

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 201**

51 Int. Cl.:

**C07C 59/42** (2006.01)

**C07C 59/56** (2006.01)

**A61K 31/20** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2006 E 06807453 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 1937619**

54 Título: **Nuevos derivados de hidroxiácidos grasos insaturados y su utilización dermocosmetológica**

30 Prioridad:

**21.10.2005 FR 0510792**

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

**08.01.2015**

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)  
45, PLACE ABEL-GANCE  
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:

**CHARVERON, MARIE;  
TARROUX, ROGER y  
BORDAT, PASCAL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 526 201 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

Nuevos derivados de hidroxiácidos grasos insaturados y su utilización dermocosmetológica.

5 La presente invención tiene por objeto nuevos derivados de hidroxiácidos grasos insaturados, así como su utilización dermocosmetológica.

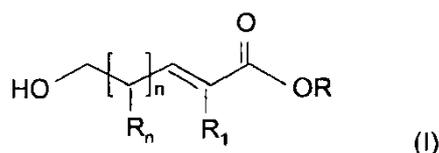
10 Muchos hidroxiácidos grasos saturados son conocidos y se describen en la bibliografía por sus propiedades cosméticas y farmacológicas. Por Ejemplo, el principal constituyente lipídico de la jalea real de las abejas es un hidroxiácido graso insaturado, que es el ácido hidroxi-10-deceno 2(*trans*)oico (Edward E. Smisman *et al.*, 1964. JOU. 29 3517-3520) conocido por su acción en la estimulación de la renovación epidérmica y la lucha contra el envejecimiento de la piel, así como por su utilización en unas composiciones despigmentantes (EP 1 679 071 y EP 0 989 111).

15 La solicitud de patente EP 0 568 307 describe unos ácidos alfa-hidroxi-carboxílicos y su utilización como conservante en unas composiciones cosméticas.

20 El artículo de Hanessian *et al* (Can. J. Chem. 1987, 65, 1859-1866) describe unos hidroxiácidos grasos insaturados y su procedimiento de preparación pero sin que se describa ninguna actividad biológica.

Diversos documentos del estado de la técnica describen unos procedimientos de preparación de hidroxiácidos grasos insaturados y de sus ésteres (Lee *et al.*, 1993, J. Org. Chem., vol. 58, páginas 2918-2919; Hurd y Saunders, 1952, J. Am. Chem. Soc., vol. 74, páginas 5324-5328; Krishnamurthy *et al.*, 1989, Indian J. Chem. Sect. A, vol. 28, páginas 288-291; Plettner *et al.*, 1995, J. Chem, Ecol., vol. 21, páginas 1017-1030).

25 Más particularmente, la presente invención se refiere a unos derivados hidroxiácidos grasos insaturados que responden a la fórmula general (I):



30 en la que:

- $\text{R}_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $\text{R}_1$  representa H, F, Cl, Br,  $\text{CF}_3$ ,
- R representa H, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

45 con la condición, sin embargo, de que cuando  $n \neq 10$ , uno por lo menos de los radicales  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_n$  no represente el hidrógeno.

Según una característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:

- $\text{R}_1$  representa F, Cl, Br,  $\text{CF}_3$ ,
- $\text{R}_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está sustituido eventualmente por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- R representa H, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

60 Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:

- $R_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está sustituido eventualmente por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- 5
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br,  $CF_3$ ,
  - R representa H, y
  - $6 \leq n \leq 14$ .
- 10
- con la condición, sin embargo, de que cuando  $n \neq 10$ , uno por lo menos de los radicales  $R_1$  y  $R_n$  no represente el hidrógeno.
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 15
- $R_1 = F, Cl, Br$  o  $CF_3$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $3 \leq n \leq 14$ .
- 20
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 25
- $R_1$  representa F, Cl, Br o  $CF_3$ ,
  - por lo menos uno de los radicales  $R_n$  representa un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
  - R representa H, y
  - $3 \leq n \leq 14$ .
- 30
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 35
- $R_1 = F$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $3 \leq n \leq 14$ .
- 40
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 45
- $R_1 = F$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $n = 13$ .
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 50
- $R_1 = F$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $n = 6$ .
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 55
- $R = R_1 = H$
  - solamente uno de los radicales  $R_n$  representa un grupo metilo, siendo los otros unos átomos de hidrógeno, y
  - $n = 4$ .
- 60
- Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:
- 65
- $R = R_1 = R_n = H$  y
  - $n = 10$ .

Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:

- 5
- $R_1 = F$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $n = 10$ .

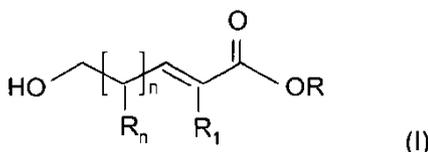
Según otra característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los siguientes criterios:

- 10
- $R_1 = F$ ,
  - $R = R_n = H$ , y
  - $n = 8$ .

15 Según la presente invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) definidos anteriormente se pueden utilizar a título de principio activo en asociación con un excipiente apropiado para realizar unas composiciones dermocosmetológicas destinadas a tratar trastornos de la pigmentación.

20 Según la presente invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) están destinados más particularmente a unas composiciones destinadas a provocar un aclaramiento de la piel.

Según la presente invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) siguiente:



25 en la que

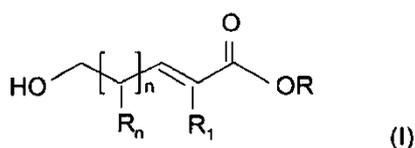
- $R_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br,  $CF_3$ ,
- R representa H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

Según una característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los criterios siguientes:

- R representa H,
- $R_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br,  $CF_3$ , y
- $3 \leq n \leq 14$ ,

se pueden utilizar a título de principio activo en asociación con un excipiente apropiado para realizar unas composiciones dermocosmetológicas con actividad anti-radicalaria, antiinflamatoria, antipruriginosa y/o destinada a tratar trastornos de la queratinización y de la pigmentación y/o a mejorar la cicatrización.

Los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de la fórmula general (I) siguiente:



en la que:

- 5 •  $R_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br,  $CF_3$ ,
- 10 • R representa H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

15 Según una característica particular de la invención, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) responden a los criterios siguientes:

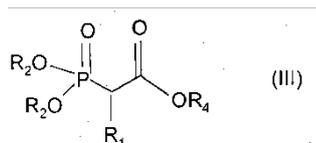
- R representa H,
- 20 •  $R_n$  representa independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br,  $CF_3$ , y
- 25 •  $3 \leq n \leq 14$ ,

están destinados más particularmente a unas composiciones destinadas al tratamiento de la psoriasis, del prurito y/o de la dermatitis atópica, así como al tratamiento del envejecimiento cutáneo y de las manchas de vejez blancas o marrones.

Debido a su actividad antirradicalaria, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) son también útiles para evitar o limitar la fotocarcinogénesis cutánea en estados precoces y, por lo tanto, se pueden utilizar en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades tumorales de la piel.

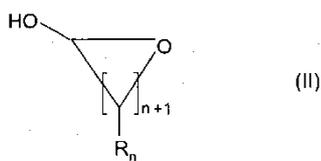
35 Los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) se pueden preparar:

- utilizando la reacción de Wittig-Horner por la reacción de un fosfonato de fórmula (III) siguiente:



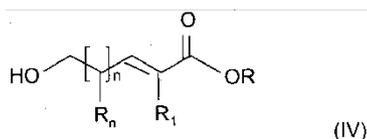
en la que:

- 45 •  $R_1$  es tal como se ha definido a propósito de la fórmula (I);
- $R_2$  representa un grupo alquilo, lineal o ramificado, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y es preferentemente un grupo etilo o metilo, pudiendo dichos grupos  $R_2$  formar un ciclo con los átomos de oxígeno de los grupos  $OR_2$  y el átomo de fósforo adyacente, y
- 50 •  $R_4$  representa un grupo alquilo, lineal o ramificado, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y es preferentemente un grupo etilo.
- o, cuando  $R_1 = H$ , utilizando la reacción de Doebner-Knoevenagel por la reacción de un derivado de ácido malónico de fórmula  $R_4OOC-CH_2COOR$ , siendo R tal como se ha definido anteriormente a propósito de la fórmula (I) con un lactol de fórmula (II) siguiente:
- 55



siendo  $R_n$  y  $n$  tal como se han definido anteriormente,

5 con el fin de obtener un hidroxiéster de fórmula (IV) siguiente:



en la que  $n$ ,  $R$  y  $R_1$  son tal como se han definido anteriormente,

10 y eventualmente, cuando  $R$  representa un grupo  $R_4$  tal como se ha definido anteriormente, una reacción de saponificación de un hidroxiéster de fórmula (IV) mencionada anteriormente, para obtener un derivado de hidroxiácido de fórmula (I) correspondiente.

