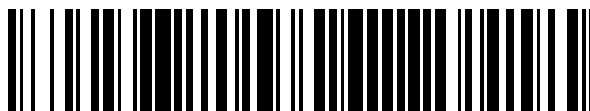


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 477**

51 Int. Cl.:

A61K 8/41 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 31/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2006 E 06251018 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 1698325**

54 Título: **Las composiciones que contienen aminas y uso de las mismas**

30 Prioridad:

25.02.2005 US 66362

09.09.2005 US 223032

20.12.2005 US 312984

10.02.2006 US 351865

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

27.01.2017

73 Titular/es:

JOHNSON & JOHNSON CONSUMER INC.

(100.0%)

199 Grandview Road

Skillman, NJ 08558, US

72 Inventor/es:

SOUTHALL, MICHAEL D.;

MARTIN, KATHARINE;

LUKENBACH, ELVIN R.;

BORDOLOI, BINOY K.;

KIZOULIS, MENAS;

PAPPAS, APOSTOLOS;

SALERNO, CATHERINE STUBLER;

RUVOLO, EDUARDO;

MITCHELL, PHYLLIS;

TIERNEY, NEENA;

KING, DEANNA L.;

LIN, CONNIE BAOZHEN y

SCARPA, RICHARD CHARLES

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 598 477 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).

Las composiciones que contienen aminas y uso de las mismas**Descripción**

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0001]** N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina se ha descrito para su uso como un agente catalítico. Por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT NO WO/0170132 describe el uso de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) diamina de etileno como agente catalítico para polimerizar microesferas antes de la inyección en la piel. La inyección de las microesferas en la piel actúa para aumentar las deficiencias del contorno de la piel tales como arrugas. El uso de aminas terciarias, tales como N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina, como agentes quelantes para evitar la reducción del ácido salicílico se describe en la Patente de EE.UU. NO 4.822.604.

15 **[0002]** La aplicación de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina en los productos cosméticos ha sido descrita en la Patente Europea NO 0023978 por lo que el desarrollo de nitrosaminas cancerígenas en los productos cosméticos y de tocador que contienen trietanolamina se evita mediante el uso de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilenediamina para neutralizar formulaciones ácidas. La patente de EE.UU. NO 4.749.507 describe el uso de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilenediamina, para la eliminación de tintes para el cabello y la piel y en la patente de Estados Unidos NO 3.916.008 describe el uso de ésteres de diamina de etileno son útiles como agentes hipocolesterolemicos en animales y en el hombre. Bhide MV et al., Immunopharmacol. 1985;7(3):303-312 informó de que el tratamiento de los macrófagos en cultivo con N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilenediamina dieron como resultado un aumento de la activación de macrófagos, una respuesta pro-inflamatoria.

25 **[0003]** La presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) diamina de etileno es tópicamente eficaz para el tratamiento de los signos del envejecimiento. Además, también se descubrió inesperadamente que tal compuesto de amina también tiene la capacidad de potenciar la actividad de otros agentes cosméticamente activos.

RESÚMEN DE LA INVENCION

30 **[0004]** En un aspecto, la presente invención presenta un método de (i) tratamiento de al menos un signo de envejecimiento en la piel seleccionada del grupo que consiste en la mejora de la elasticidad de dicha piel, la mejora de la firmeza de dicha piel, y la reducción de la aparición de arrugas o la celulitis en la piel mediante la administración a la piel en necesidad de dicho tratamiento una composición que comprende N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina (THPED).

35 **[0005]** Se describe en el presente documento un producto que contiene (a) una composición que incluye al menos un compuesto de la fórmula I o fórmula II descrito a continuación e (b) instrucciones que dirigen al usuario aplicar dicha composición a la piel con el fin de (i) tratar al menos un signo de envejecimiento en la piel seleccionada del grupo que consiste en la mejora de la elasticidad de dicha piel, la mejora de la firmeza de dicha piel, y reducir la aparición de arrugas en la piel, (ii) tratar la inflamación, tales como la inflamación no de acné de la piel, y/o (iii) la reducción de la aparición de la decoloración o la hinchazón alrededor de los ojos, (iv) tratar el acné, (v) reducir la aparición de grasa o poros en la piel, y/o (vi) el oscurecimiento de la piel.

40 **[0006]** También se describe un método de promoción de una composición que incluye al menos un compuesto de la fórmula I o de fórmula II descritos a continuación, en el que dicho método comprende dirige al usuario aplicar dicha composición a la piel con el fin de (i) tratar al menos un signo de envejecimiento en la piel seleccionada del grupo que consiste en la mejora de la elasticidad de dicha piel, la mejora de la firmeza de dicha piel, y reducir la aparición de arrugas en la piel, (ii) tratar la inflamación, tales como la inflamación no de acné de la piel, y/o (iii) la reducción de la aparición de la decoloración o la hinchazón alrededor de los ojos, (iv) tratar el acné, (v) la reducción de la aparición de grasa o poros en la piel, y/o (vi) el oscurecimiento de la piel.

45 **[0007]** También se describe un método para potenciar la actividad de un agente cosméticamente activo mediante la administración a la piel en necesidad de tratamiento de tal agente activo una composición que comprende al menos un compuesto de la fórmula I o fórmula II que se describe a continuación y tal agente activo.

50 **[0008]** También se describe una composición que comprende: (a) al menos un compuesto de la fórmula I o fórmula II descrito a continuación y (b) al menos un mECISbro seleccionado del grupo que consiste de un extracto de matricaria, un extracto de soja, un agente antiinflamatorio, retinol, un tocoferol, un protector solar, un extracto de hongos, o una enzima tal como una proteasa.

55 **[0009]** Características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0010] Se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción en el presente documento, utilizar la presente invención en su extensión más completa. Las siguientes realizaciones específicas se deben interpretar como meramente ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno.

[0011] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. A menos que se indique lo contrario, un porcentaje se refiere a un porcentaje en peso (es decir, % (en peso)).

Definiciones

[0012] Lo que se entiende por "tratar o tratamiento de una señal de envejecimiento en la piel" es la reducción de la aparición de arrugas en la piel y/o mejorar la firmeza o elasticidad de la piel, incluyendo pero no limitado al tratamiento de la piel flácida, laxa y suelta o estiramiento de la piel.

[0013] Lo que se entiende por "potenciar la actividad de un agente cosméticamente activo" es la promoción, la mejora o el mantenimiento de la actividad de otros agentes cosméticamente activos, tales como agentes o retinoides activos anti-inflamatorios, tales como retinol y ácido retinoico.

[0014] Lo que se entiende por "tratamiento del acné" es la reducción o la prevención del acné o rosácea. En una realización, la composición utilizada para tratar el acné no contiene ácido retinoico, aceite de cártamo (tales como aceite de cártamo que contiene ácido linoleico), o ácido linoleico.

[0015] Lo que se entiende por "tratamiento de la inflamación de la piel" la reducción o la prevención del enrojecimiento o inflamación de la piel. Lo que se entiende por "tratamiento de la inflamación no del acné de la piel" es la reducción o la prevención del enrojecimiento o inflamación de la piel no causadas por el acné. En una realización, la composición utilizada para tratar la inflamación no contiene ácido retinoico, aceite de cártamo, o ácido linoleico.

[0016] Lo que se entiende por un "tocoferol" es alfa-tocoferol, o un isómero del mismo (por ejemplo, beta-tocoferol, delta-tocoferol o gamma-tocoferol), o una sal o éster del mismo (tal como un acetato de alfa-tocoferol, succinato, o palmitato).

[0017] Lo que se entiende por un "protector solar" es un ingrediente activo que absorbe, refleja o dispersa la radiación en la longitud de onda UV de 290 a 400 nm. Ejemplos de filtros solares aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos incluyen avobenzona, cinoxato, dioxibenzona, ensulizol, homosalato, antranilato de mentilo, octocrileno, dimentilo de octilo, metoxicinamato de octilo, salicilato de octilo, oxibenzona, sulisobenzona, dióxido de titanio, salicilato de trolamina, y óxido de zinc. Ejemplos de filtros solares adicionales aprobadas en la Unión Europea incluyen 3-bencilideno alcanfor, ácido sulfónico de alcanfor de bencilideno, bisimidacilato, alcanfor frenzalconio metosulfato, benzoato de hexil de hidroxibenzoil de dietilamino, triazona de butamido de dietitexilo, malonato dimeticodietilbenzal, trisiloxano drometrizol, ecamsula, ensulizol, isoamilo p-metoxicinamato, 4-metilbencilideno alcanfor, PEG-25 PABA, poliacrilamidometil bencilideno alcanfor, tinosorb-M, y tinosorb-S.

