteres C₁-C₃₀ de retinol, preferentemente ésteres C₂-C₂₀, y lo más preferentemente los ésteres C₂, C₃ y C₁₆ debido a que se encuentran más comúnmente disponibles. ejemplos de ésteres de retinilo incluyen, pero no se limitan a: palmitato de retinilo, formiato de retinilo, acetato de retinilo, propionato de retinilo, butirato de retinilo, valerato de retinilo, isovalerato de retinilo, hexanoato de retinilo, heptanoato de retinilo, octanoato de retinilo, nonanoato de retinilo, decanoato de retinilo, undecanoato de retinilo, laurato de retinilo, tridecanoato de retinilo, miristato de retinilo, pentadecanoato de retinilo, heptadecanoato de retinilo, estearato de retinilo, isoestearato de retinilo, nonadecanoato de retinilo, araquidonato de retinilo, behenato de retinilo, linoleato de retinilo y oleato de retinilo.

25 El éster preferido para uso en la presente invención se selecciona de palmitato de retinilo, acetato de retinilo y propionato de retinilo, debido a que son los que tienen mayor disponibilidad en el mercado y, por tanto, los más baratos. El linoleato de retinilo y el oleato de retinilo también se prefieren debido a su eficacia.

30 El retinol y/o el éster de retinilo se emplean en la composición de la invención en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1 %, lo más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,5 %.

35 El ingrediente esencial de las composiciones de la invención es un compuesto que supere los Ensayos descritos más adelante en las secciones 2.1 a 2.7. Un compuesto adecuado para uso en la presente invención inhibe o potencia con una concentración de 100 mM indicado en la Tabla A una enzima hasta al menos un amplio % enumerado en la Tabla A.

40 **Sección A: Identificación del refuerzo:**

TABLA A

Concentraciones de ensayo del refuerzo y % de inhibición/incremento		
Ensayo ARAT / LRAT (para identificar los refuerzos B1)		
Invención	Concentración del compuesto	% de inhibición
Ancho	100 µM	> 10 %
Preferido	100 µM	> 25 %
Lo más preferido	100 µM	> 40 %
Óptimo	100 µM	> 50 %

(continuación)

Concentraciones de ensayo del refuerzo y % de inhibición/incremento		
Ensayo ARAT / LRAT (para identificar los refuerzos B1)		
Invencción	Concentración del compuesto	% de inhibición
Ensayo de retinol deshidrogenasa (para identificar los refuerzos B2)		
Invencción	Concentración del compuesto	% de incremento
Ancho	100 µM	> 10 %
Preferido	100 µM	> 15 %
Lo más preferido	100 µM	> 20 %
Óptimo	100 µM	> 25 %
Ensayo de retinal reductasa (para identificar los refuerzos B3)		
Invencción	Concentración del compuesto	% de inhibición
Ancho	100 µM	> 5 %
Preferido	100 µM	> 10 %
Lo más preferido	100 µM	> 20 %
Óptimo	100 µM	> 35 %
Ensayo de antagonista de CRABPII (para identificar los refuerzos B4)		
Invencción	Compuesto: proporción de ácido retinoico	% de inhibición
Ancho	7000 : 1	> 25 %
Preferido	7000 : 1	> 50 %
Lo más preferido	70 : 1	> 25 %
Óptimo	70 : 1	> 50 %
Ensayo de oxidación de ácido retinoico (para identificar los refuerzos B5)		
Invencción	Concentración del compuesto	% de inhibición
Ancho	100 µM	> 25 %
Preferido	100 µM	> 45 %
Lo más preferido	100 µM	> 70 %
Óptimo	100 µM	> 80 %

Los ensayos microsomaes in vitro usados para determinar la idoneidad de la inclusión del compuesto en las composiciones de la invención son los siguientes:

5 1. Materiales

10 Todo-trans-retinol, ácido todo-trans-retinoico ácido, palmitoil-CoA, dilauroilfosfatidilcolina, NAD y NADPH se adquirieron de Sigma Chemical Company. Las soluciones madre de los retinoides para los ensayos microsomaes se prepararon en acetonitrilo de calidad HPLC. Todas las soluciones madre de patrón de retinoides para el análisis de HPLC se prepararon en etanol, se almacenaron en atmósfera de N₂ a -70 °C y se mantuvieron en hielo bajo una luz ámbar cuando estaban fuera del almacenamiento. Otros productos químicos y los inhibidores estaban disponibles comercialmente en proveedores de materiales cosméticos o empresas químicas tales como Aldrich o International Flavours and Fragrances.

2. Procedimientos

2.1 Aislamiento de los microsomas de RPE (modificado de (1))

Se obtuvieron 50 globos oculares bovinos hemiseccionados congelados, de los que se había extraído la retina y el humor acuoso en WL Lawson Co., Lincoln, NE, EE.UU. Los ojos se descongelaron durante la noche y se extrajo la membrana iridiscente coloreada mediante extracción con fórceps. Cada ocular se lavó con 0,5 ml de tampón enfriado 2x. Cada globo ocular se lavó con 2x 0,5 ml de tampón frío (PO_4 0,1M / DTT 1 mM / sacarosa 0,25 M, pH 7) mediante frotado de las células de pigmentación oscura con pincel de pintor o una espátula de goma. La suspensión celular se añadió a las membranas iridiscentes y la suspensión se agitó durante varios minutos en un vaso de precipitados con una barra de agitación de teflón. La suspensión se filtró a través de un filtro grueso (Spectra/Por tamaño de poro 925 μ en malla de polietileno) para eliminar las partículas grandes, y la suspensión de color oscuro resultante se homogeneizó usando una Glas-Col con un homogeneizador de teflón accionado por motor.

El homogeneizado de células se centrifugó durante 30 minutos a 20.000 g (centrífuga modelo Sorvaal RC-5B con un rotor SS34 en Tubos 2.5x10cm a 14.000 rpm). El sobrenadante resultante se sometió a una centrifugación adicional durante 60 minutos a 150.000 g (Ultracentrífuga Beckman modelo L80 con un rotor SW50.1 en Tubos de 13 x51mm a 40.000 rpm). Los sedimentos resultantes se dispersaron en ~ 5 ml de PO_4 0,1M/ DTT 5 mM, tampón de pH 7 utilizando un Heat Systems Ultrasonics, Inc. modelo W185D Sonifier Celular Disruptor, y la dispersión microsomal resultante se alícuotó en tubos pequeños y se almacenó a -70 °C. Las concentraciones de proteínas de los microsomas se determinaron usando el ensayo de unión del colorante BioRad, utilizando BSA como patrón.

2.2 Aislamiento de los microsomas de hígado de rata (4)

Aproximadamente 6 gramos de hígado de rata congelado (obtenido de ratas Harlan Sprague Dawley de Accurate Chemical y Scientific Corp.) se homogeneizaron en 3 volúmenes de tampón Tris 0,1 M /KCl 0,1 M / EDTA 1 mM / sacarosa 0,25 M, pH 7,4 usando un Brinkmann Polytron. La suspensión de tejido resultante se homogeneizó adicionalmente, en el homogeneizador de teflón accionado por motor descrito anteriormente. El homogeneizado resultante se centrifugó sucesivamente durante 30 minutos a 10.000 g, 30 minutos a 20.000 g, y 15 minutos a 30.000 g y el sobrenadante resultante se ultracentrifugó durante 80 minutos a 105.000 g. El sedimento se sometió a ultrasonidos en ~ 5 ml de tampón PO_4 0,1 M / EDTA 0,1 mM / MgCl_2 5 mM a pH 7,4 como se describió anteriormente y se almacenó como alícuotas a -70 °C. Las concentraciones de proteína se determinaron como se ha descrito anteriormente.

2.3 Ensayo para la actividad ARAT y LRAT (para identificar B1)

El procedimiento siguiente fue una modificación de un procedimiento descrito en la literatura (2). El siguiente tampón se preparó y se almacenó a 4 °C: PO_4 0,1 M / ditiotreitól 5 mM, pH 7,0 (PO_4 /DTT). El día del ensayo, se añadieron 2 mg de BSA por ml de tampón para dar un tampón de trabajo PO_4 / DTT / BSA. El sustrato retinol 1mM se preparó en acetonitrilo y se almacenó en botellas de color ámbar con gas nitrógeno a -20 °C. Las soluciones de Palmitoil-CoA 4 mM en tampón de trabajo (almacenadas en alícuotas) y de dilauroil fosfatidilcolina 4 mM en etanol se prepararon y se almacenaron a -20 °C. Los inhibidores se prepararon como soluciones madre de 10 mM en H_2O , etanol, acetonitrilo o DMSO. La solución de inactivación se preparó usando etanol puro que contiene 50 μg /ml de hidroxitolueno butilado (BHT), y una solución de hexano que contenía 50 μg / ml de BHT se utilizó para las extracciones.

A un vial de vidrio de 2 dram, se añadió lo siguiente en orden: tampón PO_4 / DTT / BSA para dar un volumen total de 500 μl , 5 μl de donante de acilo (palmitoil-CoA 4 mM y / o dilauroil fosfatidilcolina), 5 μl del inhibidor o blanco de disolvente (dilución madre 10 mM o más), seguido de aproximadamente 15 μg de proteína microsomal RPE (aproximadamente 15 μl de un alícuota de proteínas microsomales ~1 mg/ml). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 37 °C para equilibrar la temperatura de reacción y después se añadieron 5 μl de retinol.1mM. Los viales se taparon, se agitaron en vórtex durante 5 segundos y se incubaron durante 30-90 minutos a 37 °C. La reacción se inactivó mediante la adición de 0,5 ml de etanol / BHT. Los retinoides se extrajeron mediante la adición de 3 ml de hexano / BHT, agitando en vórtex durante varios segundos varias veces y centrifugando los tubos a baja velocidad durante 5 minutos para separar rápidamente las capas. La capa superior de hexano se retiró en un vial limpio, y la capa acuosa se volvió a extraer con otra 3 ml de hexano / BHT, como se describió anteriormente. Las capas de hexano se combinaron, se evaporaron en hexano por secado a 37 °C en una corriente de gas nitrógeno en un bloque de aluminio calentado. El residuo seco se almacenó a -20 °C hasta el análisis HPLC. La cantidad de palmitato de retinilo y laurato de retinilo se cuantificó para determinar la actividad de ARAT y LRAT, respectivamente, por la integración de la señal de HPLC como se describe a continuación.

Obsérvese que la solución de incubación contiene donante de acilo 40 μM , 100 μM o menos inhibidor, retinol 10 μM , aproximadamente 30 μg / ml de proteína microsomal, y casi PO_4 0,1 M/ pH 7 / DTT 5 mM / 2 mg / ml de BSA. Todos los pasos posteriores a la adición de retinol se realizaron en oscuridad o con luz ámbar.

2.4 Ensayo de actividad de retinol deshidrogenasa (para identificar B2)

Se prepararon las siguientes soluciones madre:

- 5 KH₂PO₄ 50mM, tampón a pH 7,4 esterilizado por filtración
 Todo-trans retinol 10mM (Sigma R7632) en DMSO.
 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 200 mM, sal de sodio (NADP) (Sigma N0505) en agua estéril.
 Compuesto de ensayo 40 mM en un disolvente adecuado (agua, tampón, etanol, cloroformo o DMSO).
 Dilución 1:10 de microsomas de hígado de rata en KH₂PO₄ 50 mM, tampón pH 7,4 (4 µg /µl).

A un vial de vidrio de 2 dram con tapón de rosca, se añadieron los siguientes en orden:

- 10 Tampón para dar un volumen final de 400 µl
 25 µl de microsomas diluidos (final = 100 µg) - Los microsomas llevados a ebullición se usaron para los controles y los microsomas regulares para las muestras de ensayo.
 4µl de NADP 200 mM (final = 2 mM)
 1µl de compuesto de ensayo 40 mM (final = 100µM)
 8µl de retinol 10 mM (final = 200 µM)
- 15 Los viales se incubaron en un baño de agua con agitación 37 °C durante 45 minutos. Se añadieron 500 µl de etanol enfriado con hielo a cada vial para inactivar la reacción. Los retinoides se extrajeron dos veces con hexano helado (2,7 ml por extracción). A cada vial se añadió acetato de retinilo (5µl de reserva 900 µM) durante la primera extracción como un medio de control de la eficacia de la extracción en cada muestra. Las muestras se agitaron con vórtex durante diez segundos antes de centrifugar suavemente durante cinco minutos a 1.000 rpm, 5 °C en una
- 20 centrífuga Beckman GS-6R. La capa superior de hexano que contiene los retinoides se separó de la capa acuosa después de cada extracción a un vial limpio de dos dram. El hexano se evaporó bajo una corriente suave de nitrógeno gaseoso. El residuo seco se almacenó a -20 °C hasta el análisis HPLC.