15 La presente invención se ilustrará en el marco de los Ejemplos de síntesis que se dan a continuación:

### Ejemplo 1 Modo de funcionamiento para la síntesis del DHA

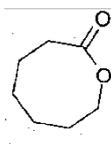
#### 1. Etapa 1: Preparación de oxonan-2-ona

20 Se ponen en suspensión 43,5 g (345 mmoles) de ciclooctanona en 430 ml de dicloroetano. Se añaden a continuación 170 g (985 mmoles) de ácido *meta*-cloroperbenzoico. El medio se calienta a 80°C durante 48 horas. A temperatura ambiente, se añaden 400 ml de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  y  $\text{NaHCO}_3$  (1/1 v/v). El medio se agita vigorosamente durante 18 horas. La fase orgánica se separa y se pone en presencia de KI y  $\text{H}_2\text{O}$  durante 6

25 horas. La fase orgánica se separa y se lava con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , con una solución saturada de NaCl, y después se seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y se concentra al vacío para dar un producto bruto de 36 g.

La lactona se purifica mediante maceración en pentano (60 ml), y después mediante filtración del precipitado ácido *meta*-clorobenzoico formado en frío,  $m = 26,6$  g (54%).

30 La lactona obtenida es un compuesto de fórmula:



35 Caracterización:

CCM:  $R_f = 0,3$  (heptano/acetato de etilo 7/3)

40 RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,42-1,49 (m, 4H), 1,65-1,75 (m, 6H), 2,30 (t,  $J=5,4$  Hz, 2H), 4,30 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H).

#### 2. Etapa de reducción parcial en lactol

45 Se diluyen 26,6 g (187,2 mmoles) de lactona en 210 ml de tolueno, bajo atmósfera de nitrógeno. El medio se enfría a -78°C y se añaden gota a gota 156,4 ml (189,1 mmoles) de Dibal-H en solución al 20% en el tolueno, manteniendo la temperatura a -78°C. La mezcla se agita durante 2 horas a -78°C. Se añaden 200 ml de una solución saturada de sales de Rozen a -78°C. Después de 18 horas de agitación vigorosa a temperatura ambiente, la mezcla bifásica se filtra en celite y después se extrae con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavan con una solución saturada de NaCl, se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtran y se concentran al vacío para dar un producto bruto de 26 g (25% del cual es derivado de diol, es decir, un rendimiento estimado de 72%). El lactol, en equilibrio de forma abierta y forma cíclica, se utiliza por lo tanto sin purificación suplementaria.

50

Caracterización:

CCM: Rf = 0,4 (heptano/acetato de etilo 6/4)

5 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,34-1,68 (m, 10H), 2,45 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 3,66 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 9,78 (t, J = 1,8 Hz, 1 H).

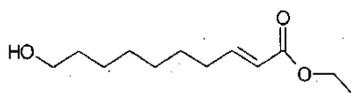
### 3. Etapa 3: Reacción de Wittig-Horner

10 Se diluyen 19 g (131,8 mmoles) de lactol en 250 ml de etanol. Se añaden 31,4 ml (158,1 mmoles) de trietilfosfonacetato al medio en presencia de 27,3 g (197,5 mmoles) de carbonato de potasio. El medio de reacción se calienta a 40°C durante 18 horas. A temperatura ambiente, el medio se hidroliza mediante 200 ml de agua destilada y se extrae con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavan con una solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran al vacío para dar un producto bruto de 20 g.

15 El éster obtenido se purifica mediante cromatografía con una elución heptano/acetato de etilo 7/3: se obtienen 15 g de producto (53% de rendimiento).

El éster obtenido es un compuesto de fórmula:

20



Caracterización:

25 CCM: Rf = 0,4 (heptano/acetato de etilo 7/3)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,24-1,38 (m, 9H), 1,43-1,50 (m, 2H), 1,51-1,57 (m, 2H), 2,15-2,21 (q, 2H), 3,60-3,64 (t, 2H), 4,14-4,20 (t, 2H), 5,77-5,82 (d, J=15,6 Hz, 1H), 6,91-6,98 (dt, J=15,6 Hz, 1H).

### 30 4. Etapa 4: Reacción de saponificación

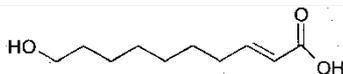
Se solubilizan 0,60 g (2,81 mmoles) de hidroxiéster en 10 volúmenes de tetrahidrofurano. Se añaden lentamente 3,4 ml (6,75 mmoles) de una solución de sosa 2M. El medio se calienta a 65°C durante 3 horas. Una vez terminada la reacción, el medio se hidroliza añadiendo una solución de ácido clorhídrico 3M hasta obtener un pH = 2. La mezcla se concentra hasta sequedad y la fase acuosa se extrae entonces mediante acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavan con una solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran al vacío para dar un producto bruto de 0,6 g.

35

40 El derivado de hidroxiácido insaturado esperado se obtiene en forma de un sólido blanco, mediante recristalización en acetonitrilo en frío, m = 0,37 g (71%).

El derivado de hidroxiácido obtenido es un compuesto de fórmula:

45



Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

50 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,33-1,37 (m, 6H), 1,45-1,49 (m, 2H), 1,55-1,58 (m, 2H), 2,20-2,25 (q, 2H), 3,62-3,66 (t, 2H), 5,79-5,84 (d, J=15,6 Hz, 1H), 7,03-7,10 (dt, J=15,6 Hz, 1H).

Espectroscopia de masa: [M-Na]<sup>+</sup> 209 (calculado 186)

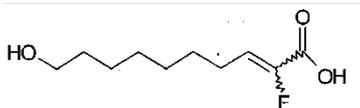
55 Punto de fusión: 62,5°C ± 1°C

### Ejemplo 2 Modo de funcionamiento para la síntesis de DHA α-fluorado de ácido 10-hidroxi-dec-2-fluoro-2-enoico: (R1 = F, n = 6)

60 Solamente la etapa 3 es diferente: a partir del lactol (0,89 g, 7,7 mmoles), la reacción de Wittig-Horner se lleva a cabo en presencia de dietilfosfonofluoroacetato de metilo (2,1 g, 9,2 mmoles) y de carbonato de potasio (1,6 g, 11,5 mmoles) en etanol (9 ml) a 40°C. La etapa 4 se lleva a cabo según el protocolo anterior. El producto obtenido

después de recristalización está en forma de una mezcla *cis/trans*.

El derivado de hidroxiácido obtenido es un compuesto de fórmula:



5

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

10

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,36-1,62 (m, 20H), 2,27-2,30 (m, 2H, forma *cis*), 2,50-2,58 (m, 2H, forma *trans*), 3,69 (m, 4H), 6,05 (dt,  $J=21,6$  Hz, 1H, forma *trans*) y 6,25 (dt,  $J=40,8$  Hz, 1H, forma *cis*).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  227 (calculado 204).

15

### Ejemplo 3 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 9-hidroxi-nona-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis de DHA es aplicado a cicloheptanona para obtener ácido 9-hidroxi-nona-2*t*-enoico.

20

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

25

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,36-1,61 (m, 8H), 2,22-2,27 (m, 2H), 3,67 (t,  $J=6,3$  Hz, 2H), 5,84 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H), 7,09 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  195 (calculado 172)

30

### Ejemplo 4 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 11-hidroxi-undeca-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a la ciclónonona para obtener el ácido 11-hidroxi-undeca-2*t*-enoico.

Caracterización:

35

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,33-1,61 (m, 12H), 2,20-2,28 (m, 2H), 3,66 (t,  $J=6,0$  Hz, 2H), 5,84 (dt,  $J=15,9$  Hz, 1H), 7,09 (dt,  $J=15,9$  Hz, 1H).

40

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  223 (calculado 200).

### Ejemplo 5 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 12-hidroxi-dodeca-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a ciclodecanona para obtener el ácido 12-hidroxi-dodeca-2*t*-enoico.

45

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

50

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,35-1,56 (m, 14H), 2,20-2,27 (m, 2H), 3,55 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 5,80 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H), 6,96 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  237 (calculado 214)

55

### Ejemplo 6 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 12-hidroxi-dodeca-2-fluoro-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA fluorado en posición 2 (Ejemplo 2) se aplica a la ciclodecanona para obtener el ácido 12-hidroxi-dodec-2-fluoro-2-enoico en forma de una mezcla *cis/trans*.

60

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,34-1,56 (m, 14H), 2,24-2,27 (m, 2H forma *cis*) o 2,49-2,54 (m, 2H estructura *trans*), 3,55 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 5,97 (dt,  $J=21,9$  Hz, 1H estructura *trans*) o 6,10 (dt,  $J=55,2$  Hz, 1H, forma *cis*).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  255 (calculado 232)

5

#### Ejemplo 7 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 13-hidroxi-tridec-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a la oxaciclododecan-2-ona para obtener el ácido 13-hidroxi-tridec-2*t*-enoico.

10

Caracterización:

CCM:  $R_f = 0,1$  (heptano/acetato de etilo 6/4)

15

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,27-1,63 (m, 16H), 2,21-2,28 (m, 2H), 3,64 (t,  $J=3,6$  Hz, 2H), 5,84 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H), 7,09 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  251 (calculado 228).

20

#### Ejemplo 8 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 14-hidroxi-tetradec-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a la oxaciclotridecan-2-ona para obtener el ácido 14-hidroxi-tetradec-2*t*-enoico.