[0018] Lo que se entiende por un "agente anti-inflamatorio" es un agente que tiene y IC50 de menos de o igual a 100 µg/ml de interleucina-2, interferón-gamma, tejido necrosis factor alfa, y/o factor estimulante de macrófagos de granulocito en el ensayo se establece a continuación en el ejemplo 6. Los ejemplos de agentes anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a agentes no esteroides anti-inflamatorios (por ejemplo, ibuprofeno, aspirina, naproxeno, y acetaminofeno), anestésicos (por ejemplo, benzocaína, lidocaína y pramoxina), corticosteroides (por ejemplo, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, propionato de clobetasol, diacetato de diflorasona, propionato de halobetasol, amcinonida, desoximetasona, fluocinonida, fluoruro acetónido cinolona, halcinonida, acetato de triamcinolona, hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, hidrocortisona butirato, dipropionate aclometasona, flurandrenolida, furoato de mometasona, acetato de metilprednisolona), vitamina D (por ejemplo, compuestos calcipotrieno), y diversos extractos de plantas (por ejemplo, la matricaria y extractos de soja).

[0019] Lo que se entiende por un "producto" es un producto terminado en forma envasada. En una realización, el paquete es un contenedor tal como un plástico, metal o tubo de vidrio o frasco que contiene la composición. El producto puede contener además embalaje adicional, tal como una caja de cartón de plástico o para el almacenamiento de tal recipiente. En una realización, el producto contiene instrucciones que dirigen al usuario cómo administrar la composición para (i) tratar al menos un signo de envejecimiento en la piel seleccionado del grupo que consiste en la mejora de la elasticidad de dicha piel, la mejora de la firmeza de dicha piel, y reducir la aparición de arrugas en la piel, (ii) tratar la inflamación no acné de la piel, y/o (iii) la decoloración o la hinchazón alrededor de los ojos. Tales instrucciones pueden estar impresas en el prospecto del envase, la etiqueta o en cualquier envase adicional.

[0020] Qué se entiende por "contraer una célula de la piel" es la reducción de la longitud de al menos una dimensión de la célula de la piel. Ejemplos de células de la piel incluyen, pero no se limitan a los queratinocitos.

5 **[0021]** Lo que se entiende por "promover" es la promoción, publicidad o comercialización. Los ejemplos de la promoción incluyen, pero no se limitan a declaraciones escritas, visuales, verbales hechas en el producto o en las tiendas, revistas, prensa, radio, televisión, internet, y similares.

10 **[0022]** Para la promoción de la contracción de las células de la piel, los ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no se limitan a, "contrae células de piel", "contrae queratinocitos," "encoge células de la piel," y "encoge queratinocitos". Ejemplos de tales estados visuales incluyen imágenes digitales, fotos, dibujos o películas de células de la piel que representan células contraídas y/o la contracción de las células (por ejemplo, que muestra una reducción en la longitud de al menos una dimensión de la célula de la piel). En una forma de realización; las células de la piel son de la epidermis superior.

15 **[0023]** Para promover el tratamiento de los signos del envejecimiento, los ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no están limitados a, "la mejora la elasticidad de la piel", "la mejora de las manifestaciones visibles y táctilmente perceptible de la piel", "aumenta la elasticidad o firmeza de la piel," "restaura la elasticidad de la piel", "trata la flacidez o piel laxa", "reafirma la apariencia de la celulitis", "levanta la piel" y "levanta la cara", "reafirma la piel", "reafirma la cara", "piel más joven", "restaura la firmeza de la juventud", "mejora los contornos del rostro ", y "hace que la piel se vea más joven. "

20

[0024] Para promover el tratamiento de la inflamación, ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no están limitados a, "reduce la inflamación", "reduce el enrojecimiento," y "reduce la aparición de la inflamación".

25 **[0025]** Para promover la reducción de la aparición de la decoloración o hinchazón alrededor de los ojos, los ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no están limitados a, "reduce la hinchazón alrededor de los ojos", "reduce la apariencia de las bolsas bajo los ojos," "reduce la apariencia de las ojeras bajo los ojos," y "trata los círculos oscuros bajo los ojos."

30 **[0026]** Para promover el tratamiento del acné, los ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no se limitan a, "trata el acné", "previene el acné", "reduce lesiones de acné, comedones o espinillas", "reduce la aparición de lesiones de acné , comedones o espinillas," "reduce la aparición de brotes de acné y manchas ", "previene, controla o regula la aparición de brotes de acné y manchas", y "reduce los brotes y manchas. "

35 **[0027]** Para la promoción de la reducción en la aparición de grasa en la piel, los ejemplos de tales estados incluyen, pero no se limitan a, "la reducción de la aparición de sebo", "prevención, control o regulación de la producción de sebo," "reducción del sebo", "reducción de la apariencia de la piel grasa/brillante", "la reducción de la apariencia de la piel grasa," y "la reducción del brillo de la piel." En una realización, la composición se aplica a la piel no en necesidad de tratamiento para el acné (es decir, la piel no sufre de acné).

40

[0028] Para la promoción de la reducción en la aparición de poros en la piel, los ejemplos de tales estados incluyen, pero no se limitan a, "la reducción del tamaño de poros", "la minimización de la aparición de poros", "refina la aparición de poros", "reduce la visibilidad o poros" y "cierra la apertura del poro." En una realización, la composición se aplica a la piel no en necesidad de tratamiento para el acné (es decir, la piel no sufre de acné).

45

[0029] Para promover el oscurecimiento de la piel, entre los ejemplos de tales declaraciones incluyen, pero no se limitan a, "se broncea la piel", "oscurece el tono de la piel," y "reduce la apariencia de la superficie vista de la piel", "aumenta o promueve el resplandor de la piel", "aumenta o promueve el resplandor de la piel", "bronces de la piel" y "oscurece la sombra de la piel". En una realización, la composición utilizada para oscurecer la piel no contiene dihidroxiacetona.

50

[0030] Tal como se utiliza aquí, el término "arrugas" incluye una línea muy fina, arrugas finas, arrugas gruesas, celulitis, cicatrices y estrías. Ejemplos de arrugas incluyen, pero no se limitan a, líneas finas alrededor de los ojos (por ejemplo, "patas de gallo"), las arrugas de la frente y mejillas, líneas de fruncir, y líneas de risa en torno a la boca.

55

[0031] Como se usa en el presente documento, "la administración a la piel en necesidad de tal tratamiento" significa contactar (por ejemplo, mediante el uso de las manos o un aplicador tal, pero no limitado a, una toallita, tubo, rodillo, rociado, o parche) el área de la piel en tal necesidad de tratamiento o un área de la piel próxima a la zona de la piel que necesita dicho tratamiento (por ejemplo, se contraiga un área de piel en la proximidad de la zona de la necesidad de tratamiento, apretando de ese modo el área de la piel en la necesidad de tal tratamiento).

60

[0032] Como se usa en el presente documento, "composición" significa una composición adecuada para la administración a la piel.

65

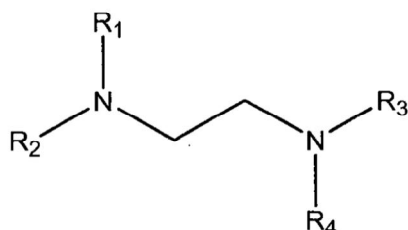
[0033] Como se usa en este documento, "cosméticamente aceptable" significa que los ingredientes que describe el

término son adecuados para su uso en contacto con la piel sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica, y similares.

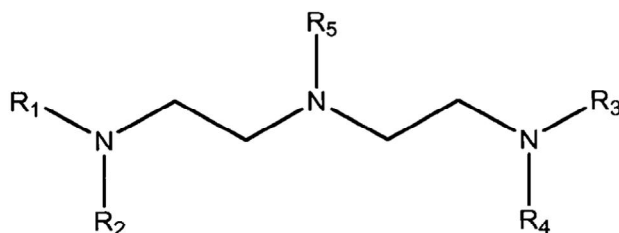
[0034] En la presente memoria, la "cantidad segura y eficaz" significa una cantidad del compuesto, vehículo o de la composición suficiente para inducir una mejora en la elasticidad de los tejidos, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves. La cantidad segura y eficaz de los compuestos o composición variará con el área que se está tratando, la edad, la salud y el tipo de piel del usuario final, la duración y la naturaleza del tratamiento, el compuesto específico o composición empleada, el vehículo aceptable particular cosméticamente utilizado, y factores similares.