2.5 Ensayo de actividad de retinal reductasa (para identificar B3)

Todas las soluciones madre se prepararon como anteriormente con las siguientes sustituciones:

- 25 Todo-trans retinaldehído 10mM (Sigma R2500) en DMSO, en lugar de retinol.
 200 mM, fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida, sal tetrasódica (NADPH) (Sigma N7505) en agua estéril - en lugar de NADP.

A un vial de vidrio de 2 dram con tapón de rosca, se añadieron los siguientes en orden:

- 30 Tampón para dar un volumen final de 400µl
 25 µl de microsomas diluidos (final = 100 µg) – uso de microsomas llevados a ebullición como controles y microsomas regulares para las muestras de ensayo.
 4µl de NADPH 200 mM (final = 2 mM)
 1µl de compuesto de ensayo 40 mM (final = 100µM)
 3 µl de retinaldehído 10 mM (final = 75 µM)
- 35 Siga el mismo procedimiento de incubación y extracción que se ha detallado anteriormente.

2.6 Ensayo para antagonistas de CRABPII (para identificar B4)

2.6.1. Síntesis de CRABPII

a. Sistema de expresión

- 40 El gen CRABPII se clonó en el plásmido pET 29a-c (+) (Novagen). El gen clonado estaba bajo control de las fuertes señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7. La fuente de polimerasa de T7 fue proporcionada por la célula huésped de E. coli BLR(DE3)pLysS (Novagen). Este último tiene una copia cromosómica de la polimerasa T7 bajo el control de lacUV5, inducida por la presencia de IPTG.

El plásmido se transfirió a células E. coli BLR (DE3) pLysS mediante transformación de acuerdo con el protocolo del fabricante (Novagen).

45 b. Inducción

- 50 Un cultivo durante la noche de las células transformadas se diluyó a 1:100 en 2xYT que contiene 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg / ml de cloranfenicol. Las células crecieron con agitación a 37 °C hasta que la DO a 600 nm alcanzó 0,6-0,8. El IPTG se añadió a una concentración final de 1mM y el cultivo se incubó durante dos horas adicionales. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se almacenó a -20 °C.

2.6.2. Purificación

La purificación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en Norris y Li, 1997.

a. Lisis

5 El sedimento congelado se descongeló a temperatura ambiente en 1-2 volúmenes de pastillas de tampón de lisis recién preparado (Tris-HCl 50 mM, pH 8, 10 % (p / v) de sacarosa, EDTA 1 mM, 0,05 % (p / v) de azida sódica, DTT 0,5 mM, MnCl₂ 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2,5 mM, benzamidina 2,5 mM, 6µg / ml de DNasa). El lisado se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Más lisis se consiguió mediante tratamiento con ultrasonidos (seis ráfagas de 30 segundos a 68,9 MPa alternadas con cinco retrasos de 30 segundos en hielo). La fracción insoluble del lisado se eliminó por centrifugación a 15.000 rpm 1 hora a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a -10 20°C.

b. Filtración en gel en Sephacryl S300

15 El sobrenadante de la etapa a se cargó en una columna de 2,5x100 cm de Sephacryl S-300 (Pharmacia) a temperatura ambiente. El tampón de elución era Tris-HCl 20 mM, pH 8, DTT 0,5 mM, 0,05 % de azida de sodio (tampón A). El caudal fue de 2 ml / min. Las fracciones de 2 ml recogidas se revisaron para determinar la absorbancia ultravioleta a 280 nm. Las fracciones que representan los picos se examinaron por SDS-PAGE para determinar la presencia de CRABP II.

c. Cromatografía de intercambio aniónico

20 2 ml de fracciones de filtración en gel que contienen CRABP II se cargaron en una columna de amina cuaternaria de intercambio de aniones FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de tipo monoQ (Pharmacia). CRABP II se eluyó usando un tampón de gradiente desde 100 % de tampón A a 30 % de tampón B (100 % de tampón B = tampón A + NaCl 250 mM) durante un período de 20 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron fracciones de 1 ml cada minuto. Una vez más, la presencia de CRABP II se comprobó mediante SDS PAGE. CRABP II se almacenó a 4 °C antes de la liofilización utilizando una plataforma Micromodulyo 1.5K con vial Edwards High Vacuum International). Las muestras desecadas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en el ensayo de unión.

d. Detección de la presencia de CRABP II

30 La expresión y purificación de CRABP II se validó utilizando electroforesis en gel desnaturante SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 7-15 % (Biorad). Muestras de 10 µl se mezclaron con 10 µl de 2X tampón de carga (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, 0,2 % BPB, 20 % de glicerol, DTT 1mM) y se desnaturizó por calentamiento (2 minutos a 80 °C). Las muestras se cargaron en el gel que se sumergió en un tampón 1X Tris-glicina (Biorad) y una corriente constante (25 mA) se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tinción con azul de Coomassie, la proteína se identificó de acuerdo con su peso molecular tal como se determina con la escalera de proteínas de pretinción Benchmark (Gibco BRL).

35 Una transferencia de tipo Western se utilizó para confirmar la presencia de CRABP II. Las proteínas separadas en SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) con un casete Biorad. La transferencia se produjo en tampón 1X Tris-glicina tampón (Biorad) + 10 % de metanol. Se aplicó una corriente eléctrica (60 mA) durante 3 horas para permitir que la proteína migre a través de la membrana. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 5 % en TBS 1X durante una hora a temperatura ambiente y se sondeó con anticuerpos primarios frente a CRABP II (dilución 1/1000 de 5-CRA-B3 monoclonal de ratón) en el mismo tampón a 4 °C durante la noche. El día siguiente, la membrana se lavó con PBS (3 x 5 minutos) y después se incubó con la dilución 1: 2000 del anticuerpo secundario, anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (ECLTM, Amersham), durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó con 1 x PBS (3 x 5 minutos) y la proteína se detectó utilizando el kit de detección ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham).

La concentración de CRABP II purificado se determinó usando el kit de BSA (Pierce).

2.6.3. Ensayo de unión radiactivo

45 220 pmol de CRABP II se incubaron en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,4 con 15 pmol de ácido todo-trans retinoico (NEN) radiactiva en un volumen total de 70 µl. Para el ensayo competitivo, otro ligando en exceso (6670: 1, 670: 1 o 70: 1) se añadió a la mezcla. La reacción se produjo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Con el fin de separar el ácido todo-trans-retinoico no unido a partir del ácido trans-retinoico unido, se utilizó una columna minicromatografía de corte de 6 kD (BioRad). El tampón de almacenamiento se descartó usando un colector Microplex de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmacia). Las muestras se cargaron en la columna y la separación se produjo por gravedad durante un período de 30 minutos. El ácido retinoico ("RA") unido a CRABP II apareció en el filtrado, mientras el RA libre se quedó en la columna. La radiactividad del filtrado se midió por contador de centelleo.

2.7 Ensayo para la oxidación de NADPH dependiente de ácido retinoico (Para identificar B5)

El procedimiento siguiente es una modificación de un procedimiento descrito en la literatura (4). El siguiente tampón de ensayo se preparó y se almacenó a 4 °C: PO₄ 0,1M / EDTA 0,1mM /MgCl₂ 5mM, pH 7,4. El día del ensayo, se preparó una solución de NADPH 60 mM en tampón. Las reservas de inhibidor, solución de inactivación acidificada en etanol / BHT y hexano / BHT se prepararon como se ha descrito anteriormente. Una solución de trabajo de ácido retinoico 1mM se preparó por dilución de una reserva de 15 mM (en DMSO) con etanol.

A un vial de 2 dram, se añadió lo siguiente en orden: tampón de ensayo para dar un volumen final de 500 µl, 20µl de NADPH 60 mM, 5µ de inhibidor o blanco de disolvente, seguido de aproximadamente 2 mg de proteína microsomal de hígado de rata.

La mezcla se incubó durante 5 minutos. a 37 °C, se añadieron 5 µl de solución de trabajo de ácido retinoico 1mM. La incubación se continuó durante 60 minutos. a 37 °C - los viales no se taparon, ya que el proceso de oxidación requiere O₂ molecular además de NADPH. La inactivación llevó a cabo con etanol / BHT acidificado y la extracción se llevó a cabo con hexano / BHT como se describe anteriormente. La cuantificación de los metabolitos del ácido retinoico polares que eluyen rápidamente (que se supone que son ácido 4-oxo-retinoico) se llevó a cabo mediante la integración de la señal de HPLC como se describe a continuación.

Todas las etapas posteriores a la adición de ácido retinoico se realizaron en oscuridad o con luz ámbar. La solución final de incubación contenía NADPH 2,4 mM, 100 µM o menos de inhibidor, ácido retinoico 10 µM, aproximadamente 4 mg / ml de proteína microsomal de hígado de rata y casi PO₄ 0,1 M / EDTA 0,1 mM / MgCl₂ 5 mM.

Análisis por HPLC de los retinoides individuales

Las muestras para cuantificación del retinoide por HPLC se prepararon disolviendo el residuo en cada vial con 100 µl de metanol. La solución se transfirió a un tubo cónico de vidrio con 150 µl dentro de un vial de almacenamiento de 1 ml, se tapó herméticamente y se colocó dentro de un tomamuestras automático Waters 715. Se inyectaron alícuotas de 60 µl inmediatamente y se analizó el contenido de retinoides.

La instrumentación de cromatografía consistía en un gradiente de controlador / bomba Waters 600, un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y un detector de barrido de fluorescencia Waters 474. Dos protocolos de HPLC se utilizaron para el análisis retinoide. Para el ensayo de ARAT y LRAT, la separación de los ésteres de retinol y retinol se realizó con una columna analítica de fase inversa C18 Novapak de 3.9x300mm y una columna de seguridad Waters Sentry NovaPak C18 con una fase móvil isocrática de 80/20 (v / v) de metanol / THF ajustada a un caudal de 1 ml / minuto durante 10 minutos En el eluato se monitorizó la absorbancia a 325 nm y la fluorescencia a 325ex / 480em.

Una columna analítica de fase inversa C18 Novapak de 3,9x150mm de y una columna de seguridad Waters Sentry NovaPak C18 se usaron para separar los ácidos retinoides y los alcoholes para los ensayos de oxidación de retinol y ácido retinoico de usando una modificación de un sistema de gradiente descrito por Barua (5). Este sistema consistía en 20 minuto de. gradiente lineal de 68:32 (v / v) de metanol / agua que contiene acetato amónico 10 mM a 4: 1 (v / v) de metanol: diclorometano seguido de retención de 5 minutos a un caudal de 1 ml / minutos. El eluido de la columna se controló de 300 nm a 400 nm.

Estos protocolos se seleccionaron basándose en su capacidad para resolver claramente los ácidos retinoicos retinoides, alcoholes, aldehídos y / o ésteres pertinentes para cada ensayo y la rapidez relativa de separación. La identificación de los retinoides individuales por HPLC se basó en una coincidencia exacta del tiempo de retención de los picos desconocidos con la de los patrones de retinoide auténticos disponibles y el análisis de espectros UV (300-400) de los picos desconocidos frente a retinoides auténticos disponibles.

Referencias

- 1 J. C. Saari & D. L. Bredberg, "CoA and Non-CoA Dependent Retinol Esterification in Retinal Pigment Epithelium", J. Bill. Chem. 263, 8084-8090 (1988).
- 2 J. C. Saari & D. L. Bredberg, "ARAT & LRAT Activities of Bovine Retinal Pigment Epithelial Microsomes", Methods Enzymol. 190, 156-163 (1990).
- 3 J. L. Napoli & K. R. Race, "The Biosynthesis of Retinoic Acid from Retinol by Rat Tissues in vitro", Archives Biochem. Biophys. 255, 95-101 (1987).
- 4 R. Martini & M. Murray, "Participation of P450 3A Enzymes in Rat Hepatic Microsomal Retinoic Acid 4-Hydroxylation", Archives Biochem. Biophys. 303, 57-66 (1993).
- 5 A. B. Barua, "Analysis of Water-Soluble Compounds: Glucuronides", Methods Enzymol. 189, 136-145 (1990).