25

Caracterización:

CCM:  $R_f = 0,1$  (heptano/acetato de etilo 6/4)

30

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,29-1,35 (m, 14H), 1,46-1,61 (m, 4H), 2,21-2,29 (m, 2H), 3,66 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 5,84 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H), 7,09 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  265 (calculado 242)

35

#### Ejemplo 9 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 14-hidroxi-tetradec-2-fluoro-2-enoico

El protocolo de síntesis del DHA fluorado en posición 2 (Ejemplo 2) se aplica a la oxaciclotridecan-2-ona para obtener el ácido 14-hidroxi-tetradec-2-fluoro-2-enoico en forma de una mezcla *cis/trans*.

40

Caracterización:

CCM:  $R_f = 0,1$  (heptano/acetato de etilo 6/4)

45

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,29 (m, 28H), 1,42-1,62 (m, 8H), 2,27-2,31 (m, 2H, forma *cis*), 2,51-2,56 (m, 2H, forma *trans*), 3,68 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 3,70 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 6,04 (dt,  $J=21,3$  Hz, 1H, forma *trans*), 6,27 (dt,  $J=33,0$  Hz, 1H, forma *cis*).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  283 (calculado 260)

50

#### Ejemplo 10 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 17-hidroxi-heptadec-2*t*-enoico

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a la ciclopentadecanolida para obtener el ácido 17-hidroxi-heptadec-2*t*-enoico.

55

Caracterización:

CCM:  $R_f = 0,1$  (heptano/acetato de etilo 6/4)

60

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,27-1,32 (m, 20H), 1,46-1,61 (m, 4H), 2,20-2,29 (m, 2H), 3,67 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H), 5,84 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H), 7,08 (dt,  $J=15,6$  Hz, 1H).

Espectroscopia de masa:  $[\text{M-Na}]^+$  307 (calculado 284)

#### Ejemplo 11 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 17-hidroxi-heptadec-2-fluoro-2-enoico

65

El protocolo de síntesis del DHA fluorado en posición 2 (Ejemplo 2) se aplica a la ciclopentadecanolida para obtener el ácido 17-hidroxi-heptadec-2-fluoro-2-enoico en forma de una mezcla *cis/trans*.

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,27 (m, 40H), 1,45-1,62 (m, 8H), 2,24-2,32 (m, 2H, forma *cis*), 2,50-2,58 (m, 2H, forma *trans*), 3,69 (t, J=6,6 Hz, 4H), 6,05 (dt, J=21,6 Hz, 1H, forma *trans*) y 6,26 (dt, J=40,8 Hz, 1H, forma *cis*).

Espectroscopia de masa: [M-H]<sup>-</sup> 301 (calculado 302)

Punto de fusión: 77°C ± 1°C.

#### Ejemplo 12 Modo de funcionamiento para la síntesis del ácido 18-hidroxi-octadec-2*t*-enoico (R1=H, n=14)

El protocolo de síntesis del DHA se aplica a la hexaciclododecanolida para obtener el ácido 18-hidroxi-octadec-2*t*-enoico.

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,27-1,65 (m, 26H), 2,19-2,39 (m, 2H), 3,67 (t, J=6,6 Hz, 2H), 5,83 (dt, J=15,6 Hz, 1H), 7,09 (dt, J=15,6 Hz, 1H).

Espectroscopia de masa: [M-Na]<sup>+</sup> 321(calculado 298)

#### Ejemplo 13 Caracterización del ácido 16-hidroxi-hexadec-2*t*-enoico

Caracterización:

CCM: Rf = 0,1 (heptano/acetato de etilo 6/4)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,27-1,32 (m, 18H), 1,46-1,61 (m, 4H), 2,21-2,28 (m, 2H), 3,66 (t, J=6,6 Hz, 2H), 5,85 (dt, J=15,6 Hz, 1H), 7,09 (dt, J=15,6 Hz, 1H).

Espectroscopia de masa: [M-Na]<sup>+</sup> 293 (calculado 270).

#### Ejemplo de reacción de Doebner-Knoevenagel a partir del oxaciclotridecanol:

Se ponen en solución 1,4 g (7,0 mmoles) de oxaciclotridecanol (obtenido según el protocolo de reducción parcial en lactol), bajo flujo de nitrógeno, en 4 volúmenes de piridina, en presencia de 1,09 g (10,5 mmoles) de ácido malónico y 0,11 ml de piperidina. El medio de reacción se calienta a 80°C durante 1h 30, y después bajo reflujo durante 2h. A temperatura ambiente, la solución se vierte en una solución de HCl 3M (50 ml). El sólido filtrado se lava con agua y luego se recristaliza en acetonitrilo (1,2 g obtenidos, es decir, 70% de rendimiento).

Los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados según la invención fueron objeto de varios experimentos que demostraron su beneficio como principio activo en unas composiciones dermatológicas y/o cosméticas.

#### Estudio del efecto antirradicalario en especies activas de oxígeno (EAO)

Durante el metabolismo celular normal, cuando tiene lugar la exposición ocasional de la piel a unos agentes estresantes o en el transcurso de patologías dermatológicas, se generan unas especies oxigenadas reactivas también denominadas Especies Activadas de Oxígeno (EAO) (Y. M. W. Janssen *et al*, 1993). Estas EAO, descritas como unos metabolitos muy reactivos, desempeñan un papel importante en un gran número de procesos tales como la inflamación, el envejecimiento y la promoción tumoral.

Las EAO son consideradas como los "segundos mensajeros" en la señalización celular del estrés oxidativo y, por lo tanto, como los mediadores precoces de la inflamación (A. Van Der Vliet y A. Bast, 1992).

Su sobreproducción conduce a importantes daños en el seno de la célula. Ciertos constituyentes celulares son entonces unas dianas principales de un estrés oxidativo de este tipo: los componentes lipídicos de la membrana plasmática (lipoperoxidación), proteínas (desnaturalización y degradación) y el material genético o ADN (mutaciones) pueden ser alterados. Las células son capaces de limitar estos daños oxidativos gracias a diversos sistemas de defensa antirradicalaria (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) (B. P. Yu, 1994; H. Steiling *et al*, 1999).

No obstante, en ciertas condiciones, las EAO se producen en tal cantidad que la actividad antioxidante celular es insuficiente; por lo tanto, estas EAO se convierten en unos factores inductores de patologías inflamatorias y de envejecimiento tisular (Y. Miyachi *et al*, 1986; M. Kress *et al*, 1995).

5 Existen diferentes agentes químicos (por ejemplo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o físicos (por ejemplo: UVA) capaces de generar *in vitro* un estrés oxidativo. Las EAO producidas alterarán así diversas dianas celulares (membranas, ADN o proteínas) cuya alteración puede ser analizada mediante unas metodologías biológicas ampliamente utilizadas habitualmente tales como la dosificación de las TBARS para la lipoperoxidación lipídica, o la dosificación *in vitro* de las EAO intracelulares con la ayuda de una sonda H<sub>2</sub>DCF-DA.

10 Se estableció un modelo de estudio *in vitro* del estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/hierro, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que genera masivamente unas EAO intracelulares mediante una reacción en cadena desencadenada por la oxidación de los lípidos membranarios.

15 Esta técnica se basa en la utilización de una sonda fluorescente, la 6-carboxi-2',7'-diclorodihidro fluoresceína acetato, di(acetoximetil éster) (H<sub>2</sub>DCF-DA), que, una vez ha penetrado en la célula, es desacetilada por las esterasas intracelulares formando entonces H<sub>2</sub>DCF. Este producto es oxidado por las EAO intracelulares en un compuesto altamente fluorescente: la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Suematsu M *et al.*, 1996, Free Radicals Practical Approach, Punchard ed. p 83-99).

20 Los materiales y métodos utilizados para la dosificación *in vitro* de las EAO intracelulares se indican a continuación.

a) Herramienta celular:

25 Línea celular de fibroblastos murinos cutáneos L929.

b) Material:

- 30
- Microplaca de 96 pocillos de fondo plano.
  - Citofluorímetro Cytofluor II: Ref. PERSEPTIVE BIOSYSTEMS

c) Reactivos:

35 Reactivos de cultivo celular

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Suero de ternera fetal (SVF)
- Tampón fosfato PBS pH 7.4
- Tripsina EDTA (1X)

40 Sonda fluorescente

- 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, di(acetoximetil éster) (PM. 675,43)

45 Productos de estimulación de células

- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%: Ref. GIFRER (Laboratorio Gifrer Barbezat)
- Sulfato de amonio ferroso (Fe<sup>2+</sup>)
- Sulfato de amonio férrico (Fe<sup>3+</sup>)

50 d) Productos ensayados:

Las concentraciones ensayadas son unas concentraciones no citotóxicas. La citotoxicidad se realizó usando el método del rojo neutro, después de la incubación del producto durante 3 horas.

55 El producto antirradicalario de referencia es la vitamina E o  $\alpha$  tocoferol (PM: 430,7) (SIGMA, ref: T-1539).

La solución madre se prepara a 400 mg/ml en DMSO y se conserva a -20°C. La solución de pretratamiento se prepara extemporáneamente a 400  $\mu$ g/ml en medio de cultivo sin SVF.