Compuestos

[0035] Las composiciones según la invención contienen al menos un compuesto de la fórmula I o fórmula II:



(I)

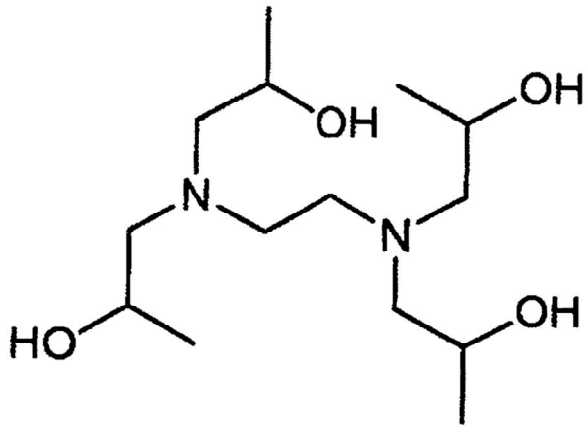


(II)

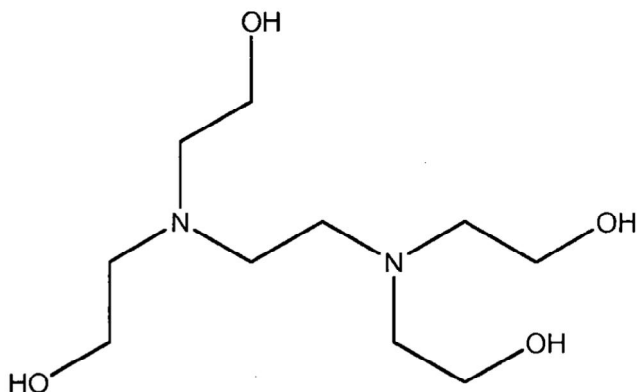
en la que R1, R2, R3, R4, y R5 independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, e hidroxialquilo C₁-C₆; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0036] En una realización, las composiciones descritas en este documento contienen al menos un compuesto de la fórmula I y R1, R2, R3, y R4 se seleccionan de entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₃ y alcohol C₁-C₃. En una realización adicional, al menos uno de R1, R2, R3, y R4 de la fórmula I es un grupo alcohol C₂-C₃ que lleva al menos un grupo hidroxilo.

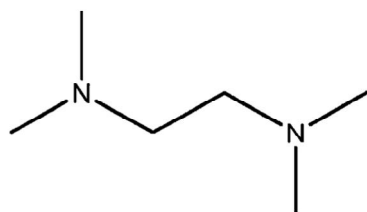
[0037] Ejemplos de compuestos de fórmula I incluyen N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina (THPED), N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxietil) etilendiamina (THEED), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (las estructuras de las cuales se exponen a continuación), los enantiómeros de los mismos, o diastereoisómeros de los mismos, o sales cosméticamente aceptables de los mismos.



25 (THPED)



(THEED)



(TEMED)

60

[0038] La síntesis de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxipropil) etilendiamina de la reacción de etilendiamina con óxido de propileno se describe en la Patente de EE.UU. nº 2.697.118.

65 [0039] Los compuestos descritos en este documento también pueden estar presentes en forma de sales

cosméticamente aceptables. Para uso en medicina, las sales de los compuestos de esta invención se refieren a "sales cosméticamente aceptables" no tóxicas, sales aniónicas o básicas/catiónicas ácidas/cosméticamente aceptables. Sales ácidas/aniónicas cosméticamente aceptables incluyen, y no se limitan a acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrito, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teocato, tosilato y trietioduro. Sales básicas/catiónicas cosméticamente aceptables incluyen, y no están limitadas a aluminio, benzatina, calcio, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, litio, magnesio, meglumina, potasio, procaína, sodio y zinc. Otras sales pueden, sin embargo, ser útiles en la preparación de compuestos según esta invención o de sus sales cosméticamente aceptables. Los ácidos orgánicos o inorgánicos también incluyen, y no se limitan a, ácido yodhídrico, perclórico, sulfúrico, fosfórico, propiónico, glicólico, metanosulfónico, hidroxietanosulfónico, oxálico, 2-naftalenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, sacarínico o trifluoroacético.

[0040] En una realización, las composiciones de la presente invención contienen de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 10% en peso de dicho compuesto, tal como de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% en peso de dicho compuesto, tal como de aproximadamente 0,5% a aproximadamente el 3% en peso de dicho compuesto. En una realización, la composición contiene al menos 1% en peso de tal compuesto, tal como al menos aproximadamente 2% en peso de dicho compuesto.

Composiciones

[0041] Las composiciones útiles en la presente invención implican formulaciones adecuadas para su administración a los tejidos diana, tales como la piel de mamíferos, tales como la piel humana. En una realización, la composición contiene una cantidad segura y eficaz (i) del compuesto de la presente invención y (ii) un vehículo cosméticamente aceptable. En una realización, el vehículo cosméticamente aceptable es de aproximadamente 50% a aproximadamente 99,99%, en peso, de la composición (por ejemplo, de aproximadamente 80% a aproximadamente 99%, en peso, de la composición).

[0042] Las composiciones se pueden hacer en una amplia variedad de tipos de productos que incluyen pero no se limitan a soluciones, suspensiones, lociones, cremas, geles, barras, pulverizaciones, ungüentos, lavados líquidos de limpieza y pastillas sólidas, champúes y acondicionadores para el cabello, pastas, espumas, polvos, espumas, cremas de afeitar, toallitas, parches, lacas de uñas, un vendaje de heridas y vendajes adhesivos, hidrogeles, productos formadores de película, máscaras faciales y de la piel, maquillaje, tales como fundaciones, máscaras, líneas de ojos, sombras de ojos, y barras de labios, y similares. Estos tipos de productos pueden contener varios tipos de vehículos cosméticamente aceptables incluyendo, pero no limitado a soluciones, suspensiones, emulsiones tales como microemulsiones y nanoemulsiones, geles, sólidos y liposomas. Los siguientes son ejemplos no limitativos de tales vehículos. Otros vehículos se pueden formular por expertos normales en la técnica.

[0043] Las composiciones útiles en la presente invención se pueden formular como soluciones. Soluciones incluyen típicamente un disolvente acuoso u orgánico (por ejemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 99,99% o de aproximadamente 90% a aproximadamente 99% de un disolvente acuoso u orgánico cosméticamente aceptable). Ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen: propilenglicol, polietilenglicol (200-600), polipropilenglicol (425-2025), glicerol, 1,2,4-butanotriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, etanol, y mezclas de los mismos.

[0044] Una loción puede hacerse a partir de una solución de este tipo. Las lociones contienen típicamente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20% (por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%) de un emoliente y de aproximadamente 50% a aproximadamente 90% (por ejemplo, de aproximadamente 60% a aproximadamente 80%) de agua. Como se usa en este documento, "emolientes" se refiere a materiales usados para la prevención o alivio de la sequedad, así como para la protección de la piel o el cabello. Ejemplos de emolientes incluyen, pero no se limitan a, los expuestos en el International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, eds. Wenninger y McEwen, pp. 1656-1661, 1626, y 1654 a 1655 (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Assoc., Washington, DC, 7ª edición, 1997) (en adelante "ICI Handbook").

[0045] Otro tipo de producto que puede formularse a partir de una solución es una crema. Una crema contiene típicamente de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%) de un emoliente y de aproximadamente 45% a aproximadamente 85% (por ejemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 75%) de agua.

[0046] Sin embargo, otro tipo de producto que puede formularse a partir de una solución es un ungüento. Un ungüento puede contener una base simple de origen animal, vegetal, o aceites sintéticos o hidrocarburos semi-sólidos. Un ungüento puede contener de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% de un emoliente más de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2% de un agente espesante. Ejemplos de agentes espesantes incluyen, pero no se limitan a, los expuestos en el ICI Handbook. 1693-1697.