Los refuerzos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a ellos, los refuerzos enumerados en las Tablas B₁ a B₅ a continuación. La siguiente tabla proporciona la clase de refuerzo (B₁ - B₅), el nombre químico del compuesto, y los resultados de los ensayos apropiados utilizados para identificar el refuerzo (es decir ARAT / LRAT para B₁, retinol deshidrogenasa para B₂, inhibición de retinaldehído para B₃, CRABP es la unión para B₄ y la inhibición de la oxidación del ácido retinoico para B₅).

Inhibidores de ARAT/LRAT (B1)										
Clase	Compuesto	% de inhibición global de TG(-ROH/RE)	TG global (C150)	% de inhibición de ARAT (10jm)	% de inhibición de ARAT (100jm)	% de inhibición de LRAT (10jm)	% de inhibición de LRAT (100jm)			
Carotinoide	Crocefin		3,75E-05	15 %	34 %	0	15 %			
Ácidos grasos y otros tensioactivos	Acetil esfingosina		6,78E-06	19 %+/-12	62 %+/-11	10 %+/-10	50 %+/-18			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	C13 Beta-hidroxiácido / Amida	17 %			28 %		25 %			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Aceite de ricino MEA		3,25E-05							
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Cocoamidopropilbetaina				25 %					
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Coco Hidroxiethylimidazolina		2,84E-07		68 %		65 %			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Cocoamida-MEA (o monoetanolamida)				13 %		34 %			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Glicerol-PCA-Oleato				41 %+/-6		58 %+/-2			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Hexanoamida				20 %					
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	hexanoilestingosina		9,99E-05		28 %+/-4		37 %+/-9			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Hidroxiethyl-2-hidroxi-C12 Amida		3,29E-05		35 %		35 %			

(continuación)

Clase	Compuesto	% de inhibición global de TG(-ROH/RE)	TG global (CI50)	% de inhibición de ARAT (10jm)	% de inhibición de ARAT (100jm)	% de inhibición de LRAT (10jm)	% de inhibición de LRAT (100jm)
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Hidroxietil-2-hidroxi-C16 Amida			25 %	30 %		
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Lauroilsarcosina			20 %			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Lidocaina			12 %	0		
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Linoleamida-DEA (o linoleoilidietanolamida)	59 %		12 % \pm 3	43 % \pm 3	11 % \pm 9	51 % \pm 15
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Linoleamida-MEA (o monoetanolamida)		1,61E-05	14 %	35 %	20 % \pm 8	35 %
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Linoleamidopropil dimetilamina			69 % \pm 18			75 % \pm 4
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Melinamida			64 % \pm 15			43 % \pm 21
Amidas de ácidos grasos	miristoil sarcosina			41 % \pm 14			11 % \pm 11
otros tensioactivos							
Amidas de ácidos grasos, y otros tensioactivos	oleil betaina		2, 80E-05	47 %			
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Palmitamida-MEA			6 %	23 %	12 %	33 %
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Estearilhidroxiamida			10 %			10 %

(continuación)

Clase	Compuesto	% de inhibición global de TG(-ROH/RE)	TG global (CI50)	% de inhibición de ARAT (10jm)	% de inhibición de ARAT (100jm)	% de inhibición de LRAT (10jm)	% de inhibición de LRAT (100jm)
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Utrecht-1	21 %		43 %	54 %	51 %	48 %+/-6
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Utrecht-2		3,47E-06	42 %	83 %+/-9	51 %	92 %+/-3
Flavonoides	Naringenina				33 %		14 %
Fragancias	Alil alfa-ionona			16 %+/-14	22 %+/-23	17 %+/-10	36 %/-7
Fragancias	Alfa-Damascona		3,35E-04	67 %+/-27	83 %+/-12	87 %+/-6	98 %+/-1
Fragancias	Alfa-Ionona		9,27E-04		45 %+/-27		49 %+/-30
Fragancias	Alfa-metilionona				67 %		77 %
Fragancias	Alfa-Terpineol				26 %		25 %
Fragancias	Beta-Damascona			45 %	84 %	52 %	92 %
Fragancias	Brahmanol				70 %		75 %
Fragancias	Damasconona			23 %	70 %	29 %	79 %
Fragancias	Delta-Damascona			58 %	87 %	64 %	95 %
Fragancias	Dihidro Alfa-Ionona				13 %		18 %
Fragancias	Safranato de etilo				51 %		49 %
Fragancias	Alcohol fenilico				12 %		4 %
Fragancias	Gamma-metilionona				21 %		38 %
Fragancias	Isobutilionona				8 %		45 %
Fragancias	Isociclogeraniol				18 %		16 %
Fragancias	Isodamascona				80 %		92 %
Fragancias	Liral		1,27E-04		76 %		71 %
Fragancias	Santalona				23 %		12 %
Fragancias	Santanol				15 %		43 %
Fragancias	Timberol				34 %		33 %
Fragancias	Tonalid				50 %		33 %

(continuación)

Clase	Compuesto	% de inhibición global de TG(-ROH/RE)	TG global (CI50)	% de inhibición de ARAT (10µm)	% de inhibición de ARAT (100µm)	% de inhibición de LRAT (10µm)	% de inhibición de LRAT (100µm)
Fragancias	Traseolida			41 %			21 %
Otros	Coco Trimetilamonio Cl-			27 %			
Otros	Ácido ursólico		1,46E-06	21 %			28 %
Fragancias no cíclicas	Citral			20 %			
Fragancias no cíclicas	Citronelol			30 %			0
Fragancias no cíclicas	Farnesol		9,35E-05	53 %+/-18		10 %+/-7	53 %+/-19
Fragancias no cíclicas	Geraniol		7,83E-03	13 %			
Fragancias no cíclicas	Geraniol Geraniol			38 %+/-12		16 %+/-9	77 %+/-13
Fragancias no cíclicas	Linalool			28 %			0
Fragancias no cíclicas	Nonadienal			20 %			
Fragancias no cíclicas	Pseudoionona			12 %			37 %
Fragancias fosfolípidos	Diocilfosfatidiletanolamina					0	
Urea	Dimetilimidazolidinona	22 %		23 %			17 %+/-17
Urea	Imidazolidinil Urea	35 %					

Activadores de la retinol deshidrogenasa (B2)

Clase	Compuesto	% Incremento de la retinol deshidrogenasa
Fosfolípido	Fosfatidilcolina	21 % de incremento
Fosfolípido	Esfingomielina	26 % de incremento

Inhibidores de la retinaldehído reductasa (B3)

Clase	Compuesto	TG global (CI50)	% de inhibición de la retinal reductasa
Aldehído	Vanillina	9,70E-03	6 %
Ácido graso	Ácido araquídico		20 %
Ácido graso	Ácido araquidónico		49 %
Ácido graso	Ácido linoleico	1,63E-04	62 % +/-2
Ácido graso	Ácido linolénico	1,34E-04	54 % +/-16
Ácido graso	Ácido mirístico	1,72E-05	26 %
Otros	Amsacrina	6,26E-06	22 % +/-8
Otros	Carbenoxolona	3,61E-07	26 % +/-2
Otros	ácido glicirretínico	8,64E-06	38 % +/-1
Fosfolípido	Fosfatidiletanolamina		37 %

Antagonistas de CRABPII (B4)

Clase	Compuesto	TG global (CI50)	% de inhibición CRABPII
Ácido graso	Ácido elaídico	6,50E-05	>50 %
Ácido graso	Ácido hexadecanodioico	1,30E-04	>50 %
Ácido graso	Ácido 12-hidroxiesteárico	2,91E-05	>50 %
Ácido graso	Ácido isoesteárico	6,88E-05	>50 %
Ácidos grasos	Aceite de linaza		>50 %

Inhibidores de la oxidación del ácido retinoico (B5)

Clase	Compuesto	TG global (CI50)	% Inhibición ácido retinoico (10µM)	% Inhibición ácido retinoico (100 µM)
Imidazol	Bifonazol		89 %	100 %
Imidazol	Climbazol	9,47E-06	80 %	92 %
Imidazol	Clotrimazol		76 %	85 %
Imidazol	Econazol		88 %	100 %
Imidazol	Ketoconazol	1,85E-07	84 %	84 %
Imidazol	Miconazol	2,78E-07	74 %	86 %
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	Laurilhidroxietilimidazolina	4,67E-07		
Amidas de ácidos grasos y otros tensioactivos	oleilhidroxietilimidazolina	3,02E-05	54 %	80 %
Flavonoides	Quercetin	6,29E-05	40 %	74 %
Cumarina	Cumarina			
Quinolina	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	8,59E-07		
Quinolina	Hidroxiquinolina (Carboestirilo)	3,64E-04		
Quinolina	Metilrapona (2-Metil-1,2-di-3-Piridil-1-Propano)			47 %

Sección b. Efectos de las combinaciones de refuerzos

- 5 Con el fin de evaluar el efecto de combinaciones de moléculas de refuerzo se requiere un ensayo que abarque el efecto de cada una de las cinco clases de refuerzos. Un único ensayo de la enzima no es adecuado para este propósito, ya que será específico sólo para una clase de molécula de refuerzo. Un ensayo que refleja la concentración de retinoide en los queratinocitos es necesario para relacionar los efectos de las moléculas de

refuerzo individuales con combinación de moléculas de refuerzo. Por esta razón, se utilizó un ensayo de transglutaminasa (TGasa). Las TGasas son enzimas dependientes de calcio que catalizan la formación de reticulaciones covalentes en las proteínas. Varias enzimas TGasa están unidas a la membrana en los queratinocitos, lo que es importante para la maduración de las células epidérmicas. Esta enzima es inhibida por el ácido retinoico. Cuanto mayor sea la concentración de ácido retinoico, mayor es la inhibición de la expresión de TGasa. Por lo tanto TGasa es un buen marcador de la diferenciación de queratinocitos y del efecto retinoide en los queratinocitos.

Transglutaminasa como un marcador de diferenciación de la piel.

Durante el procedimiento de diferenciación terminar en la epidermis, se forma una capa de 15 nm de espesor de proteína, conocida como la cubierta cornificada (CC) sobre la superficie interior de la periferia celular. La CC está compuesta por numerosas proteínas distintas que se han entrecruzado entre sí mediante la formación de enlaces isodipeptídicos N Σ -(γ -glutamil) lisina catalizados por la acción de al menos dos transglutaminasas (TGasas) diferentes expresadas en la epidermis. La transglutaminasa I (TGasa) se expresa en abundancia en las capas diferenciadas de la epidermis, especialmente en la capa granular, pero no está presente en la epidermis basal no diferenciada. Así pues, la TGasa I constituye un marcador útil para la diferenciación de los queratinocitos, indicando los elevados niveles de TGasa I un estado más diferenciado. Se usó un ensayo de la TGasa I basado en un ELISA, usando un anticuerpo de la TGasa I, para evaluar el estado de diferenciación de los queratinocitos cultivados en los ejemplos siguientes.