60 Para la evaluación de los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados, las diluciones se preparan en medio de cultivo extemporáneamente, para un rango de concentraciones de 0,02, 0,2, 2 y 20 ng/ml.

e) Protocolo:

65

Inoculación de las células:

5 Las células de la línea de fibroblastos L929 fueron inoculadas en unasmicroplacas de 96 pocillos de fondo plano en 100  $\mu$ l de DMEM suplementado con 10% SVF, y después fueron incubadas durante una noche a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

La placa vacía sin células fue evaluada en 6 pocillos.

Pretratamiento de las células:

10 Las diluciones de los productos a ensayar y de la molécula de referencia se realizan en el medio de cultivo sin SVF, y después se depositan en 7 pocillos a razón de 100  $\mu$ l por pocillo.

15 Las células se incuban entonces durante 3 horas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células "Testigo" (fluorescencia natural de las células), "Control" (producción basal de EAO) y "Estimuladas" (producción de EAO después de tratamiento oxidativo) se cubren con 100  $\mu$ l de DMEM.

20 Las células "Control" se incuban con una sonda pero ni se pretratan ni se tratan.

Las células "Estimuladas" se incuban con la sonda y se tratan pero no se pretratan.

Las células "Testigo" no se pretratan ni se incuban con una sonda, ni se tratan.

25 Incubación de las células con la sonda y estrés oxidativo:

Las células se enjuagan con PBS 1X a razón de 100  $\mu$ l por pocillo. Y después se incuban durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> con 50  $\mu$ l de la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA a 5  $\mu$ M.

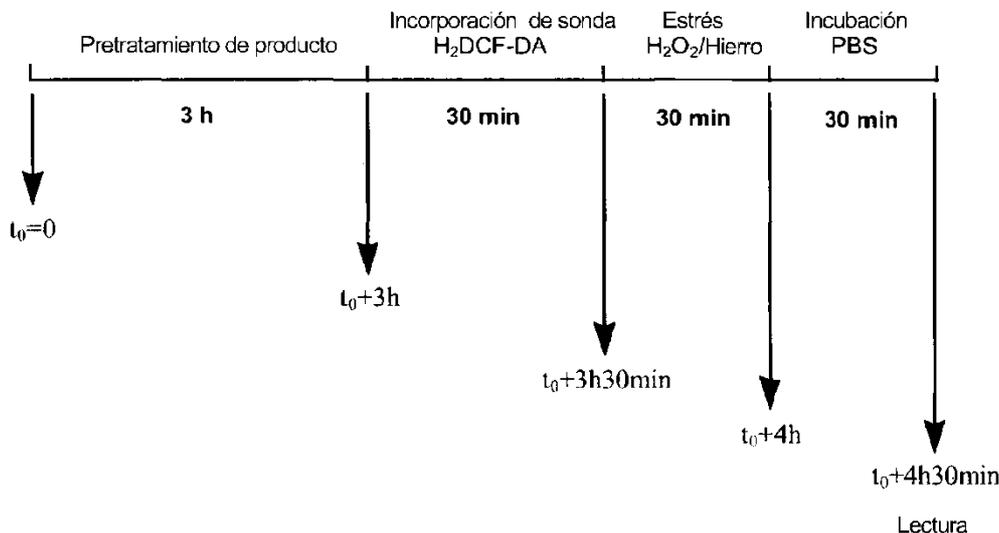
30 Después de 30 minutos en contacto con la sonda sola, las células se incuban durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> con una adición de 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 800  $\mu$ M y 25  $\mu$ l de solución de hierro ferroso y hierro férrico a 8 mM para obtener unas concentraciones finales de 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 2 mM de hierro ferroso y hierro férrico.

35 Las células se enjuagan a continuación con PBS 1X a razón de 100  $\mu$ l por pocillo, y después se incuban durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda a 5% de CO<sub>2</sub> con 100  $\mu$ l de PBS 1X.

40 Esta 1 h 30 de incubación a 37°C permite que las est erasas intracelulares desacetilen la sonda en H<sub>2</sub>DCF, oxidable por las EAO intracelulares en DCF: compuesto fluorescente cuya formación es proporcional a la cantidad de EAO intracelulares.

La intensidad de la fluorescencia se lee en el citofluorímetro a lexcitación = 485 nm y lemisión = 530 nm. Refleja la cantidad de EAO intracelulares producidas.

45 Esquema del protocolo de estudio:



Cálculo del % de protección contra la producción de EAO intracelulares.

5 La relación siguiente permite calcular para cada concentración de producto ensayado el % de protección contra la producción de EAO intracelulares (ya que la intensidad de fluorescencia o IF refleja la liberación intracelular de EAO).

$$\frac{[\text{IF Oxidante (H}_2\text{O}_2\text{/Hierro)} - \text{IF (Oxidante + Producto)}]}{\text{IF Oxidante (H}_2\text{O}_2\text{/Hierro)} - \text{IF Control}} \times 100$$

10 Los valores dados en la tabla siguiente son los porcentajes de inhibición de producción de EAO intracelular a consecuencia de un estrés oxidativo exógeno, con respecto a las células "testigo" (100%) y a las células "estimuladas" (0%).

15 Los porcentajes medios de protección, para las 13 moléculas ensayadas a 4 concentraciones para la línea L929 se presentan en la tabla I siguiente.

15 Tabla I: Análisis de la protección contra producción intracelular de EAO para las 13 moléculas derivadas de hidroxiácidos grasos insaturados:

20 Porcentaje de inhibición de la producción intracelular de EAO.

Vit. E 400µg/ml | 47 %

Compuestos de fórmula I				Dosis			
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>	0,02 ng/ml	0,2 ng/ml	2 ng/ml	20 ng/ml
3	H	H	F	3	-3	-32	-51
3	H	H	H	21	15	11	14
4	H	H	F	10	6	-4	-36
4	H	H	H	17	9	9	0
5	H	H	H	56	47	46	36
6	H	H	F	15	4	5	-9
6	H	H	H		33		
9	H	H	H	9	10	6	-22
10	H	H	F	29	16	0	-19
10	H	H	H	11	4	-20	-34
13	H	H	F	36	28	14	-9
13	H	H	H	3	13	-1	-10
14	H	H	F	6	-17	-26	-42

Preincubación: 3 horas  
 Número de ensayos = 3 para todos los compuestos.  
 Número de ensayos = 18 para la vit. E.

25 *In vitro*, a nivel celular, un estrés exógeno por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>-Fe<sup>3+</sup> es capaz de desencadenar la producción de EAO intracelulares detectados con la ayuda de una sonda fluorescente.

25 En conclusión, los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de cadenas cortas (C9 y C10) y no fluorados parecen ser más particularmente activos en la protección celular antirradicalaria.

30 Estudio del efecto antirradicalario. Análisis de peroxidación lipídica

30 Por otra parte, durante el metabolismo celular normal, cuando tiene lugar la exposición ocasional de la piel a unos agentes estresantes o en el transcurso de patologías dermatológicas, se producen unas especies oxigenadas reactivas también denominadas Radicales Libres Oxigenados (RLO) (Y. M. W. Janssen *et al*, 1993). Estos RLO, descritos como unos metabolitos muy reactivos, desempeñan un papel importante en un gran número de procesos tales como la inflamación, el envejecimiento y la promoción tumoral.

35 Los RLO son considerados como los "segundos mensajeros" en la señalización celular del estrés oxidativo y, por lo tanto, como los mediadores precoces de la inflamación (A. Van Der Vliet y A. Bast, 1992).

40 Su sobreproducción provoca daños considerables en el seno de la célula. Algunos constituyentes celulares son entonces las dianas principales de un estrés oxidativo de este tipo: los componentes lipídicos de la membrana plasmática (lipoperoxidación), las proteínas (desnaturalización y degradación) y el material genético o ADN (mutaciones) pueden ser alterados. Las células son capaces de limitar estos daños oxidativos gracias a diferentes sistemas de defensa antirradicalarios (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) (B. P. Yu, 1994; H. Steiling *et al*,

1999).

No obstante, en ciertas condiciones, los RLO se producen en tal cantidad que la actividad antioxidante celular es insuficiente; por lo tanto, estos RLO se convierten entonces en unos factores inductores de patologías inflamatorias y del envejecimiento tisular (Y. Miyachi *et al*, 1986; M. Kress *et al*, 1995).

Con el fin de valorar la actividad antirradicalaria de los diferentes derivados hidroxilados según la invención, se ha analizado su poder protector contra la alteración de las membranas celulares desencadenada por un estrés oxidativo (químico), en comparación con un antioxidante de referencia, la vitamina E.

La membrana plasmática constituye la principal y la primera diana de los RLO que, al ser rica en lípidos, es el sitio de una peroxidación incrementada (A. W. Girotti, 1985). Los peróxidos generados en el transcurso de esta oxidación lipídica son también muy reactivos y capaces de degradar el material proteico y genómico.