5 [0047] Las composiciones útiles en la presente invención también se pueden formular como emulsiones. Si el vehículo es una emulsión, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (por ejemplo, de aproximadamente 2% a aproximadamente 5%) del vehículo contiene un emulsionante. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Ejemplos de emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, los expuestos en el Manual ICI, pp.1673-1686.

10 [0048] Las lociones y cremas pueden formularse como emulsiones. Típicamente tales lociones contienen de 0,5% a aproximadamente 5% de un emulsionante, mientras que este tipo de cremas contendrían típicamente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20% (por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%) de un emoliente; desde aproximadamente 20% a aproximadamente 80% (por ejemplo, desde 30% a aproximadamente 70%) de agua; y de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (por ejemplo, de aproximadamente 2% a aproximadamente 5%) de un emulsionante.

15 [0049] Preparaciones para el cuidado de la piel de emulsión individuales, tales como lociones y cremas, del tipo aceite-en-agua y tipo agua-en-aceite son bien conocidos en la técnica y son útiles en la presente invención. Composiciones de emulsión multifase, tales como del tipo agua-en-aceite-en-agua o del tipo aceite-en-agua-en-aceite, también son útiles en la presente invención. En general, tales emulsiones simples o multifase contienen agua, emolientes y emulsionantes como ingredientes esenciales.

20 [0050] Las composiciones de esta invención también pueden formularse como un gel (por ejemplo, una solución acuosa, alcohol, alcohol/agua, o gel de aceite con un agente gelificante adecuado). Los agentes gelificantes adecuados para geles acuosos y/o alcohólicos incluyen, pero no se limitan a, gomas naturales, ácido acrílico y polímeros y copolímeros de acrilato, y derivados de celulosa (por ejemplo, celulosa de hidroximetilo e celulosa de hidroxipropil). Los agentes gelificantes adecuados para aceites (tales como aceite mineral) incluyen, pero no se limitan a, copolímero hidrogenado de butileno/etileno/estireno y copolímero de etileno/propileno/estireno hidrogenado. Tales geles contienen típicamente entre aproximadamente 0,1% y 5%, en peso, de tales agentes gelificantes.

30 [0051] Las composiciones de la presente invención también se pueden formular en una formulación sólida (por ejemplo, una barra basada en cera, composición de pastilla de jabón, polvo, y limpie que contiene polvo).

35 [0052] Las composiciones útiles en la invención de referencia puede contener, además de los componentes mencionados anteriormente, una amplia variedad de materiales adicionales solubles en aceite y/o materiales solubles en agua usados convencionalmente en composiciones para uso sobre la piel en sus niveles establecidos en la técnica.

Agentes adicionales cosméticamente activos

40 [0053] En una realización, la composición contiene adicionalmente otro agente cosméticamente activo además de los compuestos anteriores. Lo que se entiende por un "agente cosméticamente activo" es un compuesto (por ejemplo, un compuesto sintético o un compuesto aislado de una fuente natural, o un extracto natural que contiene una mezcla de compuestos) que tiene un efecto cosmético o terapéutico en el tejido, incluyendo , pero no limitando a, agentes de aligeramiento, agentes tales como agentes autobronceadores, agentes anti-acné, agentes de control de brillo, agentes anti-microbianos, tales como agentes anti-hongos, anti-hongos, y agentes antibacterianos oscurecimiento, agentes antiinflamatorios, agentes antiparasitarios, analgésicos externos, filtros solares, fotoprotectores, antioxidantes, agentes líticos queratoconjuntivitis, detergentes/tensioactivos, humectantes, nutrientes, vitaminas, potenciadores de energía, agentes anti-transpiración, astringentes, desodorantes, depilatorios, agentes de mejora del crecimiento del cabello, agentes de retraso del crecimiento del cabello, agentes reafirmantes, agentes anti-insensibles, agentes para el acondicionamiento de la piel, agentes anti-celulitis, fluoruros, y agentes de control de olores tales como olor o agentes de enmascaramiento de pH cambiantes.

55 [0054] En una realización, el agente cosméticamente activo se selecciona de, pero no limitado a, el grupo que consiste en ácidos de hidroxil, peróxido de benzoilo, D-pantenol, octilo metoxicinimato, dióxido de titanio, salicilato de octilo, homosalato, avobenzona, carotenoides, eliminadores de radicales libres, trampas de giro, retinoides y precursores de retinoides tales como retinol y palmitato de retinilo, ceramidas, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos esenciales, enzimas, inhibidores de enzimas, minerales, hormonas tales como estrógenos, esteroides tales como hidrocortisona, 2-dimetilaminoetanol, sales de cobre tal como cloruro de cobre, péptidos que contienen cobre tales como Cu: Gly-His-Lys, coenzima Q10, los aminoácidos de una prolina, vitaminas, ácido lactobiónico, acetil-coenzima A, niacina, riboflavina, tiamina, ribosa, transportadores de tales electrones tales como NADH y FADH2, y otros extractos botánicos tales como aloe vera, matricaria, y soja y derivados y mezclas de los mismos. El agente cosméticamente activo estará presente típicamente en la composición de la invención en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 20% en peso de la composición, por ejemplo, aproximadamente 0,005% a aproximadamente 10%, tal como de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%.

65 [0055] Ejemplos de vitaminas incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, B de vitaminas tales como vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B12, vitamina C, vitamina K, vitamina E, tales como alfa, gamma o delta-tocoferol, y

derivados (tales como sales y ésteres) y sus mezclas.

[0056] Ejemplos de hidroxácidos incluyen, pero no se limitan a, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido salicílico, ácido cítrico, y ácido tartárico.

[0057] Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes solubles en agua tales como compuestos de sulfhidrilo y sus derivados (por ejemplo, metabisulfito de sodio y N-acetil-cisteína), ácido lipoico y ácido dihidrolipoico, resveratrol, lactoferrina, y derivados de ácido ascórbico y de ácido ascórbico y (por ejemplo, palmitato de ascorbilo y polipéptido de ascorbilo). Antioxidantes solubles en aceite adecuados para uso en las composiciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a, butilado hidroxitolueno, retinoides (por ejemplo, retinol y palmitato de retinilo), diferentes tipos de tocoferoles (por ejemplo, tocoferoles alfa, gamma, y delta y sus ésteres tales como acetato) y sus mezclas, tocotrienoles, y ubiquinona. Los extractos naturales que contienen antioxidantes adecuados para uso en las composiciones de esta invención, incluyen, pero no se limitan a, extractos que contienen flavonoides, isoflavonoides y sus derivados, tales como genisteína y daidzeína (por ejemplo, como extractos de soja y trébol, extractos que contienen resveratrol y similares. Ejemplos de dichos extractos naturales incluyen semilla de uva, té verde, corteza de pino, y propóleos.

[0058] Los ejemplos de enzimas incluyen, pero no se limitan a, proteasas tales como proteasas fúngicas, proteasas bacterianas o proteasas de mamíferos. Ejemplos de tales proteasas incluyen, pero no se limitan a, la pepsina, catepsina, proteasa ácida urinaria humana, proteasas fúngicas derivadas de *Neurospora oryzae*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus chinensis* o *Endothia parasitica*, y proteasas bacterianas *rizopuspepsina*, *penicilopepsina* y *endothiapepsin*. Además, las proteasas pueden derivarse de procedimientos que implican procesos y técnicas de ingeniería genética.

[0059] Ejemplos de extractos de hongos incluyen, pero no se limitan a, extractos de *Neurospora oryzae*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus chinensis* o *Endothia parasitica* *Mucor miehei*. Ejemplos de composiciones que contienen tales proteasas y extractos de hongos se describen en la patente de EE.UU. nº 5.976.556.

[0060] Los efectos de mitigación de la irritación de los compuestos de fórmula I y II pueden ayudar a mitigar los efectos de irritación de la piel de ciertos irritantes activos en cosmética. Ejemplos de tales agentes cosméticamente activos irritantes de la piel incluyen, pero no se limitan a, retinoides y sus derivados, peróxido de benzoilo, retinoides y los ácidos alfa-hidroxi. Los ejemplos de retinoides incluyen, pero no se limitan a, retinol, ácido retinoico, palmitato de retinilo, acetato de retinilo, retinal, y propionato de retinilo. Los ejemplos de ácidos alfa-hidroxi incluyen, pero no se limitan a, ácido láctico y ácido glicólico.