Se cultivaron queratinocitos (cultivados como se ha descrito anteriormente) en placas de 96 pocillos con una densidad de 4.000-5.000 células por pocillo en 200 μ l de medio. Tras incubar durante dos o tres días, o hasta que las células alcanzaron un -50 % de confluencia, se cambió el medio por un medio que contenía los compuestos de ensayo (seis réplicas por prueba). Las células se cultivaron durante 96 horas adicionales, tiempo tras el que el medio se aspiró y las placas se almacenaron a -70°C. Las placas se retiraron del congelador, y las células se lavaron dos veces con 200 μ l 1xPBS. Las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente (TA) con TBS / BSA al 5 % (tampón de lavado, albúmina de suero bovino). Después se añadió el anticuerpo primario TGasa: 50 μ l de anticuerpos monoclonales anti-Tgasa diluidos a 1:2.000 en tampón de lavado. El anticuerpo primario se incubó durante 2 horas a 37 °C y después se aclaró 6x con tampón de lavado. Las células se incubaron después con 50 μ l de anticuerpo secundario (fragmento Fab, conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón de de Amersham) diluido a 1:4.000 en tampón de lavado durante dos horas a 37 °C, a continuación se enjuagaron tres veces con tampón de lavado. Tras el aclarado con tampón de lavado, las células se lavaron 3 veces con PBS. Para el desarrollo colorimétrico, las células se incubaron con una solución de 100 μ l de sustrato (4 mg o-fenilendiamina y 3,3 l 30 % H₂O₂ en 10 ml de tampón citrato 0,1M a pH 5,0) durante exactamente cinco minutos a TA en la oscuridad (bajo papel de aluminio). La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 4N. La absorbancia de las muestras se leyó a 492 nm en el espectrofotómetro de UV de placas de 96 pocillos. De las seis réplicas, cuatro se trataron con ambos anticuerpos, y el quinto se usó como TGasa de fondo control. Los niveles de TGasa se determinaron restando y se expresaron como el porcentaje de control.

Detalles del ensayo de TGasa:

Antes de iniciar los experimentos, para determinar los efectos de las combinaciones de moléculas de refuerzo se investigaron las condiciones de ensayo estándar TGasa. Un ensayo de TGasa plenamente validados se estableció de la siguiente manera:

A. Reactivos

Células: Queratinocitos humanos(P2 en matraces T75; P3 en placas de ensayo de 96 pocillos)	Prepucio humano Neonatal
Anticuerpo principal: TGM monoclonal específico Ab B.C1	Biogenesis (N° Cat 5560 - 6006)
Ac secundario: F(ab) 2:de la Ig anti-ratón marcada con peroxidasa	Amersham (Cat # NA9310)
Solución de sustrato: Para 10 ml de tampón citrato fosfato	
4,0 mg de o-fenilendiamina	Sigma P-7288
3,3 μ l de 30 % de H ₂ O ₂	Sigma H-1909

B. Medios/Tampones

Medio de crecimiento de queratinocitos (KGM)	Clonetics (N° Cat 3111)
Solución salina tamponada con fosfato; Dulbecco sin Ca / MgCl ₂)	Life Technology (Cat # 14200-075)
Solución salina tamponada con Tris	
Tampón de bloqueo (1xTBS + 5 % de leche en polvo)	BioRad (Cat #170-6404)
Tampón de lavado (leche en polvo al 1 % en TBS + 0,05 % de Tween 20)	Sigma (Cat # P-7949)
tampón fosfato citrato: Mezcla 1: 1 de 0,2 M dibásico	Sigma (Cat # S-9763)
fosfato de sodio y ácido cítrico 0,1 M	Sigma (Cat # C-1909)
H ₂ SO ₄ 4 N	

C. Accesorios para cultivo

Placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos	Costar (Cat # 3595)
Placa de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U	Costar (Cat # 3794)
T75- tapa de ventilación	Costar (Cat # 3376)

5 D: Instrumentación/Equipo

Lector de microplacas Biotek Modelo EL 340	Bio-tek Instruments Inc.
Multiprobe II	Packard

E: Procedimiento de cultivo celular

Siembra de los queratinocitos en placas de 96 pocillos

- 10
1. Una suspensión de queratinocitos se preparó a una concentración de 3.000 células / 200 µl / pocillo en medio KGM (Usado 3x10⁵ células / 12 ml de medio en cada placa de microtitulación)
 2. 200 µl de la suspensión de queratinocitos se transfirió únicamente a cada uno de los 60 pocillos internos.
 3. 200 µl de medios KGM se pipetearon en los pocillos exteriores (para mantener el equilibrio térmico).
 4. Cada placa se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 3 días o hasta que las células son ~ 50 % de confluencia.

15 Tratamiento de queratinocitos con muestras

- 20
5. Las soluciones madre de las muestras se prepararon en DMSO.
 6. Las muestras se diluyeron a la concentración deseada con la concentración de ensayo final de DMSO de 0,1 %.
 7. 20 µl de la muestra se transfirió a los pocillos y 180µl de medio KGM se añadieron para dar un volumen de ensayo final de 200 µl.
 8. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas.
 9. Los medios se retiraron completamente de cada pocillo
 10. Los pocillos se lavaron 2 veces con 200 µl de 1xPBS.
 11. Finalmente, se congelaron durante al menos 1,5 horas a - 70 °C

25 F: Ensayo de la transglutaminasa

- 30
1. Bloqueo: Incubar las placas a temperatura ambiente con 200 µl / pocillo de tampón de bloqueo durante 1 hora.
 2. Anticuerpo principal: Aspirar el tampón de bloqueo. . Incubación con 100 µl/ pocillo de -anticuerpo monoclonal específico B.C1 TGm (diluido 1: 2000 en tampón de lavado) a 37 °C durante al menos 2 horas. El anticuerpo primario no se añadió en los pocillos de control de fondo.
 3. Aclarado de los pocillos 6x con tampón de lavado.
 4. Anticuerpo secundario: Incubación con 100 µl/ pocillo de fragmento F(ab)₂ de Ig marcado con peroxidasa anti-ratón (diluido 1: 4000 en tampón de lavado) a 37 °C durante 2 horas.
 5. Aclarado de los pocillos 6x con tampón de lavado (200 µl añadido) y aspiración después de cada lavado.
 6. Aclarado de los pocillos 3x con PBS sin Tween.
 7. Incubación con 100 µl/ pocillo de solución de sustrato a temperatura ambiente durante exactamente 5 minutos.
 8. Detención de la reacción con 50 µl / pocillo H₂SO₄ 4N.
- 35

9. Leer absorbancia a 492 nm en el lector de placas de Bio-tek

I. Estudios de optimización

a. Curso de tiempo de la producción de transglutaminasa

5 Un experimento de transcurso de tiempo se llevó a cabo para determinar el tiempo de incubación óptimo para la producción de transglutaminasa en queratinocitos cultivados en placas de 96 pocillos (4000 células / pocillo). Este tiempo de estudio se llevó a cabo con múltiples variables incluyendo análisis de respuesta a la dosis de ácido retinoico y retinol así como de incubación en presencia de CaCl_2 1,2 mM. Aunque la producción de transglutaminasa en las células control (DMSO al 0,1 %) no se alteró, tanto el ácido retinoico como el retinol exhibieron una inhibición dependiente de la dosis de la producción de transglutaminasa durante el período de incubación de cinco días. El efecto retinoide más pronunciado se observó los días 2 y 3. La inhibición máxima se observó el día 2, inhibiéndose la producción de transglutaminasa el día 2 en un 85 % y 55 % en presencia de la concentración más alta (1 μM) de ácido retinoico y retinol respectivamente. El mismo experimento se realizó también con diferentes densidad de células (3000 células / pocillo y 5000 células / pocillo) y se observaron resultados comparables.

B: Sensibilidad a DMSO

15 Diversas concentraciones de DMSO que van desde 0-2 % se analizaron para determinar el efecto sobre la producción de transglutaminasa en queratinocitos. El ensayo era sensible a la concentración de DMSO con una inhibición significativa de la actividad, por encima de 0,5 % de DMSO. Por lo tanto, se seleccionó una concentración de ensayo final de 0,1 % para los estudios posteriores de la concentración de la muestra.

C: Curvas dosis-respuesta: ácido retinoico y retinol

20 Basándose en los datos, día 3 se seleccionó como el tiempo óptimo y 0,1 % de DMSO se seleccionó como la concentración a utilizar para la prueba adicional. Un experimento de respuesta a la dosis adicional se llevó a cabo con ácido retinoico y retinol en presencia de 0,1 % de DMSO, con la producción de transglutaminasa analizada el día 3. Se observó una buena respuesta a la dosis para la inhibición de TGasa por el ácido retinoico y retinol. Retinol 10⁻⁷M dio una inhibición de la TGasa en el intervalo lineal de la concentración. . Por lo tanto, esta concentración de retinol se eligió para evaluar las combinaciones de refuerzos.

D: Condiciones finales utilizados para refuerzos de ensayo o combinación de refuerzos

Días de incubación de queratinocitos con

Retinol y refuerzos	- 3 días
Concentración final de DMSO	- menos de 0,1 %
concentración de retinol	- 10 ⁻⁷ M (0,1 μM)
Concentraciones del refuerzo	- 10 mM a 0,1 nM

30 Usando las condiciones anteriores se analizó la respuesta a la dosis para todos los diferentes refuerzos (B1-B5) para identificar la mejor concentración del refuerzo para probar en las combinaciones.

Los niveles de transglutaminasa se determinaron y se expresaron en la Tablas B1 a B5, ya sea como

(i) % (inhibición de refuerzo + retinol / inhibición de control) - % (inhibición de ROH / inhibición de control), que mide el efecto del refuerzo añadido + el inducido por retinol en la inhibición de TGasa sobre retinol solo, o

35 (ii) como un valor de CI50 cuando se examinó el efecto inhibitorio de concentraciones múltiples de refuerzo - esto proporciona la concentración de refuerzo que, en combinación con una concentración de retinol constante de 10⁻⁷ M, inhibe la TGasa en un 50 %.

Combinaciones de refuerzos y proporciones de refuerzos

40 Se ha descubierto sorprendentemente que ciertos compuestos de aumentar los niveles endógenos de la formación de ácido retinoico a partir de retinol o de ésteres de retinilo por diferentes mecanismos. Estos compuestos se denominan colectivamente "refuerzos" retinoides. Estos incluyen: inhibidores de la ARAT / LRAT (refuerzos B1), inhibidores de la retinaldehído reductasa de (refuerzos B3), inhibidores de la unión de ácido retinoico a CRABP-2 (refuerzos B4) e inhibidores de la oxidación de ácido retinoico catalizada por las enzimas del citocromo P450 (refuerzos B5), o ciertos otros compuestos que potencian o activan la retinol deshidrogenasa (refuerzos B2). Estos refuerzos se codifican como grupos B1 hasta B5, como se ve en el gráfico 1 en el presente documento

45 anteriormente.

5 Los refuerzos, solos o en combinación unos con otros, potencian la acción de de un retinoide mediante el aumento de la cantidad de retinol disponible para la conversión en ácido retinoico y la inhibición de la degradación del ácido retinoico. Los refuerzos actúan junto con un retinoide (por ejemplo, retinol, ésteres de retinilo, retinal, ácido retinoico), estando este último presente de forma endógena en la piel. No obstante, las composiciones incluyen un retinoide en la composición, presentes junto con un refuerzo para optimizar el rendimiento.

10 La presente invención incluye, en parte, una segunda composición de acondicionamiento de la piel que contiene de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, preferentemente de 0,001 % a 10 %, más preferentemente de 0,001 % a 5 % en peso de la composición de un refuerzo o al menos una combinación de combinaciones de refuerzos cuaternarios o 5. La concentración combinada de las combinaciones de refuerzo de 0,001 % a 5 % en las proporciones especificadas como se muestra a continuación, inhiben la transglutaminasa en un ensayo in vitro de la transglutaminasa en a más de 50 %, y un vehículo cosméticamente aceptable.

Los refuerzos incluidos en las composiciones de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

- 15 d. Combinaciones cuaternarias de refuerzos seleccionados entre el grupo que consiste en B1/B2/B3/B4; B1/B2/B3/B5; B1/B2/B4/B5; B1/B3/B4/B5; B2/B3/B4/B5; y
e. Una combinación de cinco grupos de refuerzos B1 / B2 / B3 / B4 / B5

Proporciones entre refuerzos:

Los refuerzos de diferentes clases (B1 a B5) en combinaciones como se muestra anteriormente tienen una concentración óptima de entre 0,001 % a 5 % en un producto cosmético en proporciones específicas como se muestra a continuación para la inhibición de la actividad TGasa a por lo menos por debajo de 50 %:

Invención	Proporciones entre refuerzos	Concentraciones
Ancho	1: 10,000 a 10,000:1	100 mM a 1 nM
Preferido	1: 1000 a 1000:1	10 mM a 10 nM
Lo más preferido	1:100 a 100:1	1 mM a 100 nM
Óptimo	1:10 a 10:1	0.1 mM a 1 µM

20

Proporciones entre retinoide y refuerzos:

La composición preferida incluye un retinoide (por ejemplo, retinol, éster de retinilo, y retinaldehído) en la composición, presente cooperación con un refuerzo o una combinación de los refuerzos, para optimizar el rendimiento.