Para evaluar la alteración membranaria, se ha medido la peroxidación lipídica mediante una dosificación *in vitro* de los complejos entre los productos de oxidación lipídica y el ácido tiobarbitúrico. Estos complejos se denominan TBARS (por Thiobarbituric Acid Reactive Substances) y dan su nombre al ensayo: Ensayo de TBARS.

Con el fin de simular un estrés oxidativo químico, se ha tratado la línea de fibroblastos, L929, mediante un complejo compuesto por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y hierro (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>) reconstituyendo así la reacción de Fenton, fuente de RLO y más particularmente de radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) (D. A Vessey *et al*. 1992):



Los productos se han evaluado en la línea de fibroblastos murinos L929. Las células se pretratan con diferentes las concentraciones de productos durante 16 horas y se estimulan a continuación con el complejo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> (200 μM - 1 mM) durante 1 hora.

Soluciones madre: 100 mg/ml etanol, 4°C

Soluciones finales: 0,02 ng/ml.

La peroxidación de los lípidos membranarios se ha analizado midiendo los TBARS (protocolo ref. PLN<sup>2</sup>, según Morlière *et al*, 1991).

*Principio del test:*

En medio ácido, a 95°C, se forman unos complejos, anotados TBARS por Thio Barbituric Reactive Substance, entre los productos de oxidación lipídicos (malondialdehído o MDA) y el ácido tiobarbitúrico (TBA) que pueden ser dosificados en fluorescencia con respecto a una gama patrón con el MDA. Por lo tanto, la dosificación de los TBARS se expresa entonces en pmol/μg de proteína. Las proteínas y TBARS se dosifican en el medio intracelular.

*Cálculo del porcentaje de protección de las membranas celulares:*

A partir del cálculo de los TBARS en pmol/μg de proteína, se ha calculado la eficacia protectora de los diferentes productos contra la oxidación de los lípidos membranarios.

$$\% \text{ de protección} = \frac{[\text{TBAR control}] - [\text{TBARS (+ productos)}]}{\text{TBARS control}} \times 100$$

Se han realizado cuatro experimentos independientes. Durante estos experimentos, se han evaluado diversos compuestos (la prueba no permite evaluar más de 10 moléculas al mismo tiempo). Los compuestos evaluados varias veces han sido elegidos en función de los resultados obtenidos en la otra prueba que mide asimismo una actividad antirradicalaria (prueba de dosificación de las especies activas del oxígeno, EAO).

El modelo utilizado en este experimento (reacción de Fenton) desencadena una peroxidación lipídica importante en los fibroblastos L929. Esta descarga masiva de radical hidroxilo OH<sup>•</sup> genera por lo tanto un estrés oxidativo a nivel celular y en particular a nivel de las membranas. Sin embargo, en este tipo de reacción oxidativa, los productos que resultan de la peroxidación lipídica se internalizan en las células y los TBARS se dosifican en el medio intracelular.

La vitamina E a 400 μg/ml, disminuye la peroxidación lipídica inducida por el complejo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>, y protege de manera muy eficaz las membranas celulares.

Los resultados de los 4 experimentos se presentan en la tabla II.

Resulta evidente que estos derivados hidroxilados tienen una actividad antioxidante estable y reproducible. Se trata particularmente de derivados con cadena corta de carbonos.

Tabla II: Protección de los lípidos membranaarios por los diferentes derivados hidroxilados

				% protección de los lípidos membranaarios		
Moléculas ensayadas				Nº experimento	Media	Desviación típica
Vit E 400 µg/ml				4	44,66	25,85
Compuestos de fórmula I						
N	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>			
6	H	H	H	3	52,91	8,81
6	H	H	F	3	40,65	16,83
4	H	H	F	3	36,54	41,69
13	H	H	H	1	22,10	
3	H	H	F	1	38,14	
13	H	H	F	3	7,39	16,23
10	H	H	H	1	27,18	
4	H	CH <sub>3</sub>	H	2	57,75	3,15
10	H	H	F	3	13,13	13,37
14	H	H	F	1	35,30	
4	H	H	H	2	37,88	26,28
9	H	H	H	3	8,72	48,78
3	H	H	H	2	15,7	29,93

- 5 El modelo *in vitro* presentado en este estudio refleja las consecuencias debidas a un estrés oxidativo principal en la principal diana celular que es la membrana plasmática. Por lo tanto, la dosificación de peroxidación lipídica constituye un buen marcador del estrés oxidativo y permite evaluar la acción antioxidante, con respecto al radical hidroxilo, de principios activos a nivel de la membrana celular.
- 10 La vitamina E, molécula antioxidante, permite validar este modelo y protege eficazmente las membranas celulares del estrés oxidativo.

Diferenciación queratinocítica

- 15 Por último, la epidermis participa en la función principal de la piel, que es resistir al medio ambiente y protegerse del mismo. Es un epitelio estratificado escamoso en constante renovación. La homeostasis y la regeneración tisulares se basan en las células queratinocíticas, las células de soporte, los factores solubles, favoreciendo la proximidad celular las interacciones de las células entre sí y con las matrices extracelulares.
- 20 El estrato córneo, último estadio de la diferenciación epidérmica, resulta de tres procesos principales: formación de los filamentos de queratina, "cornificación" del queratinocito y formación del cemento lipídico intercelular organizado en estructuras lamelares.

25 En el seno de la epidermis, la composición y la naturaleza de los lípidos varían en función del estado de diferenciación en el que se encuentran los queratinocitos. Así, cuando tiene lugar el paso de los asientos basales a las células de la capa córnea, se observa una reducción importante de los fosfolípidos que, en las capas vivas, son responsables de la integridad de las membranas plasmáticas; paralelamente, se observa un aumento de los lípidos neutros (ácidos grasos libres y triglicéridos) y de los esteroides (colesterol), así como un gran incremento de los esfingolípidos y en particular de las ceramidas. A nivel de la capa córnea, se encuentra 40 a 50% de esfingolípidos, 20 a 27% de colesterol y 9 a 26% de ácidos grasos libres. Las ceramidas intervienen de manera covalente con los residuos glutámicos de la involucrina, precursor de la envoltura córnea. Los ácidos grasos, gracias a su carácter hidrófobo, participan en el control de la impermeabilidad cutánea, interviniendo el colesterol en la fluidez membranaria.

35 Numerosas proteínas específicas de la capa córnea o estrato córneo, (capa que confiere la función de barrera a la epidermis), se producen a nivel de la capa granulosa compuesta por los últimos queratinocitos que presentan una actividad transcripcional y traduccional antes de la lisis nuclear que acompaña la cornificación.

40 El programa de diferenciación de los queratinocitos se basa mayoritariamente en la evolución de proteínas de estructura que son las queratinas y que contribuyen a la integridad arquitectónica de la epidermis. Su expresión varía en función del grado de maduración de las células epidérmicas. En las capas suprabasales aparecen la queratina 1 básica y queratina 10 ácida, denominadas queratinas de diferenciación terminal.

45 Junto a la capa córnea, las queratinas interactúan con unas proteínas ricas en histidina para formar una mezcla relativamente homogénea que llena los corneocitos. Estas proteínas se derivan de un precursor, la profilagrina que es una molécula grande (PM > 450 kDa) almacenada a nivel de la capa granulosa. Es una proteína cuyos dominios N y C terminales unen el calcio y cuya desfosforilación y proteólisis parcial dan la filagrina. Ésta cataliza la formación

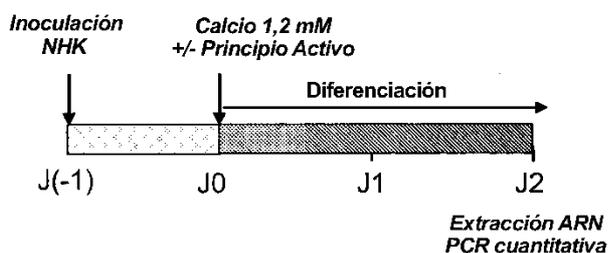
de puentes disulfuros entre los filamentos de queratinas y contribuye a su integración en el seno de la matriz intracorneocitaria. Por otra parte es la fuente, por proteólisis, de un conjunto de aminoácidos y de derivados peptídicos que confieren a la capa córnea ciertas propiedades de retención hídrica.

- 5 En la capa córnea, los corneocitos contienen esencialmente unos filamentos de queratina insertados en una matriz densa, rodeado el conjunto por una pared proteica gruesa y resistente: la envoltura córnea. Las proteínas precursoras de esta estructura, dispuestas en la cara interna de la membrana plasmática, son sintetizadas por los queratinocitos a partir de la capa espinosa, pero su puentado -bajo la acción de enzimas, las transglutaminasas- se efectúa entre las capas espinosas y granulosa. Numerosas proteínas citosólicas, asociadas a la fracción
- 10 membranaria de los queratinocitos o almacenadas en los gránulos de queratohialina, participan en la elaboración de la capa córnea. Se puede distinguir así la involucrina (68 kDa), rica en glutamina y en lisina.