[0061] En una realización, la composición contiene además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en cafeína, vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina C, y la sal y ésteres de los mismos o un extracto seleccionado entre el grupo que consiste en extracto de té verde, extracto de castaño de Indias, extracto de células de levadura viva, y extracto de pepino.

[0062] En una realización, la composición contiene además un agente de autobronceado como dihidroxi acetona, forskolina, ertulosa, oscurecimiento de la piel péptidos tales como LIGR, SLIGRL, y otros se dan a conocer en las solicitudes de patente de Estados Unidos 2002/0197219, 2002/0197281, 2003/0138388 y 2003/0232743, melanina y derivados de melanina (por ejemplo, tanto polímeros de melanina como derivados de melanina de peso molecular solubles en agua inferiores), y los extractos de las plantas del género *Hedychium*, ruibarbo, Bearberry, y *Onosis* como el extracto de raíz de *Onosis Spinosa*. Ejemplos de derivados de melanina sintéticos se describen en la patente de EE.UU. nºs. 5.618.519, 5.384.116, y 5.227.459 y la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2005/0129633. Ejemplos de derivados de melanina solubles se describen en la patente EE.UU. nºs. 5.744.125, 5.225.435, 5.218.079, y 5.216.116. Ejemplos de derivados de melanina solubles disponibles comercialmente incluyen Melasyn-100® de San-mar laboratorios, Inc. (Elmsford, N.Y.) y MelanZe® de Zylepsis (Ashford, Kent, Reino Unido).

[0063] En una realización, la composición contiene, además, un retinoide, y el ácido alfa-hidroxi, un extracto de soja, un fitoestrógeno, un estrógeno, un astringente como por ejemplo hamamelis, triclosan, cerulenina, alfa-metilen-gamma-butilactona, derivados de glicina, tales como capriloilglicina y metilglicina, ácido salicílico, o peróxido de benzoilo.

Extracto de plantas

[0064] En una realización, las composiciones de la presente invención contienen además un extracto de la planta. Lo que se entiende por un "extracto de la planta" es una mezcla de compuestos aislados de una planta. Dichos compuestos pueden aislarse a partir de una o más partes de la planta (por ejemplo, la totalidad de la planta, flor, semilla, raíz, rizoma, raíz, frutas y/o de la hoja de la planta) por eliminación física de una pieza de tal planta, tal como la molienda de una flor de la planta. Dichos compuestos también pueden aislarse de la planta mediante el uso de procedimientos de extracción bien conocidos en la técnica (por ejemplo, el uso de disolventes orgánicos tales como alcoholes inferiores C₁-C₈, polioles alquilo C₁-C₈, cetonas de alquilo C₁-C₈, éteres de alquilo C₁-C₈, ésteres alquílicos de ácido acético C₁-C₈ y cloroformo, y/o disolventes inorgánicos tales como agua, ácidos inorgánicos tales como

ácido clorhídrico, y bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio).

5 **[0065]** En una realización, el extracto de la planta (por ejemplo, un extracto de matricaria o un extracto de soja) está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 20% en peso, en particular en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% en peso de la composición. A menos que se indique lo contrario, el peso del extracto se refiere al peso seco del extracto.

Extracto de matricaria

10 **[0066]** En una realización, las composiciones de la presente invención contienen además un extracto de matricaria. Lo que se entiende por un "extracto de matricaria" es una mezcla de compuestos aislados de una planta matricaria. Ejemplos de tales compuestos, incluyen, pero no se limitan a, apigenina-7-glucósido, apigenina-7-glucurónido, 1-β-
15 hidroxiarbusculina, trimetiléter 6-hidroxicaempferol-3,7,4'- (tanetina), 6 hidroxicaempferol-3,7-éter dimetil, 8-β -
reinosina, 10-epicanina, ácido ascórbico, beta-caroteno, calcio, cromo, crisantemolida, crisantemomina, crisarten-A, crisarten-c, crisoeriol-7-glucurónido, cobalto, cosmosiina, epoxiartemorina, luteolina-7-glucósido, luteolina-7-
20 glucurónido, mangnoliolida, partenolida, quercetagentina-3,7,3'-trimetiléter, quercetagentina-3'7-dimetil-éter, reinosina, tanapartina, tanapartina-1α, 4α-epóxido, tanapartina- 1β,4β-epóxido, β-costunólido, 3-p-hidroxi-partenolida, y 3,7,3'-
trimetoxiquercetagentina. Se sabe que γ-lactonas α-insaturadas presentes en la planta matricaria, como partenolida, causan reacciones alérgicas. Por lo tanto, en una realización, el extracto de matricaria está sustancialmente libre de la alergia causando lactonas γ- insaturados alfa-. La preparación de extracto de matricaria que está sustancialmente libre de partenolida se da a conocer en el Ejemplo 1 en la solicitud de patente de EE.UU. n° 20040105905.

Extracto de soja

25 **[0067]** En una realización, las composiciones de la presente invención contienen además un extracto de soja. Lo que se entiende por un "extracto de soja" es una mezcla de compuestos aislados de soja. El extracto de soja puede contener sólo una porción de la soja (por ejemplo, un extracto de la soja tal como un lípido reducido polvo de soja o
30 leche de soja filtrada) o puede contener toda la semilla de soja (por ejemplo, un polvo molido de la soja). El extracto de soja puede estar en la forma de un fluido (por ejemplo, leche de soja) o un sólido (por ejemplo, un polvo de soja o polvo de leche de soja).

[0068] El extracto de soja puede ser polvo de soja. El polvo de soja puede hacerse moliendo soja seca. El polvo de soja puede liofilizarse. La leche de soja en polvo y la leche de soja también son extractos de soja útiles. La leche de soja es una combinación de sólidos derivados de la soja y agua, teniendo la mezcla de los cuales algunos o todos
35 los constituyentes insolubles filtrados. El polvo de leche de soja es leche de soja evaporada, que en una realización, está en una forma liofilizada o secada por pulverización. Procedimientos para la fabricación de leche de soja incluyen, pero no se limitan a los tres procedimientos siguientes. En primer lugar, la leche de soja se pueden hacer mediante la colocación de semillas de soja en agua para permitirles absorber el agua. Los granos hinchados se muelen y se añade entonces agua adicional. La mezcla puede entonces filtrarse para eliminar cualquier residuo
40 insoluble. En segundo lugar, la leche de soja también puede prepararse a partir de polvo de soja. El polvo de soja se mezcla completamente con agua (por ejemplo, durante al menos una hora), que después puede seguirse por un proceso de filtración para eliminar los residuos insolubles. En tercer lugar, la leche de soja también puede ser reconstituida a partir de leche de soja en polvo mediante la adición de agua. La leche de soja puede comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, en peso (por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente
45 20%, en peso) de sólidos de la soja.

[0069] Los ingredientes activos conocidos de soja incluyen, pero no se limitan a, las isoflavonas, fitoestrógenos, genisteína, daidzeína, gliciteína, saponinas, y fitoesteroles. Los extractos de soja útiles en esta invención pueden producirse a partir de todas las especies de soja, independientemente de su origen geográfico, la exposición al sol, el tiempo de cosecha y similares. Sin embargo, las cepas específicas, pueden ser preferidos orígenes geográficos o condiciones de crecimiento. Por ejemplo, pero no se limitan a las cepas de soja particularmente ricas en su Inhibidor de Tripsina de Cepas de Soja (STI) de contenido o en el contenido de isoflavona, o condiciones de crecimiento que resultan en STI o enriquecimiento de isoflavonas en el grano de soja, pueden ser preferidos.

55 **[0070]** En una realización, el extracto de soja es un extracto de soja no desnaturalizado. "Desnaturalización" se define en el Bantam Medical Dictionary (edición de 1990) como "el cambio en la física y las propiedades fisiológicas de una proteína, que son provocadas por calor, rayos X o productos químicos. Estos cambios incluyen pérdida de actividad (en el caso de las enzimas) y pérdida (o alteración) de antigenicidad (en el caso de antígenos)". Lo que se entiende por "extracto de la planta no desnaturalizado" es un producto extraído o derivado de una planta en la que el
60 procesamiento para la obtención de tales extractos de la planta (por ejemplo, la temperatura, medios de extracción) no eliminó su actividad inhibidora de la proteasa. Una de tales proteasas es la tripsina. En una realización, el estado no desnaturalizado del extracto de soja de esta invención se mide por la presencia de una proteína intacta inhibidora de tripsina de soja (STI) o por su actividad inhibidora de tripsina.