25 Para un rendimiento óptimo, la concentración de retinoide y el refuerzo debe estar presente en la composición en proporciones como se indica a continuación:

Invención	Proporciones entre refuerzos y retinoides	Concentraciones
Ancho	10,000:1 a 1:10,000	100 mM- 1 nM de refuerzo; 0.001-10 % de retinoides
Preferido	1000:1 a 1:1000	10 mM-10 nM de refuerzo; 0.001-10 % de retinoide
Lo más preferido	100:1 a 1:100	1 mM-100 nM de refuerzo; 0,01-1 % de retinoide

Concentraciones de refuerzos individuales utilizadas en los ejemplos

30 Dado que el objetivo es establecer inhibición sinérgica de la expresión de la transglutaminasa por combinaciones de los compuestos activos con retinol, era esencial determinar los perfiles de respuesta a la dosis (valores de CI₅₀) de los compuestos activos, cuando se analizan individualmente en presencia de retinol. La respuesta a la dosis detallada de los refuerzos que pertenecen a B2-B4 se da en las tablas siguientes a la tabla de CI₅₀ e CI₂₀ siguiente. Estos datos se utilizaron para identificar una concentración inhibidora submáxima apropiada de cada compuesto activo, para hacer eventualmente posible identificar efectos sinérgicos putativos de las mezclas de los compuestos
35 activos en la presencia de retinol. Los datos de la tabla siguiente representan los valores de CI₅₀ y CI₂₀ (80 % del control) y las concentraciones utilizadas cuando se prueban las sinergias con combinaciones de refuerzos.

40 A fin de demostrar la sinergia de dos compuestos, es esencial seleccionar concentraciones para analizar que sean como máximo CI₂₀, en otras palabras, una concentración de compuesto que aumenta de forma individual la inhibición por retinol de la expresión de TGasa en un 20 %. Dos de tales compuestos deben tener una inhibición aditiva de 40 %. Utilizando esta estrategia para determinar las concentraciones deja una ventana de 40-100 % de inhibición adicional para la detección de la sinergia de los dos compuestos bajo examen.

ES 2 524 559 T3

Un criterio de concentración más difícil sería la selección de las concentraciones de compuestos que por sí sola no mostró ningún efecto de inhibición, pero en combinación mostró inhibición. En este estudio, sin embargo, se optó por un criterio aún más desafiante. Se seleccionaron concentraciones de los compuestos que fueron de 10 a 1000 veces menor que la concentración mínimamente eficaz inhibitoria de TGasa. Identificación de combinaciones sinérgicas que usan tales concentraciones muy bajas significaría que se identificaron las combinaciones sinérgicas más eficaces.

5

Clase de refuerzo	Nombre del compuesto	CI ₅₀	CI ₂₀	Conc. usada para la sinergia (binario, terciario, cuaternario)
B1	Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,61E-05	1,4BE-05	1E-05 a 1E-09
	Palmitamida monoetanolamida	ND	ND	1E-06 a 1E-10
	oleil betaína	2,80E-05	1,08E-05	1E-05 a 1E-8
	Naringenina	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Equinácea	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Dimetilimidazolidinona	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Melinamida	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Geranil geraniol	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Farnesol	9,35E-05	7,82E-05	1E-06 a 1E-09
	Geraniol	7,83E-03	4,72E-03	1E-03 a 1E-07
	α-Damascona	3,35E-04	1,69E-04	1E-04 a 1E-08
	α-Ionona	9,27E-04	1,42E-04	1E-04 a 1E-08
	Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	3,25E-05	9,38-E06	1E-06 a 1E-09
	Acido ursólico	1,46E-06	5,94-E07	1E-06 a 1E-09
	Utrecht-2	3,47-E06	3,30-E06	1E-06 a 1E-09
	Cocoil hidroxietilimidazolina	2,84E-07	9,21E-08	1E-08 a 1E-11
	Acetil esfingosina (ceramida C2)	6,78E-06	5,15E-06	1E-06 a 1E-09
	Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	9,99E-05	6,94E-05	1E-05 a 1E-09
	Crocetin	3,75E-05	2,52E-05	1E-05 a 1E-09
	Lyrial	1,27E-04	4,00E-05	1E-05 a 1E-09
	N-hidroxietil-2-hidroxidodecilamida	3,29E-05	2,40E-05	1E-05 a 1E-09
B2	Fosfatidilcolina	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Esfingomielina	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	TCC	9,64E-07	6,18-E07	1E-07 a 1E-10
	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ND	ND	1E-05 a 1E-09
B3	Amsacrina-HCl	6,26E-06	3,30E-06	1E-06 a 1E-09
	Carbenoxolona	3,61E-07	2,00E-07	1E-07 a 1E-10
	ácido glicirretínico	8,64E-06	5,96E-06	1E-06to 1E-09
	Ácido linoleico	1,63E-04	8,95E-05	1E-05 a 1E-09
	Acido linolénico	1,34E-04	1,21E-04	1E-05 a 1E-09
	ácido araquidónico (sal de Na ⁺)	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Ácido mirístico	1,72E-05	1,05E-05	1E-05 a 1E-09
	Vanillina	9,70E-03	8,47E-03	1E-03 a 1E-06

(continuación)

Clase de refuerzo	Nombre del compuesto	CI ₅₀	CI ₂₀	Conc. usada para la sinergia (binario, terciario, cuaternario)
B4	Ácido hexadecanodioico	1,30E-04	8,40E-05	1E-05 a 1E-09
	Ácido 12-hidroxiesteárico	2,91E-05	1,45E-05	1E-05 a 1E-09
	Ácido eláidico	6,50E-05	5,88E-05	1E-05 a 1E-09
	Aceite de linaza	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Ácido isoesteárico	6,88E-05	6,23E-05	1E-05 a 1E-09
	Ácido 2-hidroxiesteárico	ND	ND	1E-05 a 1E-09
B5	Climbazol	4,47E-06	2,45E-07	1E-07 a 1E-10
	Clotrimazol	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Miconazol	2,78E-07	8,42E-08	1E-08 a 1E-11
	Cumarina	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Ketoconazol	1,85E-07	5,52E-08	1E-08 a 1E-11
	3,4, dihidro-2 (1H) quinolinona (Hidrocarbostirilo)	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	2-Hidroxiquinolina (Carboestirilo)	3,64E-04	1,70E-04	1E-04 a 1E-08
	Amino Benzotriazol	ND	ND	1E-05 a 1E-09
	Laurilhidroxietilimidazolina	4,67E-07	2,69E-07	1E-07 a 1E-10
	Quercetin	6,29E-05	5,11E-05	1E-05 a 1E-09
	oleilhidroxietilimidazolina	3,02E-05	5,65E-06	1E-06 a 1E-09
	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	8,59E-07	4,69E-07	1E-07 a 1E-09
ND: No determinado o no se observó una respuesta clara a la dosis. Para sinergias, se analizó una amplia gama de concentración (4 órdenes de magnitud 10 ⁻⁵ un 10 ⁻⁹ M),				

Respuesta a la dosis para la los refuerzos de clase B2 a B4

- 5 Las siguientes tablas incluyen los datos de la respuesta a la dosis de refuerzos pertenecientes a las clases B2 a B4. La concentración de los refuerzos se expresan en molar; nivel medio de la TGasa y la desviación estándar de 4 repeticiones se expresa como % de control (0,1 % de DMSO y 10-7M retinol). Los números más altos (cerca de 100 o por encima de 100) indican que no hay inhibición de la TGasa. Cuanto menor sea el número, más potente es el inhibidor a esa concentración. Los valores de CI₅₀ y CI₂₀ se calcularon a partir de esta tabla de dosis-respuesta y se expresan en la tabla anterior.
- 10 Refuerzos de la clase B2:

Fosfatidilcolina (B2)		
Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
4,4E-05	90,9	0,01
1,47E-05	120,3	10,6
4,89E-06	70,1	11,4
1,63E-06	98,8	0,00
5,43E-07	86,7	6,19
1,8E-07	75,9	20,5
6,0E-08	87,8	3,9
1,2E-08	159	42,3
2,4E-09	85,5	0,39

ES 2 524 559 T3

Esfingomielina (B2)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
3,0E-05	45	3,21
1,0E-05	77,8	25,5
3,33E-06	76,4	7,55
1,1E-06	98,8	0,00
3,73E-07	91,6	14,9
1,23E-07	70,0	3,63
4,10E-08	74,6	4,19
8,2E-08	115,2	1,02
1,65E-09	68,4	2,03
3,29E-10	69,2	2,1

TCC (B2)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1,14E-03	36,3	4,6
3,8E-04	3,8	0,96
3,31,23E-04	-3,2	0,91
4,22E-05	-11,2	0
1,41E-06	-,3	4,88
4,69E-07	15,9	3,52
6,26E-08	18,9	3,12
1,25E-08	100,2	23,3
6,9E-09	77,6	21,2
1,0E-09	54,4	11,23

5 1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida (B2)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1,6E-04	58,1	2,08
5,33E-05	95,4	21,3
1,78E-05	104	4,01
5,93E-06	129	0,0
1,98E-06	110	8,74
6,58E-07	92,8	15,78
2,19E-09	88,6	12,3
4,39E-08	127,3	3,39
8,78E-09	119	21,1
1,79E-9	82	15,6

ES 2 524 559 T3

Refuerzos de la clase B3:

Amsacrina B3

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
3,0E-05	-10	3,29
1,0E-05	1,8	7,45
3,33E-06	64	4,2
1,1E-06	84	0
3,73E-07	109	6,2
1,23E-07	65	15,8
4,10E-08	110	10,5
8,2E-08	131	27
1,65E-09	113	18
3,29E-10	92	8,9

Carbenoxolona (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
3,0E-06	-7,1	0
1,0E-06	27,3	1,15
3,33E-07	51,7	0
1,1E-07	158	0
3,73E-08	126	4,67
1,23E-08	81	29
4,10E-09	135	6,88
8,2E-10	112	32
1,65E-10	77,8	10,6
3,29E-11	64	49

5

Ácido glicirrético (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
3,0E-04	-0,3	3,9
1,0E-05	0,7	3,55
3,33E-05	2,5	2,1
1,1E-06	96,4	0,00
3,73E-06	120	33,2
1,23E-07	112	38
4,10E-07	93	11
8,2E-08	225	108
1,65E-08	103	11
3,29E-9	100	6,2

ES 2 524 559 T3

Ácido linoleico (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
9,0E-03	-6	3,06
3,0E-03	0,1	2,01
1E-03	-16,40	16,3
1,1E-04	4,4	0
3,73E-04,	79,2	0
1,23E-05	62,6	6,2
4,10E-05	76,8	3,69
8,2E-06	146	44,2
1,65E-07	106	20,2
3,29E-07	60,2	2,3

Ácido linolenico (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
9,0E-03	-11	8,7
3,0E-03	-5,7	0,74
1E-03	-7,5	7,8
1,1E-04	-23	0
3,73E-04,	68	0,57
1,23E-05	94,9	17,2
4,10E-05	65,9	0,03
8,2E-06	119	1,6
1,65E-07	77	8,5
3,29E-07	98	7,0

5 Ácido mirístico (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1E-03	-2	4,1
1,1E-04	-8	2,3
3,73E-04	-6	1,16
1,23E-05		
4,10E-05	75,1	1,06
8,2E-06	74,2	10,0
1,65E-07	88,9	8,4
3,29E-07	101	4,47
5,0E-08		
1,1E-08		

ES 2 524 559 T3

Vanillina (B3)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1,4E-02	21,5	24,2
4,8E-03	93,8	1,7
1E-03	124	15,6
1,1E-04		
3,73E-04	101	14,3
1,23E-05	82	14,6
4,10E-05	98	2,4
8,2E-06	109	22
1,65E-07	80	4
3,29E-07	93	41

Refuerzos de la clase B4:

Ácido hexadecanodioico (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1E-03		
1,1E-04	14,2	2,7
3,73E-04	43,4	8,4
1,23E-05	130	0
4,10E-05	105	14
8,2E-06	114	12
1,65E-07	95	1,9
3,29E-07		
5,0E-08	74	6,7
1,1E-08	70	10,4

