

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 157**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09778036 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2328545**

54 Título: **Uso de glucosilglicerol**

30 Prioridad:

22.08.2008 DE 102008039231

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

16.11.2015

73 Titular/es:

**BITOP AG (100.0%)
Stockumer Strasse 28
58453 Witten, DE**

72 Inventor/es:

**KLEIN, JULIA y
STUMM, GERHARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 551 157 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

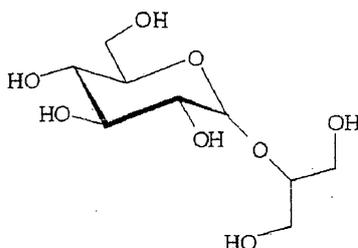
Uso de glucosilglicerol

La invención se refiere al uso de glucosilglicerol en el contexto de preparaciones cosméticas o dermatológicas.

5 En el documento DE 195 40 749 A1 se describe el uso de glicosilglicéridos en preparaciones cosméticas y dermatológicas. Las sustancias de este tipo pueden usarse como los denominados agentes humectantes, es decir como sustancias hidratantes. A este respecto se prefiere especialmente el uso de 2-O-β-D-glucosilglicerol.

10 El glucosilglicerol, de manera más exacta 2-O-α-D-glucosilglicerol, se conoce como sustancia natural y lo sintetizan por ejemplo cianobacterias, para las que éste sirve como sustancia osmoprotectora. De esta manera permite a las cianobacterias el crecimiento en medios que contienen sal con una concentración de hasta 1,5 M de NaCl. La molécula se acumula en altas concentraciones en el citoplasma para reducir de esta manera la presión osmótica existente debido a las altas concentraciones de sal en el entorno y proteger a la célula frente a la pérdida de agua. Un ejemplo es la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803.

15 Además, la molécula también la sintetizan plantas del género *Myrothamnus*. En el caso de estas plantas se trata de plantas poiquilohídricas. *Myrothamnus flabellifolia* es un pequeño arbusto del Sudáfrica que crece en losas de piedra y pasa a ser de hasta 60 cm de alto. La planta sobrevive seca a los períodos de sequía que se producen en Sudáfrica que duran varios meses. Sin embargo tan pronto como llueve, la planta se vuelve verde de nuevo en el intervalo de pocas horas, de lo que resulta también el calificativo "planta de resurrección". La estructura de 2-O-α-D-glucosilglicerol es tal como sigue:

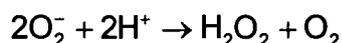


20 Por el documento JP 2004-331578 A se conoce el uso de glucosilgliceroles en productos para el cuidado de la piel para la lucha contra el envejecimiento de la piel.

25 Sorprendentemente ha resultado ahora que los glucosilgliceroles pueden aumentar la expresión de enzimas protectoras de células, lo que pudo detectarse en ensayos con células de la piel humanas. Por tanto, la invención se refiere al uso de glucosilglicerol para la preparación de un producto para la protección de la piel y/o mucosa humana frente a compuestos de oxígeno reactivos, radicales libres, productos químicos, toxinas, alérgenos, sustancias desnaturizantes, sustancias que se unen al ADN, sustancias que dañan a las proteínas, sustancias que desactivan proteínas o polvo en suspensión mediante aumento de la expresión de enzimas protectoras de células.

30 La acción de glucosilglicerol pudo detectarse por medio de ensayos con queratinocitos y fibroblastos. En los ensayos se trataron correspondientes cultivos celulares con una solución de glucosilglicerol y se cuantificaron los ARNm transcritos. Para ello se extrajo en primer lugar ARNm para generar con ayuda de una transcriptasa inversa una diana etiquetada con ³³P. A continuación se aplicaron estas dianas sobre un chip de ADNc y se midió la radiactividad por medio de obtención de imágenes con fósforo. El chip de ADNc contenía una matriz de los ADNc de distintas proteínas.