65 **[0071]** Hay que señalar que los extractos de soja que son útiles en las composiciones de esta invención pueden tener un olor característico. Si es necesario, el olor de los extractos puede reducirse mediante el uso de productos

de soja derivados de cepas específicas de soja conocidas por producir la reducción de olores, incluyendo, pero no limitado a, granos deficientes de lipoxigenasa-2 y los que tienen el perfil de azúcar modificado, y similares. Un proceso para reducir los niveles de oxígeno en la formulación también puede reducir el olor. Varios agentes enmascarantes o fragancias se pueden usar también para enmascarar el olor. Una forma de hacer leche de soya es

5 remojar las semillas de soja en agua desionizada o purificada durante varias horas, y se muelen después de que estaban completamente hidratadas, con la adición de pequeñas cantidades de agua. El proceso de molienda permite que la leche de soja se extraiga. Después de la recolección, la leche de soja puede ser filtrada para eliminar cualesquiera partes residuales de la cáscara de frijol.

10 **[0072]** La leche de soja usada en las formulaciones descritas a continuación puede ser leche de soja fresca como se describió anteriormente, o puede estar hecha de polvo de soja y agua. El polvo de soja se muele a partir de soja y también puede ser liofilizada, secada por pulverización, o se liofiliza y de la leche de soja resultante puede o no puede filtrarse. Tales preparados de leche de soja pueden tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 90% en

15 peso de polvo de soja seca. Otro ejemplo es el uso de polvo de leche de soja, a partir de leche de soja liofilizada, secada por pulverización o congelada en seco, con la adición de agua y acabado con o sin filtración u homogeneización. Otros métodos de extracción de soja también se podrían utilizar para crear los ingredientes activos en las formulaciones descritas a continuación. Por ejemplo, los ingredientes activos podrían ser extraídos de semillas de soja trituradas usando mezclas de etanol/agua, seguido de la eliminación del etanol a partir del extracto, en formas que la actividad inhibidora de proteasa de serina de la semilla de soja se retendrá, y preferiblemente que

20 la proteína STI se mantendrá intacta.

En una realización, los extractos de soja utilizados en la presente invención tienen un contenido microbiano de menos de aproximadamente 1.000 ufc por gramo (tal como menos de aproximadamente 100 ufc por gramo) del extracto de soja.

25 **[0073]** El extracto de soja puede estar expuesto a irradiación gamma. El extracto de soja puede estar expuesto a de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 kGy de irradiación gamma, tal como de aproximadamente 5 y aproximadamente 10 kGy de irradiación gamma. Tal tratamiento reduce el contenido microbiano del extracto de soja, mientras que mantiene su actividad biológica (por ejemplo, actividad inhibidora de proteasa de serina). El

30 tratamiento de extractos de soja con irradiación gamma mantiene la elegancia cosmética de la composición, tal como los colores naturales mantenidos, y no induce malos olores significativos.

[0074] Otros procesos antimicrobianos que también mantienen la actividad inhibidora de la proteasa del extracto de soja que se puede practicar solo o en combinación con irradiación gamma, incluyen, pero no están limitados a, la

35 exposición a rayos X, electrones de alta energía o de protones vigas, radiación ultravioleta, presión hidrostática, y adición de agentes químicos que poseen actividad antimicrobiana, y sus combinaciones.

Otros materiales

40 **[0075]** Otros materiales diversos pueden también estar presentes en las composiciones útiles en la presente invención. Estos incluyen humectantes, proteínas y polipéptidos, conservantes y un agente alcalino. Ejemplos de tales agentes se describen en el ICI Handbook, pp. 1650-1667. Las composiciones de la presente invención pueden contener también agentes quelantes (por ejemplo, EDTA) y conservantes (por ejemplo, parabenos). Los ejemplos de

45 conservantes y agentes quelantes adecuados se enumeran en pp. 1626 y 1654 a 1655 del ICI Handbook. Además, las composiciones útiles en la presente memoria pueden contener adyuvantes cosméticos convencionales, tales como colorantes, tales como colorantes y pigmentos, opacificantes (por ejemplo, dióxido de titanio), y fragancias.

Agua mineral

50 **[0076]** Las composiciones de la presente invención pueden prepararse usando un agua mineral, por ejemplo agua mineral que se ha mineralizado naturalmente tal como agua mineral Evian® (Evian, Francia). En una realización, el agua mineral tiene una mineralización de al menos aproximadamente 200 mg/L (por ejemplo, desde alrededor de 300 mg/L a alrededor de 1000 mg/L). En una realización, el agua mineral contiene al menos aproximadamente 10

55 mg/L de calcio y/o al menos aproximadamente 5 mg/L de magnesio.

Uso

60 **[0077]** La composición según la invención se puede utilizar para tratar una variedad de condiciones de la piel, tales como los signos de envejecimiento, la decoloración y la hinchazón alrededor de los ojos, acné, áreas claras de la piel, poros visibles y el aceite en la piel, la piel seca, y una variedad de trastornos inflamatorios no-acné tales como las causadas por ambas condiciones externas e inherentes. Ejemplos de tales trastornos inflamatorios que pueden ser tratados mediante el uso tópico de las composiciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a los

65 siguientes: artritis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis, dermatitis seborreica, eczema, dermatitis alérgica, erupciones polimorfas ligeras, dermatosis inflamatorias, foliculitis, alopecia, hiedra venenosa, picaduras de insectos, irritación inducida por factores extrínsecos incluyendo, pero no limitado a, los productos químicos, los traumatismos, los contaminantes (como el humo del cigarrillo) y el sol o la exposición al viento, y las condiciones

secundarias que resultan de la inflamación incluyendo pero no limitado a xerosis, hiperqueratosis, prurito, hiperpigmentación post-inflamatoria, cicatrices y similares. Ejemplos de tales decoloración y la hinchazón alrededor de los ojos incluyen, pero no se limitan a, las ojeras y bolsas bajo los ojos. En una realización, los círculos oscuros debajo de los ojos en tratamiento son el resultado de la concentración de aumento de la sangre en la piel debajo de los ojos.

[0078] La composición y formulaciones que contienen tales composiciones de la presente invención se pueden preparar utilizando una metodología que es bien conocida por un experto en la materia.

Ejemplo 1: Detección de impedancia eléctrica del sustrato de células

[0079] Cambios eléctricos debido a la presencia de una capa de células se pueden utilizar para calcular los parámetros morfológicos celulares, incluyendo la función de barrera de la capa de células (el espacio entre el lado ventral de la célula y el sustrato) y la capacitancia de la membrana celular (Giaever y Keese, Proceedings of National Academy of Sciences 88, 7896, 1991).

[0080] La corriente que fluye entre un electrodo de referencia, en el que las células o cultivos de células se pueden unir, y un contraelectrodo más grande, utilizando medio de cultivo normal, como el electrolito se puede utilizar para detectar cambios en parámetros morfológicos celulares. En la ausencia de células en el electrodo, la corriente fluye sin restricciones de la superficie de los electrodos. En presencia de células unidas y extendidas sobre el electrodo, la corriente debe fluir ahora en los espacios debajo y entre las células, como el acto de la membrana celular como aislantes.

[0081] Los cambios eléctricos de la vida, las células viables se pueden muestrear rápidamente, en tiempo real, durante un período prolongado de tiempo, y las medidas son no invasivas. Un ejemplo de esta tecnología es el sistema de detección de impedancia de sustrato de célula eléctrica (ECIS) disponible de Biofísica Aplicada (Troy, Nueva York). cambios eléctricos en parámetros morfológicos de queratinocito se pueden utilizar para identificar nuevos compuestos para beneficios antienvjecimiento.