5

Ácido 12-hidroxiestérico (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
3,73E-04		
1,23E-05	-5,2	2,3
4,10E-05	32,4	5,3
8,2E-06	97,6	0
1,65E-07	90,2	11
3,29E-07	82	28
5,0E-08	81	3,8
1,1E-08	98	24
2,0E-08	118	28
4,3E-09	71	2,3

ES 2 524 559 T3

Ácido eláidico (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1E-03	12,8	12,1
1,1E-04	8	0,45
3,73E-04	13,8	1,92
1,23E-05	80,9	0
4,10E-05	58,2	8,8
8,2E-06		
1,65E-07	58	0,13
3,29E-07	69	44
5,0E-08	50,5	3,8
1,1E-08		

Aceite de linaza (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1E-04	138	15
3,73E-05	145	2,5
1,23E-05	88	12
4,10E-06	113	0
8,2E-06	113	13
1,65E-07	96	18
3,29E-07	106	10
5,0E-08	134	22
1,1E-09	83	13
9,9E-10	73	15

5 Ácido isostérico (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
1E-03	-8,6	3,4
1,1E-04	1,2	3,0
3,73E-04	-5,3	1,1
1,23E-05	80	00
4,10E-05	67	7,9
8,2E-06	103	12,3
1,65E-07	95	5,5
3,29E-07	123	0,5
5,0E-08	78	12,2
1,1E-08	78	29

Ácido 2-hidroxiestérico (B4)

Concentración	Niveles de TGasa (media)	Tgasa (SD)
9,1E-04	46,6	6,2
3,73E-04	69,3	8,3
1,23E-04	51	8,8
3,10E-05	96,0	0,0
1,2E-05	105	30
3,65E-06	63	8,0
1,29E-06	80	4,7
2,0E-07	142	34
5,1E-08	64	20
1,0E-08	58	17

Sinergia de inhibición de la TGasa con combinaciones binarias de refuerzos

5 Para investigar la inhibición sinérgica de la expresión de TGasa por combinaciones de 2 clases diferentes de refuerzos con retinol, las combinaciones seleccionadas de los compuestos se analizaron a las concentraciones dadas en la tabla anterior. Las concentraciones analizadas fueron de un orden log de magnitud menor que la concentración requerida para la inhibición mínima de actividad TGasa (es decir, CI_{20}). Los compuestos se analizaron solos y en combinación, y el % de inhibición de la TGasa se da para cada compuesto y la combinación.

10 Los siguientes ejemplos dan las combinaciones sinérgicas en todas las posibles combinaciones binarias (B1 / B2; B1 / B3, B1 / B4; B1 / B5; B2 / B3, B2 / B4; B2 / B5; B3 / B4, B3 / B5; B4 / B5). Cuando el % de inhibición de la combinación es más que la inhibición de cada compuesto añadido juntos, indica sinergia (es decir, la inhibición por la combinación es mayor que la inhibición por el compuesto 1 + compuesto 2). Todos los ejemplos de combinación binarias dadas en la siguiente tabla sinérgicamente inhibieron TGasa.

Combinaciones binarias	Compuesto 1	Compuesto 2	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	Combinación TG % c
B1/B2	Dimetilmidazolidinona	Fosfatidilcolina	99	97	84
B1/B2	Alfa-demascona	Fosfatidilcolina	95	97	86
B1/B2	hexanoilesfingosina	Fosfatidilcolina	109	97	86
B1/B2	Alfa-Ionona	Esfingomielina	101	98	76
B1/B2	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Fosfatidilcolina	106	98	78
B1/B2	Alfa-demascona	Esfingomielina	95	84	67
B1/B3	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina	123	134	75
B1/B3	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Carbenoxelona	123	164	96
B1/B3	Aceite de ricino MEA	Carbenoxelona	96	164	67
B1/B3	Utrecht-2	Amsacrina	102	98	86
B1/B3	Utrecht-2	Carbenoxelona	102	164	91

ES 2 524 559 T3

(continuación)

Combinaciones binarias	Compuesto 1	Compuesto 2	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	Combinación TG % c
B1/B3	hexanoilesfingosina	Carbenoxelona	122	164	78
B1/B3	Lyrál	Carbenoxelona	120	164	82
B1/B3	Aceite de ricino MEA	Carbenoxelona	110	164	78
B1/B3	hexanoilesfingosina	Amsacrina	122	134	92
B1/B3	hexanoilesfingosina	Ácido elíadico	122	144	85
B1/B3	Alfa ionona	Amsacrina	101	134	78
B1/B3	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Ácido cliciretínico	95	92	69
B1/B4	Naringenina	Ácido 2-hidroxiestérico	95	112	78
B1/B4	hexanoilesfingosina	Ácido 2-hidroxiestérico	99.3	112	77
B1/B4	Lyrál	Ácido hexadecanoico	120	95	69
B1/B4	Aceite de ricino MEA	Ácido hexadecanoico	110	125	82
B1/B4	hexanoilesfingosina	Ácido isoesteárico	122	146	93
B1/B4	Oleoilbetaina	Ácido hexadecanodioico	99.5	125	80
B1/B5	hexanoilesfingosina	Cocoil hidroxietilimidazolina	99	102	68
B1/B5	Farnesol	Ketokonazol	98	111	84
B1/B5	hexanoilesfingosina	Miconazol	99	101	56
B1/B5	hexanoilesfingosina	Ketoconazol	99	99	65
B1/B5	hexanoilesfingosina	Laurilhidroxietilimidazolina	99	98	51
B1/B5	Utrecht-2	Amino Benzotriazol	122	105	83
B1/B5	hexanoilesfingosina	3,4-dihidro-2 quinolinona	122	102	89
B1/B5	hexanoilesfingosina	Amino benzotriazol	122	126	85
B1/B5	Aceite de ricino MEA	Laurilhidroxietilimidazolina	110	98	56
B1/B5	hexanoilesfingosina	Climbazol	122	98	83
B1/B5	hexanoilesfingosina	Miconazol	122	99	78
B1/B5	hexanoilesfingosina	Ketoconazol	122	110	90
B1/B5	Oleoilbetaina	ketoconazol	96	116	81
B1/B5	Utrecht-2	Laurilhidroxietilimidazolina	122	98	57
B1/B5	Alfa-demascona	Oleilhidroxietilimidazolina	112	73	76

(continuación)

Combinaciones binarias	Compuesto 1	Compuesto 2	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	Combinación TG % c
B1/B5	Alfa-ionona	Laurilhidroxietilimidazolina	101	98	49
B1/B5	Alfa-ionona	Oleilhidroxietilimidazolina	101	73	75
B2/B3	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	98	92	73
B2/B4	Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiestérico	98	82	70
B2/B5	Fosfatidilcolina	Climbazol	98	102	82
B2/B5	Fosfatidilcolina	Miconazol	98	111	92
B2/B5	Fosfatidilcolina	Ketoconazol	98	101	89
B2/B5	Fosfatidilcolina	Laurilhidroxiimidazolina	98	106	82
B3/B4	Amsacrina	Ácido 2-hidroxiestérico	102	82	75
B3/B4	Ácido mirístico	Ácido 2-hidroxiestérico	110	82	78
B3/B5	Amsacrina	Aminobenzotriazol	102	98	84
B3/B5	Amsacrina	Dimetilimidazolina	102	112	94
B3/B5	Ácido mirístico	Climbazol	110	102	82
B4/B5	Aceite de linaza	Laurilhidroxietilimidazolina	98	73	57
B4/B5	Ácido hidroxiestérico 2-	Ketaconazol	92	109	77
B4/B5	Aceite de linaza	Oleoil hidroxietilimidazolina	98	92	75
B4/B5	Ácido hidroxiestérico 2-	Cumarina	92	96	70

Sinergia de la inhibición de TGasa con combinaciones terciarias de refuerzos

5 Para investigar la inhibición sinérgica de la expresión de TGasa por combinaciones de 3 clases diferentes de refuerzos con retinol, se analizaron combinaciones seleccionadas de compuestos. Las concentraciones ensayadas fueron de un orden log de magnitud menor que la concentración requerida para la inhibición mínima de actividad TGasa (es decir, Cl_{20}). Los compuestos se analizaron solos y en combinación, y el % de inhibición de la TGasa se da para cada compuesto y la combinación. Los siguientes ejemplos dan las combinaciones sinérgicas en todas las posibles combinaciones terciarias (B1 / B2 / B3; B1 / B2 / B4; B1 / B2 / B5; B1 / B3 / B4; B1 / B3 / B5; B1 / B4 / B5; B2 / B3 / B4; B2 / B3 / B5; B2 / B4 / B5; B3 / B4 / B5). El % de inhibición de la combinación es más que la inhibición de cada compuesto se suman, lo que indica sinergia (es decir, la inhibición por la combinación es mayor que la inhibición por el compuesto 1 + 2 + compuesto 3). Todos los ejemplos de combinaciones terciarias de refuerzos indicados en la siguiente tabla sinérgicamente inhibieron TGasa en presencia de 10-7M retinol.

10

Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	TG como % C Comp. 3	TG como % C Combo
Combinaciones de B1/B2/B3						
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	88	91	85	53
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Equinácea	88	91	119	52
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Naringenina	88	91	94	52
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Acetil esfingosina (ceramida C2)	88	91	99	58
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Farnesol	88	91	118	49
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	α-Damascona	81	91	89	58
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Fosfatidilcolina	Naringenina	81	88	94	66
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	81	79	127	60
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Palmitamida monoetanolamida	81	79	95	63
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	α-Damascona	81	91	89	58
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Naringenina	81	91	94	75
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Equinácea	81	91	119	77
1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Dimetilimidazolidinona	81	91	87	67
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Carbenoxelona	Fosfatidilcolina	85	95	88	63
Combinaciones de B1/B2/B4:						
Combinaciones de B1/B2/B5:						
Fosfatidilcolina	Climbazol	Equinácea	88	84	119	75
Fosfatidilcolina	Climbazol	Naringenina	88	84	94	83
Fosfatidilcolina	Climbazol	Geraniol	88	84	105	76
Fosfatidilcolina	Climbazol	Farnesol	88	84	118	82
Fosfatidilcolina	Climbazol	Acetil esfingosina (ceramida C2)	88	84	99	82

		(continuación)				
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	TG como % C Comp. 3	TG como % C Combo
Fosfatidicolina	Miconazol	α-Ionona	88	92	88	70
Fosfatidicolina	Miconazol	Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	88	92	85	72
Combinaciones de B1/B3/B4:						
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	Acido elaidico	79	87	93	0
α-Ionona	Amsacrina-HCl	Acido 12-hidroxiesteárico	68	79	95	62
Lyrilal	Ácido hexadecanodioico	Vanillina	97	90	134	81
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	Acido isoesteárico	ácido glicirretínico	104	87	91	58
Combinaciones de B1/B3/B5:						
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	79	87	95	32
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	Lauril hidroxietilimidazolina	79	87	52	-13
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	Quercetin	79	87	92	-24
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	Oleoilhidroxietilimidazolina	79	87	76	39
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	79	87	94	32
Amsacrina-HCl	Dimetilimidazolidinona	Cumarina	79	87	80	30
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	Carbenoxolona	Oleoilhidroxietilimidazolina	104	88	76	64
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	3,4, dihidro-2 (1H) quinolinona (Hidrocarbostirilo)	Vanillina	104	90	134	62
Amsacrina-HCl	Amino Benzotriazol	Equinácea	79	105	119	48
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	Amino Benzotriazol	Esfingomielina	104	105	60	69
Amsacrina-HCl	Amino Benzotriazol	Acetil esfingosina (ceramida C2)	79	105	99	-7
α-Ionona	Amsacrina-HCl	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	68	79	94	54
Utrecht-2	Carbenoxolona	Quercetin	76	88	92	74
Utrecht-2	Carbenoxolona	Oleoilhidroxietilimidazolina	76	88	76	69
Utrecht-2	Carbenoxolona	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	76	88	94	73
Utrecht-2	Carbenoxolona	3,4, dihidro-2 (1H) quinolinona (Hidrocarbostirilo)	76	88	90	70