35 A este respecto ha resultado que la expresión de enzimas protectoras de células se regula por incremento. Por enzimas protectoras de células se entiende en particular aquellas enzimas que pueden degradar compuestos de oxígeno reactivos. Un ejemplo de esto es la superóxido dismutasa, en caso de la cual se trata de una enzima que protege células eucariotas frente a iones superoxídicos reactivos. A este respecto, la forma oxidada de la enzima reacciona con un anión superoxídico con formación de oxígeno y la forma reducida de la enzima. Esta forma reacciona a su vez con un segundo anión superoxídico con formación de peróxido de hidrógeno, formándose de nuevo la forma oxidada de la enzima. En total resulta con ello la siguiente ecuación:



Otra enzima importante en este contexto es la catalasa. Ésta desproporciona peróxido de hidrógeno para dar oxígeno y agua. La catalasa reduce de esta manera, al igual que la superóxido dismutasa, el estrés oxidativo de las células de la piel.

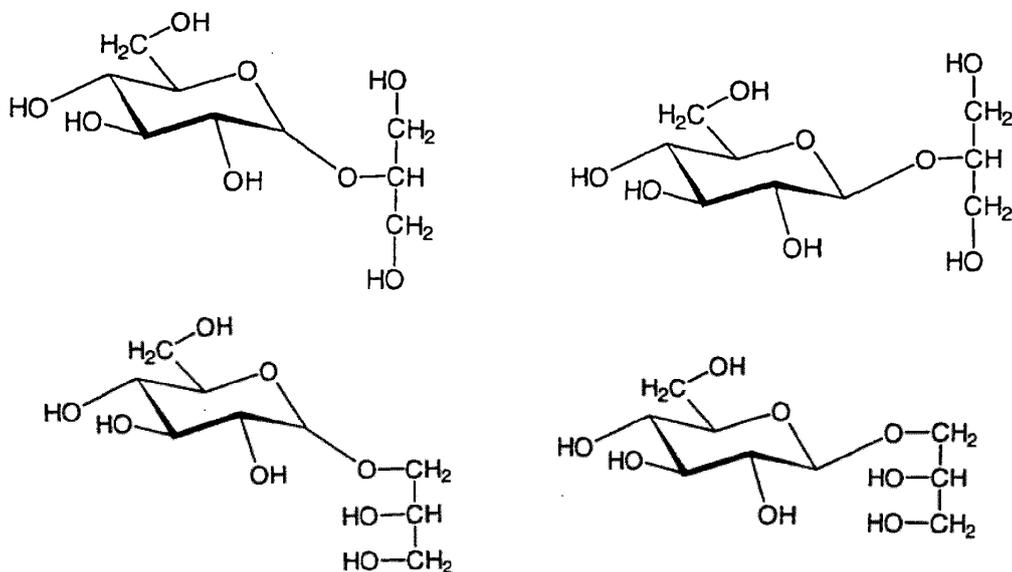
45 También la glutatión peroxidasa es importante en la defensa celular contra las consecuencias del estrés oxidativo. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción dependiente de glutatión de peróxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno.

Las enzimas protectoras de células mencionadas que pueden degradar compuestos de oxígeno reactivos, en particular el anión superoxídico, radicales de hidroxilo y peróxidos, desempeñan un importante papel en la protección frente al estrés oxidativo. La piel/mucosa está expuesta como capa límite y superficie del cuerpo humano a una pluralidad de factores de estrés externos. En el caso de la piel humana se trata de un órgano que con distintos tipos de células especializados (los queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y otros) protegen el organismo frente a influencias externas. Según esto ha de diferenciarse entre influencias físicas, químicas y biológicas sobre la piel humana. A las influencias físicas pueden pertenecer influencias térmicas y mecánicas así como la acción de radiación, por ejemplo radiación UV, VIS y IR. Entre las influencias químicas pueden mencionarse en particular la acción de productos químicos, toxinas, radicales libres, alérgenos, sustancias desnaturalizantes, sustancias que se unen a ADN y sustancias que dañan a las proteínas o que inactivan a proteínas. También el polvo en suspensión puede desplegar acciones dañinas. Las influencias biológicas externas comprenden la acción de organismos foráneos y sus productos metabólicos. También el calor y el frío pueden atacar a la piel humana. El uso de acuerdo con la invención de glucosilglicerol puede proteger la piel frente a influencias de este tipo.