[0082] Los queratinocitos humanos y medios de cultivo Epilife (Cascade Biologics, Portland, OR) se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% aire. Matrices de electrodos del sistema de detección de impedancia de sustrato de célula eléctrica (ECIS) (Biofísica Aplicada, Troy, NY) se recubrieron con 0,01 mg/ml de laminina V (Sigma Aldrich, St Louis, MO) en salina tamponada con fosfato estéril (Gibco Life Sciences, San Diego, CA). Los queratinocitos humanos se prepararon a una densidad de 0,125 células x 10⁶ células/ml en medio de cultivo Epilife. Los queratinocitos humanos se sembraron a 5,0 x 10⁴ células/pocillo de electrodo y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% de O₂ durante 24-48 horas. Cambios de capacitancia (en nanofaradios, NF) de queratinocitos se midieron usando un sistema de detección de impedancia de sustrato de célula eléctrica (ECIS) Modelo 1600R (Applied Biophysics, Troy, NY) usando el método de Wegener y compañeros de trabajo (Wegener J, Keese CR, Giaever I, Exp Cell Res. 259: 158-166, 2000) a una frecuencia de 40.000Hz. Lecturas de capacitancia son inversamente proporcionales al área de contacto de una célula en la matriz de electrodos ECIS, cuánto mayor sea el área de la célula en contacto con el electrodo cuánto más pequeñas las lecturas de capacitancia (Wegener J, Keese CR, Giaever I, Exp Cell Res. 259: 158-166, 2000). A la inversa, a medida que una célula se contrae o se encoge, el área de contacto de la célula en la matriz de electrodos ECIS disminuye, resultando en un aumento en las lecturas de capacitancia. El cambio en las lecturas de capacitancia para cada uno de los grupos de tratamiento se integró más de 5 horas como una función de análisis de área bajo la curva (AUC) de aproximadamente 1000 células de queratinocitos. Estos cálculos se basan en el teorema de trapecio. La AUC de la curva de los medios de comunicación se restó del grupo tratado con el compuesto. Una diferencia de AUC positiva indica la contracción de queratinocitos, cuánto mayor sea la diferencia AUC mayor será la cantidad de contracción de los queratinocitos. Los siguientes compuestos se utilizan en el ejemplo: N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina (THPED, disponible de BASF bajo el nombre comercial "Quadrol" o "Neutrol") y 2-(dimetilamino)etanol (disponible de BASF bajo el nombre comercial "DMAE"). El DMAE es un agente reafirmante de la piel conocida. Los compuestos se diluyeron en solución de Hank tamponada de sal (HBSS; Gibco Life Sciences, San Diego, CA) y el pH de la solución se ajustó a pH entre 7,2 hasta 7,3. El pH de la HBSS sin compuestos ("medio solo") también se ajustó a pH 7,2 a 7,3.

[0083] Sobre la base de este ejemplo, se puede observar a partir de los resultados en la tabla I, que DMAE y THPED induce una contracción dependiente de la dosis o la contracción de la superficie celular de queratinocitos en comparación con el tratamiento medio solo como se mide por la capacitancia de los queratinocitos.

Tabla I

Cuantización de queratinocitos humanos de contracción de capacitancia eléctrica (Medio ± Std Dev)				
Tratamiento	Concentración (%V/V)			
	0%	0,01%	0,05%	0,1%
Medios solos	15,8±,8			
Medios + THPED		29,2 ± 3,2 **	35,1 ± 5,3 *	44,5 ± 9,1 *
Medios + DMAE		22,82 ± 4,1**	28,8±5,6**	36,1± 5,9*

* = P<0,05 comparado a AUC para el grupo de tratamiento de medios sólo usando una prueba t emparejada.
 ** = P<0,1 comparado a AUC para el grupo de tratamiento de medios sólo usando una prueba t emparejada

Ejemplo 2: Contracción de queratinocitos humanos con THPED usando microscopía visual de tiempo real

[0084] Los queratinocitos humanos y medios de cultivo Epilife (Cascade Biologics, Portland, OR) se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% aire. Los portaobjetos de vidrio cubiertos (Applied Biophysics, Troy, NY) se recubrieron con 0,01 mg/ml de laminina V (Sigma Aldrich, St Louis, MO) en salina tamponada con fosfato estéril (Gibco Life Sciences, San Diego, CA). Los queratinocitos humanos se prepararon a una densidad de 0,125 células x 10⁶/ml en medio de cultivo Epilife. Los queratinocitos humanos se sembraron a 3,75 x10⁴ células/pocillo en una placa de 6 pocillos que contiene cubreobjetos recubiertos de laminina y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% de O₂ durante 48 horas. Cubreobjetos individuales se transfirieron a una cámara de imágenes de baño abierto (Warner Instruments, Hamden, CT) montada en un microscopio de leica invertida (Leitz DM1L) con una cámara CCD adjunta. Las células se perfundieron con solución de Hank tamponada de sal (HBSS; Gibco Life Sciences, San Diego, CA) a una velocidad de flujo de 1 ml/min usando una bomba peristáltica (Cole Parmer, Vernon Hills, IL). DMAE o THPED se diluyó en solución de salina tamponada de Hank y el pH de la solución se ajustó a pH entre 7,2 a 7,3. El pH de la HBSS sin DMAE o THPED ("medio solo") también se ajustó a pH 7,2 a 7,3. Los queratinocitos humanos se perfundieron durante 10 minutos con tampón solo para establecer condiciones basales y en ese momento, tampón que contenía diversas concentraciones de DMAE o THPED fueron perfundidas sobre queratinocitos. Las imágenes se recogieron de un campo de los queratinocitos que contienen 10-20 células a 0, 10 y 20 minutos de tratamiento que utilizan software ImagePro. El área celular se determinó usando el software Scion Image (versión 4.0.2), y la reducción de área de la celda se informaron como la relación de área de la célula después del tratamiento a la zona de célula antes de tratamiento.

[0085] Sobre la base de este ejemplo, se ha encontrado (como se muestra en la Tabla II) que DMAE y THPED induce una contracción o encogimiento de área celular de queratinocitos dependiente de la dosis según lo determinado por área de superficie de los queratinocitos.

Tabla II

Cuantización de contracción visual de queratinocitos con THPED y DMAE (Medio 6 Std Dev)			
Tratamiento	Concentración (%V/V)		
	2 Min	10 Min	20 Min
Medios sólo			2,1% 6 3,2%
Medios + DMAE (0,01%)		4,82% ± 0,68%*	6,22% ± 0,95%*
Medios + DMAE (0,05%)		16,40% ± 2,58%*	18,04% ± 3,09%*
Medios + DMAE (0,1%)		23,61 ± 3,03%*	33,83% ± 2,96%*
Medios + THPED (0,1%)	32,9% ± 11,3%*	37,9% ± 10,7%*	47,3% ± 12,7%*

* = P<0,05 comparado a área de célula de queratinocitos anteriormente al tratamiento con THPED, usando una prueba t emparejada

[0086] Sobre la base de este ejemplo, se puede observar que el DMAE y THPED son capaces de inducir significativamente a una rápida contracción o encogimiento de la superficie celular de queratinocitos.

Ejemplo 3: Reviscometer® RVM 600 lectura en la parte interna del brazo superior.

[0087] El Reviscometer® RVM 600 (Courage y Khazaka, Colonia, Alemania) mide el tiempo de propagación de un pulso de cizalladura elástica en materiales viscoelásticos. A medida que la disposición preferida de las fibras de colágeno corresponde a la línea de corte de la piel (líneas de Lange), la velocidad de propagación de las perturbaciones elásticas en la piel dependerá en gran medida de su orientación. Los sitios de la piel del cuerpo donde la piel es más floja presentaría los efectos de orientación más fuertes, por ejemplo en la parte interna del

brazo superior, el cuello, los muslos y el abdomen en base a la orientación de las fibras de colágeno.