- La impermeabilidad de la capa córnea se debe, en su mayor parte, a un cemento intercelular lipídico hidrófobo que reúne los corneocitos. El contenido lipídico de la epidermis es el resultado final de la lipogénesis queratinocitaria y sebácea. En la epidermis normal, una mezcla de lípidos neutros y polares predomina en las capas profundas para ser reemplazada progresivamente por un contenido más apolar, incluyendo unas ceramidas. Numerosas proteínas participan en esta lipogénesis y por lo tanto en la síntesis de las ceramidas. Entre éstas, se ha puesto en evidencia la proteína DES2 (esfingolípido C4-hidroxilasa/delta-4 desaturasa): posee una actividad dihidroceramida hidroxilasa que interviene en la síntesis de las fitoceramidas y su expresión es inducida con la diferenciación (MIZUTANI Y. *et al*, 2004). Los lípidos sintetizados por los queratinocitos son dirigidos hacia la superficie por los cuerpos lamelares, los queratinosomas. Son secretados en los espacios intercelulares y se organizan en hojas continuas alineadas en paralelo a las membranas celulares de los corneocitos. Esta reorganización lipídica que se produce en el transcurso de la diferenciación epidérmica hace intervenir un cierto número de transportadores lipídicos de la familia de los transportadores ABC (Adenosine Triphosphate Binding Cassette Transporter). Entre estos transportadores, algunos ven su expresión inducida en el curso de la diferenciación queratinocitaria (ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC4 y ABCG1), otros ven su expresión reprimida (ABCB9 y ABCD1) y los demás no sufren ninguna regulación. Se ha puesto en evidencia el papel de los transportadores cuya expresión es inducida: ABCG1 está implicado por ejemplo en la translocación del colesterol en los queratinocitos en diferenciación. La expresión de algunos miembros de otra familia de transportadores, la de los FATP (Fatty Acid Transport Protein), tales como FATP1, FATP3, FATP4 y FATP5 es inducida en el transcurso de diferenciación queratinocitaria. Estos transportadores estarían implicados en la reorganización del grupo de lípidos neutros (KIELAR *et al.*, 2003).

- Los queratinocitos humanos normales (NHK) proliferan y se diferencian *in vitro*, formando unas capas estratificadas que simulan la organización basal de la piel. Unas concentraciones extracelulares de calcio superiores a 0,1 mM inician una cascada de eventos genómicos y no genómicos que conducen a los queratinocitos de una fase de proliferación hacia una fase de diferenciación. La diferenciación de queratinocitos se puede evaluar entonces estudiando la expresión de varios marcadores tales como las queratinas 1 y 10, la transglutaminasa 1, la desaturasa DES2, la involucrina, los transportadores FATP4 y ABCG1. Se ha evaluado así en un modelo de cultivo *in vitro* el efecto de ciertos ácidos hidroxialceno carboxílicos.

- 40 El plan del estudio se puede esquematizar como sigue: diferenciación de los NHK *in vitro* y extracciones para análisis.



- 45 Condiciones de cultivo y de extracción

- Los queratinocitos humanos normales (NHK) se aíslan a partir de explantes de piel. Se cultivan en un medio KSMF (Gibco) con bajo contenido de calcio (0,1 mM) que contiene 25 µg/ml de BPE (Bovin Pituitary Extract) y 1,5 ng/ml de EGF (Epithelium Growth Factor). Veinticuatro horas después de la inoculación, la diferenciación es inducida por la adición de calcio (concentración final 1,2 mM). Los principios activos se añaden o no al mismo tiempo que el calcio a unas concentraciones de 100 y 1 µg/ml con el fin de determinar si tienen un efecto de potenciación de la diferenciación. Las células se analizan entonces 48 horas después de la adición del calcio y de los productos.

- 55 Extracción de los ARN y RT-PCR en tiempo real

Los ARN totales se extraen en frío a partir de los queratinocitos.

Después de la transcripción inversa de los ARNm en ADNc, las PCR se realizan en placa de 96 pocillos (aparato de PCR cuantitativa iCycler, BioRad). La expresión de los transcritos de la transglutaminasa, de la desaturasa (DES2), ABCG1 y FATP4 se normaliza con respecto a la expresión de genes de referencia (GAPDH, UBC, HPRT). Los niveles de expresión de las muestras tratadas con calcio y el principio activo se comparan con los niveles de expresión de las muestras tratadas solamente con calcio.

5

Los resultados de los efectos de los productos a 1 µg/ml se dan en las tablas siguientes:

Compuestos de fórmula I				Factor de inducción vs control (CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM)	TG1	DES2	ABCG1	FATP4
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>	Vit. D3 1µM				
3	H	H	F		1,5	2,0	2,0	1,1
3	H	H	H		1,5	1,7	1,5	1,2
4	H	H	F		1,2	1,6	1,5	1,4
4	H	H	H		1,6	2,2	2,6	1,3
4	H	H	H		1,2	1,0	1,2	1,0
5	H	H	H		1,5	1,8	2,7	1,0
6	H	H	F		1,2	1,3	1,3	1,0
6	H	H	H		1,1	1,7	1,9	1,2
9	H	H	H		1,4	1,8	1,5	1,2
10	H	H	F		1,4	1,6	1,4	1,0
10	H	H	H		1,5	2,0	1,4	1,2
13	H	H	F		4,2	9,0	4,8	2,2
13	H	H	H		1,4	3,0	3,0	1,4
14	H	H	F		1,7	2,8	4,0	1,0

10 A la dosis de 1 µg/ml, el conjunto de los productos tiene un efecto moderado en la expresión de los marcadores de diferenciación.

Efectos de los productos a 100 µg/ml

Compuestos de fórmula I				Factor de inducción vs control (CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM)	TG1	DES2	ABCG1	FATP4
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>	Vit. D3 10 µM				
3	H	H	F		8,3	11,0	3,1	1,3
3	H	H	H		0,9	1,9	1,2	1,2
3	H	H	H		2,6	2,4	4,0	1,2
4	H	H	F		1,7	3,2	2,6	1,4
4	H	H	H		1,7	2,2	2,5	1,4
6	H	H	F		7,8	10,3	6,3	1,9
6	H	H	H		12,3	11,5	6,6	2,5
9	H	H	H		14,8	51,7	13,8	4,5
10	H	H	F		3,5	16,0	4,6	2,3
10	H	H	H		31,4	125,8	25,5	5,9

15 La vitamina D3 a 10 µm induce la expresión de los transcritos de la transglutaminasa 1, DES2 y ABCG1 en un factor de 8,3, 11,1 y 3,1 respectivamente, con respecto al testigo tratado solamente con el calcio. Por el contrario, la expresión de FATP4 no está modulada por el tratamiento con vitamina D3.

20 Por lo tanto, el efecto de potenciación de la diferenciación se ha demostrado a propósito de los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados según la invención.

Efecto antiinflamatorio analizado a nivel de los mediadores lipídicos de la inflamación

25 El queratinocito, la célula más representada a nivel de la epidermis, libera, en respuesta a numerosos factores extracelulares presentes en su entorno, unos mediadores biológicamente activos, en particular unas prostaglandinas y los leucotrienos que juegan un papel importante en el inicio y la modulación de las reacciones inflamatorias cutáneas y que intervienen asimismo en la regulación de la respuesta inmune. La prostaglandina PG6KF1alfa es uno de los metabolitos principales producidos por el queratinocito estimulado, y representativo de la modulación de la producción de los metabolitos del metabolismo del ácido araquidónico procedentes de la vía de la ciclooxigenasa.

30

Protocolo

35 La suspensión de queratinocitos en el DMEM al 10% de SVF se distribuye en placas de 6 pocillos (1,2·10<sup>6</sup> células/pocillo), y se incuba durante 16 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Los queratinocitos se enjuagan entonces con PBS para eliminar las células no adherentes y después se exponen a los productos a ensayar incluidos en DMEM sin SVF (que podría interferir en la dosificación).

## ES 2 526 201 T3

La concentración ensayada en cultivo es de 3 µg/ml. Se ha decidido tras un ensayo preliminar de evaluación de la citotoxicidad (rojo neutro) y no es citotóxica.

5 Para cada tratamiento, se realizan 3 pocillos. Las células se preincuban durante 60 mn con los productos a ensayar y después se añade un agente estimulante de la cascada del ácido araquidónico, el ionóforo cálcico, durante 5 horas: se utiliza el ionóforo cálcico A23187 a la concentración de 1 µM.

10 Después de estas 5 horas de cultivo, se recuperan los medios de cultivo de cada pocillo, se centrifugan a 3000 rpm y se almacenan a -80°C.

La producción de prostaglandina 6KF1α para cada uno de los ensayos se mide mediante un kit Elisa EUROMEDEX.