		(continuación)				
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	TG como % C Comp. 3	TG como % C Combo
Acido mirístico	Climbazol	Geraniol	79	84	105	74
Acido mirístico	Climbazol	α-Damascona	79	84	89	73
Acido mirístico	Climbazol	Acetil esfingosina (ceramida C2)	79	84	99	70
oleil betaina	Ketoconazol	Carbenoxolona	62	85	88	78
oleil betaina	Ketoconazol	ácido glicirretínico	62	85	91	71
oleil betaina	Ketoconazol	Ácido linoleico	62	85	11	83
oleil betaina	Ketoconazol	Ácido linoléico	62	85	208	80
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	3,4, dihidro-2 (1H) quinolona (Hidrocarbostirilo)	Vanilina	104	90	134	62
Combinaciones de B1/B4/B5						
Acido eláico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	93	95	85	75
Acido eláico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Naringenina	93	95	94	86
Acido eláico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	α-Damascona	93	95	89	80
Acido eláico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Farnesol	93	95	118	82
Acido eláico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Crocetin	93	95	90	78
Combinaciones de B2/B3/B4:						
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	ácido glicirretínico	Ácido 12-hidroxiesteárico	81	91	95	57
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	ácido glicirretínico	Aceite de linaza	81	91	103	62
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	ácido glicirretínico	Acido eláico	81	91	93	75
Fosfatidicolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	ácido araquidónico (sal de Na+)	88	83	78	60
Combinaciones de B2/B3/B5:						
Fosfatidicolina	Climbazol	Acido linoléico	88	84	208	84
Fosfatidicolina	Climbazol	ácido araquidónico (sal de Na+)	88	84	78	83
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	Amsacrina-HCl	Climbazol	81	79	84	58
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	Amsacrina-HCl	(7H-Benzimidazol[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	81	79	94	59
1,2-dioctanilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanalamida	ácido glicirretínico	3,4, dihidro-2 (1H) quinolona (Hidrocarbostirilo)	81	91	90	56

		(continuación)				
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	TG como % C Comp. 1	TG como % C Comp. 2	TG como % C Comp. 3	TG como % C Combo
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	81	91	95	75
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Amino Benzotriazol	81	91	105	72
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Lauril hidroxietilimidazolina	81	91	52	79
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Quercetin	81	91	92	73
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Climbazol	81	91	84	54
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Clotrimazol	81	91	79	42
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Miconazol	81	91	82	43
Combinaciones de B2/B4/B5:						
Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	Amino Benzotriazol	88	83	105	77
Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	Lauril hidroxietilimidazolina	88	83	52	74
Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	Quercetin	88	83	92	69
Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	oleilhidroxietilimidazolina	88	83	76	75
Fosfatidilcolina	Ácido 2-hidroxiesteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	88	83	94	79
Fosfatidilcolina	Climbazol	Ácido elaidico	88	84	93	81
Combinaciones de B3/B4/B5:						
Ácido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Carbenoxolona	93	95	88	69
Ácido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	Vanillina	93	95	134	81
Amsacrina-HCl	Amino Benzotriazol	Acete de linaza	79	105	103	45
Ácido mirístico	Climbazol	Ácido 12-hidroxiesteárico	79	84	95	81
Ácido mirístico	Climbazol	Acete de linaza	79	84	103	81
Ácido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	ácido araquidónico (sal de Na ⁺)	93	95	78	63

Sinergia de la inhibición de TGasa con combinaciones cuaternarias de refuerzos

5 Para investigar la inhibición sinérgica de la expresión de TGasa por combinaciones de 4 clases diferentes de refuerzos con retinol, se analizaron combinaciones seleccionadas de compuestos. Las concentraciones ensayadas fueron de un orden log de magnitud menor que la concentración requerida para la inhibición mínima de actividad TGasa (es decir, CI_{20}).

10 Los compuestos se analizaron solos y en combinación, y el % de inhibición de la TGasa se da para cada compuesto y la combinación. Los siguientes ejemplos dan las combinaciones sinérgicas en todas las combinaciones posibles cuaternario (B1 / B2 / B3 / B4; B1 / B2 / B3 / B5; B1 / B2 / B4 / B5; B1 / B3 / B4 / B5; B2 / B3 / B4 / B5;). Sinergia se confirmó si la diferencia en % de inhibición de la combinación (de 4 refuerzos) es más de 30 % de la de la inhibición por 3 combinaciones de refuerzo (es decir, 4 % de inhibición de refuerzo combinado es igual o mayor que el % de inhibición de combo 3 de refuerzo + 30 %). Todas las combinaciones cuaternarias de refuerzos que se muestran en la tabla que figura a continuación mostraron sinergia.

Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciana (1-3 combo; TG %C)	Diferencia (<30 %=sinergia)
Combinaciones de B1/B2/B3/B4						
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ácido 12-hidroxiestérico	21	64	42
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ácido 12-hidroxiestérico	15	57	41
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Ácido 12-hidroxiestérico	-3	40	43
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Ácido isoesteárico	5	40	35
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Ácido 12-hidroxiestérico	-3	42	45
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Ácido elaidico	8	42	34
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	TCC	ácido glicirretínico	Ácido isoesteárico	7	54	47
Lyrial	TCC	Vanilina	Ácido hexadecanodioico	10	48	38
Cocoil hidroxietilimidazolina	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Ácido isoesteárico	0	37	37
Cocoil hidroxietilimidazolina	Fosfatidilcolina	ácido araquidónico (sal de Na+)	Ácido 2-hidroxiestérico	-1	37	38
Cocoil hidroxietilimidazolina	1,2-dioctanilo-sn- glicero-3- fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Aceite de linaza	-2	45	47
Combinaciones de B1/B2/B3/B5						
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Climbazol	20	64	44

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciaria combo; TG %C)	Diferencia (<30 %=sinergia)
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Clotrimazol	26	64	38
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Miconazol	9	64	55
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ketoconazol	5	64	59
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Laurilhidroxietilimidazolina	15	64	49
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolina	2	64	61
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	25	64	39
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ácido 12-hidroxiesteárico	18	62	44
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Climbazol	22	62	40
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Clotrimazol	24	62	38
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Miconazol	13	62	50
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ketoconazol	12	62	50
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Laurilhidroxietilimidazolina	14	62	49
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolina	3	62	59
Equinácea	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	24	62	39
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Miconazol	1	57	56
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ketoconazol	22	57	34
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Laurilhidroxietilimidazolina	10	57	46
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolina	2	57	54
Naringenina	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	15	57	42

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciana combo; TG %C	Diferencia (1-3) (<30 %=sinergia)
Palmitamida monoetanolamida	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Miconazol	-2	39	41
Palmitamida monoetanolamida	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolona	6	39	33
Farnesol	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Miconazol	3	43	40
Farnesol	Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolona	6	43	37
Geraniol	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Miconazol	11	47	36
Geraniol	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	oleilhidroxietilimidazolona	3	47	44
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Climbazol	2	40	37
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Miconazol	5	40	35
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Ketoconazol	0	40	40
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Laurilhidroxietilimidazolona	-2	40	41
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	oleilhidroxietilimidazolona	5	40	35
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	1	40	39
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Climbazol	7	42	35
Linoleoilmonoetanolamida (LAMEA)	1,2-dioctaniloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	Amsacrina-HCl	Clotrimazol	10	42	32

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciaría combo; TG %C)	Diferencia (1-3) (<30 % =sinergia)
Linoleoilmonoetanlamida (LAMEA)	fosfoetanlamida 1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Miconazol	5	42	37
Linoleoilmonoetanlamida (LAMEA)	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Ketoconazol	11	42	32
Linoleoilmonoetanlamida (LAMEA)	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Laurilhidroxietilimidazolona	-4	42	46
Linoleoilmonoetanlamida (LAMEA)	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	oleilhidroxietilimidazolona	5	42	37
Linoleoilmonoetanlamida (LAMEA)	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	(7H-Benzimidazol[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	8	42	35
Palmitamida monoetanlamida	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Miconazol	13	43	30
Palmitamida monoetanlamida	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	oleilhidroxietilimidazolona	3	43	40
Alfa-demascona	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Miconazol	11	48	37
Alfa-demascona	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Ketoconazol	13	48	34
Alfa-demascona	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Laurilhidroxietilimidazolona	15	48	33
Alfa-demascona	1,2-dioctanoilo-sn-glicero-3-fosfoetanlamida	Am sacrina-HCl	Oleoilhidroxietilimidazolona	3	48	45

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciaria combo; TG %C)	Diferencia (1-3) (<30 %=sinergia)
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	Ácido 12-hidroxiestearico	3	55	52
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	Climbazol	6	55	49
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	Miconazol	-2	55	57
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	Ketoconazol	1	55	54
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	Laurilhidroxitilimidazolina	4	55	51
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	oleilhidroxitilimidazolina	3	55	52
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Fosfatidilcolina	Carbenoxolona	(7H-Benzimidazol[2,1-a]Benz[de]-isoquinolin-7-ona	11	55	44
Naringerina	Fosfatidilcolina	Ácido linoleico	Climbazol	-1	45	46
Geraniol	Fosfatidilcolina	Ácido linoleico	Climbazol	1	40	39
Acetil esfingosina (ceramida C2)	Fosfatidilcolina	Ácido linoleico	Climbazol	0	40	40
Acetil esfingosina (ceramida C2)	Fosfatidilcolina	Ácido linoléico	Climbazol	10	40	30
Dimetilimidazolidinona	TCC	Amsacrina-HCl	Ácido elaidico	14	47	33
Dimetilimidazolidinona	TCC	Amsacrina-HCl	Quercetin	12	44	32
Dimetilimidazolidinona	TCC	Amsacrina-HCl	Cumarina	14	58	44
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	TCC	ácido glicirretínico	Amino Benzotriazol	8	48	40
Alfa-demasona	TCC	Ácido mirístico	Climbazol	10	44	34
Combinaciones de B1/B2/B4/B5						
Lyrial	Vanilina	Ácido hexadecanodioico	Miconazol	12	48	36
Lyrial	Vanilina	Ácido hexadecanodioico	oleilhidroxitilimidazolina	4	48	45

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciaria combo; TG %C)	Diferencia (<30 % =sinergia)
Crocetin	TCC	Acido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	11	48	37
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	ácido glicirretínico	Acido hidroxisteárico	Amino Benzotriazol	14	48	33
Dimetilimidazolidinona	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	2	44	42
Melinamida	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	5	44	39
Geranil geraniol	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	9	44	35
Coccolhidroxiethylimidazolona	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	-8	44	52
Acetil esfingosina (ceramida C2)	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	10	44	34
Crocetin	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	10	44	34
N,N-Dietilcocamida (Cocamida DEA)	Fosfatidilcolina	Acido hidroxisteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	4	44	40
Coccolhidroxiethylimidazolona	Fosfatidilcolina	Acido elaidico	Climbazol	-4	30	34
Combinaciones de B1/B3/B4/B5:						
Dimetilimidazolidinona	Amsacrina-HCl	Acido elaidico	Miconazol	7	47	40
Dimetilimidazolidinona	Amsacrina-HCl	Acido elaidico	Ketoconazol	6	47	41
Dimetilimidazolidinona	Amsacrina-HCl	Acido elaidico	oleilhidroxiethylimidazolona	3	47	44
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	Clotrimazol	20	54	34
Hexanoil esfingosina	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	Miconazol	10	54	43

(continuación)						
Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciaria combo; TG %C)	Diferencia (<30 %=sinergia)
(ceramida C6)						
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	Laurilhidroxietilimidazolina	20	54	33
Hexanoil esfingosina (ceramida C6)	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	oleilhidroxietilimidazolina	5	54	48
Crocein	Acido linoleico	Acido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	0	48	48
Crocein	Acido linoléico	Acido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	-2	48	50
Éster metílico de ácido de aceite de ricino (MEA)	Acido linoleico	Acido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	-1	31	32
Cocoilhidroxietilimidazolina	Carboxolona	Acido elaidico	2-Hidroxiquinolina (Carbostirilo)	-6	28	34
Combinaciones de B2/B3/B4/B5						
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	Ketoconazol	4	37	33
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Acido isoesteárico	oleilhidroxietilimidazolina	6	37	31
Fostatidicolina	ácido araquidónico (sal de Na+)	Acido 2-hidroxiesteárico	Miconazol	6	37	31
Fostatidicolina	ácido araquidónico (sal de Na+)	Acido 2-hidroxiesteárico	oleilhidroxietilimidazolina	5	37	32
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Aceite de linaza	Miconazol	-1	45	47
1,2-dioctanilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamida	ácido glicirretínico	Aceite de linaza	oleilhidroxietilimidazolina	7	45	38
Fostatidicolina	Carboxolona	Acido 2-hidroxiesteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	8	44	36
Fostatidicolina	Acido linoleico	Acido 2-hidroxiesteárico	(7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]isoquinolin-7-ona	-3	44	47

(continuación)

Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	TG Cuaternario (% C)	Terciana combo; TG %C)	(1-3	Diferencia (<30 %=sinergia)
Fosfatidilcolina	ácido glicirretínico	Ácido elaidico	Climbazol	-3	30	33	
Fosfatidilcolina	Ácido linoleico	Ácido elaidico	Climbazol	-2	30	32	

Vehículo cosméticamente aceptable

La composición según la invención también comprende un vehículo cosméticamente aceptable que actúa como diluyente, dispersante o portador para los ingredientes activos de la composición, de tal forma que facilite su distribución cuando la composición se aplica a la piel.