La estimulación y la activación de enzimas protectoras de células pudo mostrarse en particular por medio de las superóxido dismutasas SOD-1 y SOD-2. La expresión de la SOD-1 pudo aumentarse en el caso de queratinocitos en el intervalo de 24 horas con el uso de solución de glucosilglicerol al 0,5 % en 4,7 veces, en el intervalo de 96 horas en 19,6 veces. En el caso de la SOD-2 se obtuvo como resultado en la prueba con fibroblastos y el uso de una solución de glucosilglicerol al 1 % en el intervalo de 24 horas un aumento en 25,4 veces, en el intervalo de 96 horas en 34,4 veces.

Además de enzimas que degradan compuestos de oxígeno reactivos pueden regularse por incremento también otras enzimas protectoras de células, por ejemplo enzimas reparadoras de ADN tales como ligasas. Las chaperonas representan otra clase que ayudan a las proteínas a plegarse correctamente.

Preferentemente, en el caso del glucosilglicerol se trata del 2-O- α -D-glucosilglicerol que se produce de modo natural, tal como lo acumulan por ejemplo cianobacterias del género *Synechocystis*. Pueden esperarse acciones correspondientes sin embargo también con enlace β -glucosídico de la glucosa con la molécula de glicerol o con enlace de la glucosa con el glicerol en posición 1. En particular son concebibles, por consiguiente, los siguientes glucosilgliceroles, estando representados en el presente documento respectivamente sólo las moléculas en la configuración D:



El glucosilglicerol puede usarse para los fines descritos en preparaciones cosméticas, dermatológicas y farmacéuticas. La concentración puede encontrarse por ejemplo en un intervalo del 0,001 % en peso al 10 % en peso, en particular del 0,01 % en peso al 6 % en peso, con respecto al peso total de la preparación.

El glucosilglicerol se encuentra en particular en solución acuosa. Son concebibles sin embargo básicamente también emulsiones y microemulsiones del tipo agua en aceite (W/O) o del tipo aceite en agua (O/W).

Es posible el uso de coadyuvantes cosméticos habituales, por ejemplo vehículos, agentes conservantes, bactericidas, perfumes, solubilizadores, vitaminas, estabilizadores, sustancias para impedir la formación de espuma, agentes espesantes, colorantes, sustancias tensioactivas, emulsionantes, sustancias que mantienen la humedad, entre otras cosas.

Las formulaciones cosméticas o dermatológicas que contienen glucosilglicerol están previstas para la administración externa. Como forma de administración se menciona por ejemplo: soluciones, suspensiones, emulsiones, pastas, pomadas, geles, cremas, lociones, polvo, jabones, preparados de limpieza que contienen tensioactivo, aceites, pulverizaciones y barras de labio.

- 5 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener los vehículos habituales, por ejemplo grasas animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de estas sustancias.

Los polvos y las pulverizaciones pueden contener de manera adicional a los vehículos habituales, los agentes expansores habituales, por ejemplo propano/butano o dimetiléter.

- 10 Las soluciones y emulsiones pueden contener vehículos habituales, tales como disolventes, solubilizadores y emulsionantes o aceites.

Las suspensiones contienen vehículos adicionales típicos tales como agua o etanol.

- 15 La preparación del glucosilglicerol puede realizarse de acuerdo con un procedimiento, tal como se ha descrito en el documento WO 2008/034158 A2. En este caso se deja actuar una sacarosa fosforilasa sobre una mezcla que contiene un donador de glucosilo y glicerol como aceptor de glucosilo. Preferentemente se trata en el caso del donador de glucosilo de sacarosa.

El aumento de la expresión de enzimas protectoras de células pudo mostrarse tal como sigue:

- 20 los estudios se realizaron por medio de queratinocitos epidérmicos (NHEK, *normal human epidermal keratinocytes*) y fibroblastos dérmicos (NHDF, *normal human dermal fibroblasts*). Éstos se tratan en el caso de los queratinocitos con una solución acuosa de glucosilglicerol al 0,5 % (p/p), en el caso de fibroblastos con una solución acuosa de glucosilglicerol al 1 % (p/p).