### Resultados

15 Los resultados están expresados en porcentaje de actividad/control estimulado.

Compuestos de fórmula I				% de actividad inhibidora de las moléculas evaluadas en la producción de PG6KF1α
				Inflamación
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>	3 µg/ml
3	H	H	H	29
4	H	H	F	30
4	H	H	H	
4	H	CH <sub>3</sub>	H	
8	H	H	H	32
8	H	H	F	44
9	H	H	H	31
10	H	H	F	18
10	H	H	H	Inactivo
13	H	H	F	14
13	H	H	H	25

### Propiedad antiinflamatoria: Inhibición de la síntesis de una citocina proinflamatoria IL8

20 La función de barrera de la piel permite asegurar una protección con respecto al entorno exterior, y los queratinocitos de la epidermis pueden responder directamente a una amplia variedad de agentes irritantes o alérgenos y participar activamente en los procesos inflamatorios e inmunitarios cutáneos en particular a través de la producción de citocinas proinflamatorias, mediadores de origen proteico. Entre estas moléculas biológicamente activas la IL1α (Interleucina 1 α) y el TNFα (Tumor Necrosis Factor α) se consideran unas citocinas primarias, siendo su liberación suficiente para inducir la inflamación en virtud de su inducción de moléculas de adhesión a nivel de las células endoteliales y de su inducción de factores quimiotácticos tales como las quimiocinas. El sistema de las quimiocinas controla el tráfico leucocitario durante la respuesta inflamatoria y es necesario para las interacciones de las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

30 En el presente estudio, se interesa más específicamente en la quimiocina -Interleucina 8- que está muy implicada en la amplificación de la respuesta inflamatoria y cuya función principal es reclutar y activar los polinucleares neutrófilos estimulando en particular su liberación de moléculas proinflamatorias.

35 En este estudio, realizado en unas placas de 96 pocillos, se ha evaluado la actividad de los ácidos hidroxialcenos, en la producción de interleucina 8 inducida a nivel del queratinocito por el forbol éster PMA y el ionóforo cálcico A23187.

### Protocolo

40 La suspensión de queratinocitos en KSFM complementado se distribuye en unas placas de 96 pocillos (3·10<sup>4</sup> células/pocillo), y se incuba durante 16 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Los queratinocitos se enjuagan entonces con PBS para eliminar las células no adherentes y después se exponen a los productos a ensayar incluidos en KSFM no complementado (que podría interferir en la dosificación).

45 La concentración ensayada en cultivo es de 3 µg/ml. Se ha decidido después de un ensayo preliminar de evaluación de la citotoxicidad (rojo neutro) y no es citotóxica.

50 Para cada tratamiento, se realizan 3 pocillos. Las células se preincuban durante 60 mn con los productos a ensayar y después se estimulan, paralelamente a unos controles negativos sin estimulante: Phorbol Myristate Acetate (PMA) 1 µM + ionóforo cálcico (A23187) 0,1 µM.

Incubación durante 6 horas a 37°C en atmósfera húmeda de aire que contiene 5% de CO<sub>2</sub>.

Los medios de cultivo de cada pocillo se recuperan, se centrifugan a 3000 rpm y se conservan a -80°C.

5 Dosificación de las citocinas: La IL8 se dosifica mediante un método inmunoenzimático en kit ELISA (Immunotech).

IL8 fue sometida a ensayo usando el método de inmunoenzima del equipo de ELISA (Immunotech).

Resultados

10

Los resultados se expresan en porcentaje de actividad/control estimulado.

Compuestos de fórmula I				% de actividad inhibidora de las moléculas evaluadas en la producción de PG6KF1α
				Inflamación
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>	3 µg/ml
3	H	H	H	50
4	H	H	F	Inactivo
4	H	H	H	15
4	H	CH <sub>3</sub>	H	Inactivo
6	H	H	H	No determinado
8	H	H	H	Inactivo
8	H	H	F	Inactivo
9	H	H	H	16
10	H	H	F	30
10	H	H	H	30
13	H	H	F	107
13	H	H	H	62
14	H	H	H	No activo

15 Los compuestos según la invención se han evaluados en términos de actividad antiinflamatoria en la liberación de interleucina 8 por los queratinocitos humanos NHK estimulados por forbol éster PMA + ionóforo cálcico A23187.

Se realizaron tres experimentos independientes: la síntesis de los datos obtenidos permite poner en evidencia las potencialidades antiinflamatorias en particular de los 2 compuestos siguientes:

- 20
- n=13, R = R<sub>n</sub> = H, R<sub>1</sub> = F
  - n=13, R = R<sub>n</sub> = R<sub>1</sub> =H

Para la concentración evaluada para cada una de las moléculas y después del cálculo de las Dosis Eficaces 50, los resultados muestran lo siguiente:

25

Compuestos de fórmula I				% Inhibición a 3 µg/ml	DE 50
n	R	R <sub>n</sub>	R <sub>1</sub>		
13	H	H	F	107	< 3 µg/ml
13	H	H	H	62	< 3 µg/ml

Inflamación y prurito: Análisis del flujo cálcico a consecuencia de la estimulación de los receptores PAR2

30 El receptor "Protease-Activated Receptor-2" (PAR-2) está asociado a la fisiopatología de varias enfermedades que implican unas respuestas inflamatorias.

35 El PAR-2 es expresado por diferentes tipos celulares de la piel: queratinocitos, células mioepiteliales de las glándulas sudoríparas, folículo piloso, células de tipo dendrítico de la dermis y las células endoteliales de la *lamina propria* y de la dermis (Steinhoff *et al.*, 1999; Santulli *et al.*, 1995). Los melanocitos no expresan este receptor (Seiberg *et al.*, 2000) aunque el PAR-2 juega un papel importante en la pigmentación al favorecer la transferencia de melanina de los melanocitos hacia los queratinocitos (Sharlow *et al.*, 2000).

40 Las serina-proteasas generadas por la epidermis ejercen unos efectos quimiotácticos que inducen el reclutamiento de los leucocitos en la piel. Están involucradas asimismo en la regulación de la homeostasis, de la mitogénesis y de la diferenciación epidérmicas y modulan la función de barrera de la piel. Además, las serina-proteasas contribuyen a la fisiopatología de enfermedades cutáneas relacionadas con la inflamación, la defensa del hospedante, la cancerogénesis, la fibrosis y la estimulación nerviosa.

45 Las propiedades fisiológicas y fisiopatológicas cutáneas de las serina-proteasas estarían en parte relacionadas con los receptores PAR. De hecho, los receptores PAR-2 están sobreexpresados en la epidermis, la dermis y los vasos

de las enfermedades inflamatorias de la piel tales como la dermatitis atópica, el liquen plano y la psoriasis (Steinhoff *et al.*, 1999). Los receptores PAR2 desempeñarían un papel en el desarrollo del prurito en pacientes que padecen dermatitis atópica (Steinhoff *et al.*, 2003).

5 La activación de PAR-2 por una proteasa de tipo tripsina induce la producción de IL-8 a partir de queratinocitos (HaCaT) (Hou *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha demostrado que la IL-8, quimiocina quimioattractiva para los leucocitos, permitiría la infiltración de neutrófilos en la epidermis de pacientes que padecen psoriasis vulgaris (Iwakiri *et al.*, 2004).

10 La señalización intracelular del receptor PAR-2 es subtendida en parte por una movilización de calcio intra y extracelular.

Por lo tanto, en el marco de la presente invención, se ha propuesto evaluar la actividad anti PAR-2 de los derivados hidroxiácidos de fórmula I, en el influjo de calcio intracelular inducido después de la estimulación específica por unos receptores PAR-2 por tripsina presentes en los queratinocitos humanos procedentes de una línea (HaCaT).

15 Esta técnica se basa en la utilización de una sonda fluorescente esterificada por un grupo AM, que facilita su penetración por difusión pasiva en la célula. La sonda utilizada es el Fluo-4/AM. Solamente la forma desesterificada y relacionada con los iones de calcio es excitable en fluorescencia (a 485 nm) y emite a 535 nm.

20 Porcentaje de inhibición de flujo cálcico inducido por la tripsina

		% Estimulación	Desviación típica	% Inhibición
Sin sonda		3,82	0,79	-
Tripsina 10nM		13,67	3,14	-
STI 1 µM		8,39	2,85	54
R = R <sub>n</sub> = H R <sub>1</sub> = F n = 13	0,1 µg/ml	13,78	0,82	-1
	0,3 µg/ml	13,06	1,47	6
	1 µg/ml	12,74	1,25	9
	3 µg/ml	12,97	0,92	7
	10 µg/ml	9,55	1,96	42
R = R <sub>n</sub> = R <sub>1</sub> = H n=10	10 µg/ml	15,33	3,00	-17
	30 µg/ml	14,10	3,42	-4
	100 µg/ml	9,84	3,26	39
R = R <sub>n</sub> = R <sub>1</sub> = H n = 14	10 µg/ml	14,68	2,56	-10
	30 µg/ml	12,90	3,58	8
	100 µg/ml	11,37	2,62	23

25 Estimulación por la tripsina

En los queratinocitos procedentes de una línea (HaCaT):

Los derivados hidroxiácidos de fórmula general (I), mencionados en la tabla anterior tienen una actividad en la inhibición del flujo cálcico inducido por la tripsina, a una concentración de 10 µg/ml para el primero, y a una concentración de 100 µg/ml para los dos compuestos siguientes.

*In vitro*, a escala celular, la estimulación específica de los receptores PAR-2 por la tripsina conduce a una movilización de calcio intra y extracelular detectada con la ayuda de la sonda fluorescente.