- 5 Los vehículos aparte del o además del agua pueden incluir emolientes líquidos o sólidos, disolventes, humectantes, espesantes y polvos. Un vehículo no acuoso especialmente preferido es un polidimetilsiloxano y/o un polidimetilfenilsiloxano. Las siliconas de esta invención pueden ser aquellas tengan viscosidades comprendidas entre 10 y 10.000.000 mm²/s (centiestoquios) a 25°C. Son especialmente deseables las mezclas de siliconas de baja y alta viscosidad. General Electric Company suministra estas siliconas con las marcas comerciales Vicasil, SE y SF y 10 Dow Corning Company las suministra como las series 200 y 550. Las cantidades de silicona que se pueden utilizar en las composiciones de esta invención están comprendidas entre 5 % y 95 %, preferentemente entre 25 % y 90 % en peso de la composición.

Materiales beneficiosos para la piel y adjuntos cosméticos opcionales

- 15 Puede haber presente un aceite o un material aceitoso, junto con un emulsionante para proporcionar una emulsión de agua en aceite o una emulsión de aceite en agua, dependiendo en gran medida del equilibrio hidrófilo-lipófilo medio (EHL) del emulsionante empleado.

- Varios tipos de ingredientes activos pueden estar presentes en las composiciones cosméticas de la presente invención. Varios tipos de ingredientes activos pueden estar presentes en las composiciones cosméticas de la presente invención. Activos se definen como la piel o los agentes beneficiosos para el cabello distintos de 20 emolientes y distintos de ingredientes. que simplemente mejoran las características físicas de la composición. Aunque no se limita a esta categoría, los ejemplos generales incluyen protectores solares, agentes para aclarar la piel, y agentes de bronceado.

- Los protectores solares incluyen aquellos materiales empleados habitualmente para bloquear la luz ultravioleta. Los 25 compuestos ilustrativos son los derivados de PABA, cinamato y salicilato. Por ejemplo, metoxicinamato de octilo y benzofenona 2-hidroxi-4-metoxi (también conocida como oxibenzona) pueden ser utilizados. El metoxicinamato de octilo y benzofenona 2-hidroxi-4-metoxi están disponibles comercialmente bajo las marcas comerciales, Parsol MCX y benzofenona-3, respectivamente.

La cantidad exacta de protector solar empleada en las emulsiones puede variar dependiendo del grado de 30 protección deseado de la radiación UV del sol.

- Otro ingrediente opcional preferido se selecciona de ácidos grasos esenciales (EFA), es decir, aquellos ácidos 35 grasos que son esenciales para la formación de la membrana plasmática de todas las células, en queratinocitos la deficiencia de EFA hace que las células hiperproliferativas. La suplementación de la EPT corrige esto. EPT 's también mejorar la biosíntesis de lípidos de la epidermis y proporcionan lípidos para la formación de la barrera de la epidermis. Los ácidos grasos esenciales se eligen preferentemente de ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido homo- γ -linolénico, ácido columbínico, eicosa- (n- β , 9, 13) -trienoico, ácido araquidónico, ácido γ -linolénico, timnodónico ácido, ácido hexaenoico y mezclas de los mismos.

- A menudo se incorporan emolientes en las composiciones cosméticas de la presente invención. Los niveles de tales 40 emolientes pueden variar desde aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 50 %, preferentemente entre aproximadamente 5 % y 30 % en peso de la composición total. Los emolientes pueden clasificarse en categorías químicas generales como ésteres, ácidos grasos y alcoholes, polioles e hidrocarburos.

- Los ésteres pueden ser mono- o di-ésteres. Los ejemplos aceptables de diésteres grasos incluyen adipato de 45 dibutilo, sebacato de dietilo, dimerato de diisopropilo, y succinato de dioctilo. Ésteres grasos de cadena ramificada aceptables incluyen miristato de 2-etil-hexilo, estearato de isopropilo y palmitato de isoestearilo. Ésteres de ácidos tribásicos aceptables incluyen trilinoleato de triisopropilo y citrato de trilaurilo. Ésteres grasos de cadena lineal aceptables incluyen palmitato de laurilo, lactato de miristilo, eucato de oleilo y oleato de estearilo. Los ésteres preferidos incluyen coco-caprilato / caprato (una mezcla de coco-caprilato y coco-caprato), propileno glicol, acetato de éter de miristilo, adipato de diisopropilo y octanoato de cetilo.

- Alcoholes y ácidos grasos adecuados incluyen aquellos compuestos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono. 50 Especialmente preferidos son los compuestos tales como los de cetilo, miristilo, palmítico y estearilo alcoholes y ácidos.

Entre los polioles que pueden servir como emolientes son compuestos alquil polihidroxílicos de cadena lineal y 55 ramificada. Por ejemplo, se prefieren propilenglicol, sorbitol y glicerina. También pueden ser útiles los polioles poliméricos tales como polipropilenglicol y polietilenglicol. Butileno y propilenglicol son también especialmente preferidos como mejoradores de la penetración.

Hidrocarburos ejemplares que pueden servir como emolientes son aquellos que tienen cadenas hidrocarbonadas de 12 a 30 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen aceite mineral, vaselina, escualeno e isoparafinas.

5 Otra categoría de ingredientes funcionales dentro de las composiciones cosméticas de la presente invención son los espesantes. Un espesante estará presente habitualmente en cantidades en cualquier lugar de 0,1 a 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0,5 % a 10 % en peso de la composición. Ejemplos de espesantes son materiales de poliacrilato reticulados disponibles bajo la marca comercial Carbopol de la BF Goodrich Company. Se pueden emplear gomas tales como xantano, carragenina, gelatina, karaya, pectina y goma de algarrofin. Bajo ciertas circunstancias, la función espesante puede conseguirse mediante un material que también sirva como silicona o emoliente. Por ejemplo, las gomas de silicona de más de 10 centistoquios y los ésteres tales como estearato de glicerol tienen funcionalidad dual.

10 Los polvos se pueden incorporar en la composición cosmética de la invención. Estos polvos incluyen creta, talco, tierra de Fullers, caolín, almidón, arcillas de esmectita, silicato de aluminio modificado químicamente de magnesio, arcilla de montmorillonita orgánicamente modificada, silicato de aluminio hidratado, sílice de pirólisis, succinato de octenilo de almidón de aluminio y mezclas de los mismos.

15 Otros componentes minoritarios coadyuvantes también se pueden incorporar en las composiciones cosméticas. Estos ingredientes pueden incluir agentes colorantes, opacificantes y perfumes. Las cantidades de estos materiales pueden variar desde 0,001 % hasta 20 % en peso de la composición.

Uso de la composición

20 La composición según la invención está concebida principalmente como un producto para aplicación tópica a la piel humana, especialmente como un agente para acondicionar y suavizar la piel, y prevenir o reducir la aparición de piel arrugada o envejecida.

En uso, una pequeña cantidad de la composición, por ejemplo de 1 a 5 ml, se aplica a las áreas expuestas de la piel, desde un recipiente o aplicador adecuado y, si es necesario, después se extiende y / o se frota en la piel usando la mano o los dedos o un dispositivo adecuado.

25 Forma del producto y envasado

30 La composición de tratamiento tópico de la piel de la invención se puede formular como una loción, una crema fluida, una crema o un gel. La composición se puede envasar en un recipiente adecuado para adaptarse a su viscosidad y al uso pretendido por el consumidor. Por ejemplo, una loción o crema fluida se puede envasar en una botella o un aplicador de bola, o una cápsula, o un dispositivo de aerosol impulsado por un propelente o un recipiente equipado con una bomba adecuada para accionar con el dedo. Cuando la composición es una crema, se puede almacenar simplemente en una botella o recipiente para apretar no deformable, tal como un tubo o un tarro con tapa.

En consecuencia, la invención también proporciona un recipiente cerrado que contiene una composición cosméticamente aceptable como se define en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el cuidado de la piel, que comprende:
- a. de 0,001 % a 10 % en peso de la composición de un retinoide;
 - b. una combinación de al menos 4 refuerzos retinoides pertenecientes a las clases de inhibidores de LRAT / ARAT (B1), agonistas de la retinol deshidrogenasa (B2), inhibidores de la retinal reductasa (B3), agonistas de CRABP-2 (B4) e inhibidores de la oxidación de ácidos retinoicos del citocromo (B5) en una cantidad de 0,0001 % a 50 % en peso de la composición, en la que las proporciones de cada uno de los refuerzos entre sí está en el intervalo de 1: 1000 a 1000: 1;
 - c. un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5
- 10 en la que el inhibidor de LRAT / ARAT (B1) es seleccionado entre el grupo que consiste en crocetina, esfingosina acetilo, cocamidopropil betaína, coco hidroxietil-imidazolina, cocoamida-mea, glicerol-pca-oleato, hexanoamida, esfingosina hexanoílo, lauroil sarcosina, lidocaína, linoleamidedea, linoleamida-mea, dimetilamina linoleamidopropil, melinamida, miristoilsarcosina, oleil betaína, palmitamida-mea, estearilhidroxiamida, naringenina, alilo alfa-ionona, alfa-damascona, alfa-ionona, alfa-metil ionona, alfa-terpineol, beta-damascona, brahmanol, damascenona, delta-
- 15 damascona, dihidro alfa-ionona, safranato etílico, alcohol fenquilo, gamma-metil ionona, isobutil ionona, isocicogeraniol, isodamascona liral, santalona, santanol, timberol, tonalid, traseolida, cloruro de trimetilamonio de coco, ácido ursólico, citral, citronelol, farnesol, geraniol, geranil geraniol, linalol, nonadieneal, pseudoionona, dioctilfosfatidil etanolamina, dimetil imidazolidinona e imidazolidinil urea;
- 20 en la que el agonista de retinol deshidrogenasa (B2) es seleccionado entre el grupo que consiste en fosfatidilcolina y esfingomielina;
- en el que el inhibidor de la reductasa retinaldehído (B3) es seleccionado del grupo que consiste en la vainillina, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, amsacrina, carbenoxolona, ácido glicirretínico y fosfatidiletanolamina;
- 25 en el que el antagonista de CRABP-2 (B4) es seleccionado entre el grupo que consiste en ácido elaidico, ácido hexadecanodioico, ácido 12-hidroxiesteárico, ácido isoesteárico y aceite de linaza;
- y en el que el inhibidor de la oxidación de ácidos retinoicos (B5) es seleccionado del grupo que consiste en bifonazol, climbazol, clotrimazol, econazol, ketoconazol, miconazol, lauril hidroxietilimidazolina, oleil hidroxietilimidazolina, quercetina, cumarina y metirapona.
- 30
2. La composición para el cuidado de la piel de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la combinación de los refuerzos comprende las 5 clases de refuerzos pertenecientes a las clases B1 a B5.
3. Un procedimiento cosmético de acondicionamiento de la piel, comprendiendo el procedimiento aplicar por vía tópica a la piel el producto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
4. Un procedimiento cosmético de reproducir el efecto sobre la piel del ácido retinoico, comprendiendo el procedimiento aplicar a la piel el producto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.