Condiciones de cultivo:

37 °C, 5 % de CO₂

Medio de cultivo:

- 25 Queratinocitos: queratinocito-SFM (Invitrogen 17005-034) mezclado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) 0,25 ng/ml, extracto de hipófisis (PE) 25 µg/ml (Invitrogen 3700015), gentamicina 25 µm/ml (Sigma G1397)

Fibroblastos: DMEM (Invitrogen 21969035), mezclado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen 25030024), penicilina 50 UI/ml/estreptomycin 50 µg/ml (Invitrogen 15070063), suero de ternero fetal 10 % (FCS, Invitrogen 10270098)

- 30 El cultivo se realizó durante 24 y 96 horas. Al final del tiempo de incubación se lavaron las células con solución de PBS (Invitrogen 14190094).

La extracción del ARNm de cada cultivo se realizó con TriReagent de acuerdo con un protocolo estándar. Los correspondientes ADNc con dianas etiquetadas con ³³P se prepararon mediante transcripción inversa del ARNm usando [α -³³P]-dATP y oligodT.

- 35 Las dianas de ADNc etiquetadas se hibridaron con sondas de ADNc específicas que estaban fijadas de manera covalente sobre minichips. Tras lavado intensivo se determinó la cantidad relativa de las dianas hibridadas por medio de obtención de imágenes con fósforo. Estos análisis se realizaron mediante medición de la radiactividad con ayuda de un aparato de obtención de imágenes con fósforo "Cyclone" (Packard Instruments; exposición de 72 horas) usando ImageQuant TL-Software (Amersham Biosciences).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- 40 Regulación por incremento de la SOD-1 citosólica con queratinocitos

24 h:

control: 18,2

tratado con solución de glucosilglicerol: 85

96 h:

- 45 control: 9,3

tratado con solución de glucosilglicerol: 182

Regulación por incremento de la SOD-2 con fibroblastos

24 h:

control: 16,5

tratado con solución de glucosilglicerol: 419

5

96 h:

control: 9,1

tratado con solución de glucosilglicerol: 313

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de glucosilglicerol para la preparación de un producto para la protección de la piel y/o la mucosa humanas frente a compuestos de oxígeno reactivos, radicales libres, productos químicos, toxinas, alérgenos, sustancias desnaturizantes, sustancias que se unen al ADN, sustancias que dañan a las proteínas, sustancias que desactivan proteínas o polvo en suspensión mediante aumento de la expresión de enzimas protectoras de células.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el glucosilglicerol es 2-O- α -D-glucosilglicerol.
3. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la enzima protectora de células es una enzima que degrada los compuestos de oxígeno reactivos.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado porque** la enzima es una superóxido dismutasa, una catalasa o una glutatión peroxidasa.
5. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la superóxido dismutasa es la SOD-1 o la SOD-2.
6. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la enzima protectora de células es una enzima reparadora de ADN, en particular una ligasa.
7. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la enzima protectora de células es una chaperona.
- 15 8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el glucosilglicerol se encuentra en solución acuosa.
9. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la concentración del glucosilglicerol asciende a del 0,001 % en peso al 10 % en peso, en particular del 0,01 % en peso al 6 % en peso.
- 20 10. Glucosilglicerol para la protección de la piel y/o la mucosa humanas frente a compuestos de oxígeno reactivos, radicales libres, productos químicos, toxinas, alérgenos, sustancias desnaturizantes, sustancias que se unen al ADN, sustancias que dañan a las proteínas, sustancias que desactivan proteínas o polvo en suspensión mediante aumento de la expresión de enzimas protectoras de células.
11. Glucosilglicerol según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el glucosilglicerol es 2-O- α -D-glucosilglicerol.
- 25 12. Glucosilglicerol según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** la enzima protectora de células es una enzima que degrada los compuestos de oxígeno reactivos.
13. Glucosilglicerol según la reivindicación 12, **caracterizado porque** la enzima es una superóxido dismutasa, una catalasa o una glutatión peroxidasa.
14. Glucosilglicerol según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la superóxido dismutasa es la SOD-1 o la SOD-2.
- 30 15. Glucosilglicerol según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** la enzima protectora de células es una enzima reparadora de ADN, en particular una ligasa o una chaperona.