35 En las condiciones experimentales y a las concentraciones ensayadas, los compuestos de fórmula general (I) mencionados en la tabla anterior modulan de manera significativa la actividad anti PAR-2.

Efecto de los derivados de hidroxiácidos grasos en la síntesis de melanina *in vitro*

40 Los melanocitos son unas células en forma de estrella, presentes en minoría en la capa basal de la epidermis. Su función principal es asegurar la melanogénesis, proceso mediante el cual la melanina se sintetiza en unos organelos especializados, los melanosomas, y después es transportada y distribuida a los queratinocitos cercanos a través de sus prolongaciones dendríticas. Este contacto con los queratinocitos permite la pigmentación cutánea, mecanismo de protección de la epidermis contra los efectos mutagénicos de los rayos ultravioletas. Cada melanocito está en relación con aproximadamente treinta y seis queratinocitos, formando así una "unidad epidérmica de melanización".

45 La melanogénesis consiste en una serie de reacciones enzimáticas y espontáneas, cuyo precursor es la tirosina. Tres enzimas principales participan en este proceso: la tirosinasa, y las proteínas 1 y 2 (TRP1 y 2) relacionadas con tirosinasa (1). La tirosinasa cataliza la transformación de la tirosina en dopaquinona. A partir de esto, son posibles entonces dos vías de síntesis: la eumelanogénesis y la feomelanogénesis. La conversión de dopaquinona en

50

eumelanina se realiza mediante una serie de reacciones sucesivas de oxidaciones que hacen intervenir a TRP-1 y TRP-2. La eumelanina corresponde a un pigmento marrón negro, con bajo contenido de azufre, y asegura el poder fotoprotector. En la feomelanogénesis, unas moléculas con alto contenido de azufre se incorporan a la dopaquinona para dar la feomelanina, de color amarillo-anaranjado, presente en la piel de los sujetos pelirrojos.

El estímulo fisiológico de la síntesis de melanina es el sol, lo cual provoca un aumento del número de los melanocitos, una neosíntesis de melanina, y unas modificaciones morfológicas de los melanocitos, que asocia un incremento de su dendricidad a un aumento de la transferencia de los melanosomas a los queratinocitos. A nivel molecular, la exposición al sol estimula la síntesis y la secreción de la Alpha Melanocyte Stimulating Hormone. La  $\alpha$ -MSH aumenta la concentración intramelanocitaria en AMPc, que activa el factor de transcripción, Mitf, que estimula a su vez la actividad transcripcional de los genes que codifican para la tirosinasa, TRP-1 y TRP-2.

Algunas moléculas exógenas son conocidas asimismo por regular negativamente la melanogénesis. La hidroquinona inhibe la síntesis de melanina al presentarse como sustrato de la tirosinasa con el fin de desviar su actividad.

Se ha analizado el efecto modulador de los derivados de hidroxiácidos grasos insaturados en la melanogénesis. Para ello, se ha realizado una medición de la síntesis de melanina mediante dosificación colorimétrica en una línea celular de melanomas murinos: línea B16-F10.

El efecto de los productos se ha investigado en una situación basal y después de la estimulación de la melanogénesis por  $\alpha$ -MSH para determinar el poder despigmentante.

#### Dosificación de la melanina

La tasa de melanina extracelular e intracelular se mide entonces mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm según el protocolo (Anob *et al.*, 1999). La cantidad de pigmento se determina gracias a una gama patrón de melanina y el análisis en el programa Microwin (Berthold Biotechnologies). Una dosificación de proteínas totales se efectúa para las muestras de melanina intracelular mediante el método BCA-Copper a 540 nm. La gama patrón se realiza con una proteína estándar, BSA (Serum Albumine Bovine).

#### Resultados

En situación basal, la alfa MSH a 1  $\mu$ M aumenta en un 100% la producción de melanina con respecto a las células testigo.

Este aumento de melanina está contrarrestado por los agentes despigmentantes tales como la hidroquinona a 1  $\mu$ g/ml o la vitamina C a 40  $\mu$ g/ml, que inhiben en 60% la acción de la alfa MSH.

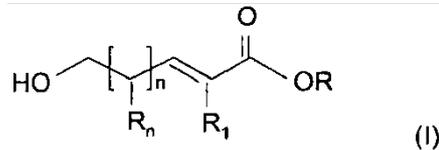
En situación basal a 30  $\mu$ g/ml:

- El compuesto de fórmula general I siendo  $n=10$ ,  $R = R_n = H$ ,  $R_1 = F$  inhibe en 30 a 45% la síntesis de melanina mientras que en presencia de alfa MSH, este mismo compuesto a 30  $\mu$ g/ml provoca una inhibición de 45 a 60%.
- El compuesto de fórmula general I siendo  $n = 10$ ,  $R = R_1 = R_n = H$  a 30  $\mu$ g/ml presenta una actividad más baja que el compuesto anterior, 15% de inhibición en situación basal mientras que en presencia de alfa MSH el potencial de inhibición de este compuesto respecto a esta sustancia melanotrópica, es similar al del compuesto anterior, es decir 45 a 60%.

A 10  $\mu$ g/ml, la actividad inhibitoria de estos 2 ácidos en la inducción de la melanogénesis por alfa MSH es del orden de 35%.

REIVINDICACIONES

1. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados que responden a la fórmula general (I):



en la que

- $R_n$  representan independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br o  $\text{CF}_3$ ,
- R representa H, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

con la condición, sin embargo, de que cuando  $n \neq 10$ , uno por lo menos de los radicales  $R_1$  y  $R_n$  no represente el hidrógeno.

2. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $R_1$  representa F, Cl, Br o  $\text{CF}_3$ ,

3. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $6 \leq n \leq 14$

4. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $R_1$  representa F, Cl, Br o  $\text{CF}_3$ ;
- $R_n = \text{H}$ .

5. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $R_1$  representa F, Cl, Br o  $\text{CF}_3$ , y
- por lo menos uno de los radicales  $R_n$  representa un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor.

6. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según las reivindicaciones 1 y 2, en la que:

- $R_1 = \text{F}$ ,
- $R_n = \text{H}$ .

7. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 6, en la que:

- $R_1 = \text{F}$ ,
- $R_n = \text{H}$ ,
- $n = 13$ .

8. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 2, en la que:

- $R_1 = \text{F}$ ,
- $R_n = \text{H}$ ,
- $n = 6$ .

9. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $R = R_1 = \text{H}$ ,

- uno solo de los radicales  $R_n$  representa un grupo metilo, siendo los otros unos átomos de hidrógeno, y
- $n = 4$ .

10. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 1, en la que:

- $R_1 = R_n = H$  y
- $n = 10$ .

11. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 2, en la que:

- $R_1 = F$ ,
- $R_n = H$ , y
- $n = 10$ .

12. Derivados de hidroxiácidos grasos insaturados de fórmula general (I) según la reivindicación 2, en la que:

- $R_1 = F$ ,
- $R_n = H$ , y
- $n = 8$ .

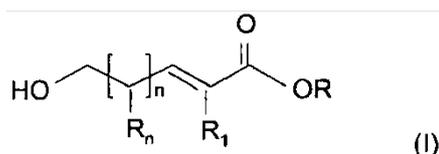
13. Composiciones dermocosmetológicas que comprenden un derivado de hidroxiácido graso insaturado de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 12, asociado a un excipiente dermatológicamente aceptable.

14. Utilización de un derivado de hidroxiácido graso insaturado de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de una composición dermocosmetológica destinada al tratamiento de los trastornos de la pigmentación.

15. Utilización de un derivado de hidroxiácido graso insaturado de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de una composición dermocosmetológica destinada al tratamiento del envejecimiento cutáneo y de las manchas de vejez blancas o marrones.

16. Utilización de un derivado de hidroxiácido graso insaturado de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de una composición dermocosmetológica destinada a provocar un aclaramiento de la piel.

17. Utilización de un derivado de hidroxiácido graso insaturado que responde a la fórmula general (I):

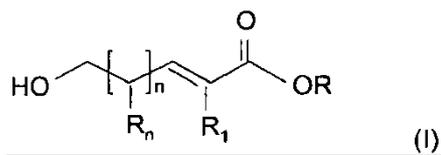


en la que

- $R_n$  representan independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br o  $\text{CF}_3$ ,
- R representa H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor, y
- $3 \leq n \leq 14$ .

para la fabricación de una composición dermatocosmetológica anti-radicalaria, antiinflamatoria, antipruriginosa y/o destinada a tratar trastornos de la queratinización y/o a mejorar la cicatrización.

18. Utilización de un derivado de hidroxiácido graso insaturado que responde a la fórmula general (I):



en la que

- 5
- $R_n$  representan independientemente unos de otros H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor,
- 10
- $R_1$  representa H, F, Cl, Br o  $CF_3$ ,
  - R representa H o un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y que está eventualmente sustituido por un átomo de halógeno, en particular de flúor, y
  - $3 \leq n \leq 14$ .
- 15

para la fabricación de una composición dermatocosmetológica destinada al tratamiento de la psoriasis, del prurito o de la dermatitis atópica.