[0088] En este estudio se eligió un instrumento que permite la determinación de la tensión direccional a lo largo de la superficie de la piel. La velocidad del sonido depende de la densidad y la tensión del material a través del cual se propaga, por ejemplo el sonido viaja más rápido en agua que lo hace en el aire y más rápido sin embargo, en un sólido. Las vibraciones mecánicas se propagan más rápido cuanto mayor sea la tensión; como una cuerda de guitarra, cuanto mayor sea la tensión más alta será la frecuencia de oscilación después de tocarse. La sonda que entra en contacto con la piel del instrumento en cuestión se compone de dos transductores plateados 1,5-2 mm aparte y montados en dos soportes independientes. Entonces, un transductor genera un movimiento de pequeña amplitud (<1 mm) y el segundo transductor determina cuando la perturbación generada por el primer transductor llega a su ubicación. A partir de este momento, se puede calcular la velocidad de propagación y, por lo tanto, la tensión a lo largo de la piel. En el límite en el que el movimiento del transductor es de menos de 100 micras, el instrumento probablemente hará un sondeo de la tensión en la epidermis y a medida que el movimiento se haga más grande el movimiento incluirá la dermis. El instrumento utilizado en este estudio genera una moción que sondea la epidermis y la dermis superficial. El tiempo que le toma el pulso acústico para ir desde el transmisor al receptor es el parámetro medido llamado Tiempo de Funcionamiento de Resonancia (RRT). La RRT depende de la orientación direccional de los haces de colágeno. Las lecturas deben ser realizadas en diferentes ángulos: 0°, 45°, 90° y 135°. En este estudio lecturas como función del ángulo se tomaron en incrementos de 3°; cubriendo un campo angular del rango 100°. La anisotropía (A) del parámetro medido, RRT_{max}/RRT_{min} , y de la anchura total a la mitad del máximo (FWHM) obtenido a partir de un ajuste de Gauss de la RRT como una función del ángulo medido son dos nuevos parámetros mecánicos que cambian con la edad. Su relación $A/FWHM$ es un nuevo parámetro mecánico que podemos utilizar para predecir la edad de los sujetos, ya que se obtuvo un valor de $p < 0,001$ para esta relación como una función de la edad. En este estudio se expresará el reafirmante de la piel como una relación de la anisotropía antes y después de la aplicación del producto.

[0089] Mediciones viscoelásticas de la piel se realizaron en función de la dirección con un Reviscometer® (RVM Modelo 600, Courage Khazaka, Colonia, Alemania). La sonda se mantiene perpendicular a la superficie de la piel por un soporte cilíndrico hueco que está unido a la superficie de la piel con cinta adhesiva doble (parte superior de posicionamiento). El soporte tiene marcas a lo largo de su periferia a intervalos angulares de 45°. En nuestro instrumento se modificó el conjunto de la sonda titular mediante la colocación de una escala mm en la sonda y otro en el soporte. A continuación, se llevó a cabo mediciones mediante la rotación de la sonda dentro del soporte de forma que las líneas mm de la escala se alinearían uno con el otro, esto correspondía a realizar mediciones cada 3° durante un intervalo total de 100°.

[0090] Las mediciones viscoelásticas de piel fueron tomadas en la parte interna del brazo superior de 30 sujetos. Dos sitios se eligieron en cada brazo, se tomaron lecturas como se describe anteriormente antes y 45 minutos después de la aplicación del producto. En uno de los sitios se aplicó una formulación de placebo (sin THPED) y en el segundo sitio se aplicó una formulación que contiene 2,5% de THPED (como se describe en el Ejemplo 4). Después del ajuste gaussiano, la relación de anisotropía, antes y después de la aplicación de producto se calculó.

[0091] Se encontró que la formulación THPED disminuye el pliegue de la anisotropía de piel 3, en comparación con 1,5 veces para la formulación de placebo. Al usar un software de Minitab® para el análisis estadístico comparando la formulación THPED frente a placebo, se obtuvo una $p < 0,001$. Esto demuestra que sitios tratados con THPED pueden apretarse y reafirmar la piel y este efecto es estadísticamente significativo.

[0092] Las composiciones que contienen DMAE también se probaron en la misma metodología que se ha descrito anteriormente. Los brazos interiores superiores de los sujetos se trataron con los productos que contenían o bien 0% DMAE (placebo), 0,5% DMAE, 1% DMAE, 2% DMAE, o 3% DMAE. La anisotropía se midió antes y 35 minutos después de la aplicación del producto. La relación de anisotropía muestra una respuesta a la dosis para DMAE que indica que la contracción de los queratinocitos, como se ve en el ejemplo de la microscopía confocal (Ejemplo 3), puede afirmar y apretar la piel, así proporcionando beneficios de antienvjecimiento a la piel. La Tabla V muestra el efecto reafirmante (relación de anisotropía) para el DMAE como una función de la concentración de DMAE en porcentaje.

Tabla V

Concentración de DMAE (%)	Reafirmante ($A_{antes}/A_{después}$)
Placebo	1,1 6 1,1
0,5	6,5 6 5,8
1	9,5 6 6,3
2	14,5 6 4,8
3	20,9 6 5,0

5

Ejemplo 4: Composición tópica

[0093] La siguiente es una descripción de la fabricación de una composición de loción tópica que contiene THPED. En un vaso de precipitados de vidrio principal, se pesó 545,60 g de agua desionizada y se calienta a 78-80°C. Mientras que se mezcla a velocidad moderada, se añadieron 15,0 g de PVM/MA decadieno polímero cruzado disponible en International Specialty Products (Wayne, Nueva Jersey) bajo el nombre comercial "Stabileze QM" y se mezcla hasta que sea homogénea a 78-80°C. El vaso se retiró del calor, y 1,0 g de EDTA disódico disponible de Dow Chemical (Midland, Michigan) con el nombre comercial "Versene NA", 7,5 g de cocoato de sacarosa disponible de Croda (Edison, New Jersey) bajo el nombre comercial "Crodesta SL-40", 7,5 g de glicéridos de PEG-6 Cáprico/Caprílico disponible de Croda con el nombre comercial "Glycerox 767", y 10,0 g de hexilenglicol disponible en Pfaltz & Bauer Chemicals (Waterbury, CT) bajo el nombre comercial "hexilenglicol" se añadieron y se mezclaron hasta uniformidad.

[0094] En un vaso de precipitados secundario, 305,0 g de agua desionizada se pesaron en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadieron 25,0 g de N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxipropil) etilendiamina disponibles de BASF bajo el nombre comercial "Quadrol" o "Neutrol" y se mezcló hasta uniformidad. Cuando se enfrió la temperatura del vaso de precipitados principal a 40°C o menos, el contenido del segundo vaso de precipitados se añadieron al vaso de precipitados principal y se mezcla hasta que sea uniforme.

[0095] Una solución de amortiguación que se preparó en un vaso de precipitados terciario pesando primero 12,4 g de agua desionizada en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadieron 8,0 g de ácido cítrico anhidro "ácido cítrico", y 23,0 g de ácido glicólico (70%) disponible de DuPont Chemical bajo el nombre comercial "Glypure" y se mezclaron hasta uniformidad. El pH de la mezcla en el vaso de precipitados principal se ajustó a entre 7,0 a 7,5 con mezcla de glicólico/cítrico/agua añadida del vaso de precipitados terciario.

[0096] A continuación, se añadieron 5,0 g de talco disponible de Luzenac (Denver, Colorado) bajo el nombre comercial "Windsor Talco 66" al vaso de precipitados principal y se mezcla hasta que sea uniforme. Se añadió 10,0 g de Nilón 12 disponible de Kobo Products, Inc (South Plainfield, New Jersey) bajo el nombre comercial "SP-10" al vaso de precipitados principal y se mezcla hasta que sea uniforme. Se añadió 10,0 g de Silicone Quaternium-13 disponible de Biosil Technologies, Inc. (Paterson, New Jersey) bajo el nombre comercial "Biosil Basics SPQ" al vaso de precipitados principal y se mezcla hasta que sea uniforme. Se añadió 10,0 g de parabenos disponible de Nipa Laboratories, Inc. (Wilmington, Delaware) con el nombre comercial "Phenonip" al vaso de precipitados principal y se mezcla hasta que sea uniforme. Finalmente, la mezcla se homogeneizó durante 5 minutos y se enfrió a 25°C.

Ejemplo 5: Composición tópica

[0097] Una formulación tópica de la Tabla VI se fabricó como sigue. En un vaso de precipitados de vidrio principal, agua desionizada, glicerina, hidroxicelulosa, y parabenos se han añadido. N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxipropil) etilendiamina (disponible de BASF bajo el nombre comercial "Quadrol" o "Neutrol") se añadió entonces al vaso de precipitados de vidrio principal, se mezcla hasta uniformidad y el pH de la mezcla se ajustó a entre 7,0 a 7,5 con ácido glicólico. Después del ajuste del pH, se añadió extracto de partenio de crisántemo (extracto de polvo de matricaria) y se mezcló hasta uniformidad.

[0098] En un recipiente de vidrio secundario, se añadieron cloruro de diestearildimonio, alcohol cetearílico, palmitato de isopropilo, y dimeticona. La mezcla en el vaso de vidrio secundario se calentó a 80°C, y se mezcla hasta que sea uniforme. Cuando la temperatura del vaso de precipitados secundaria se enfrió a 40°C o por debajo, se añadieron los contenidos del segundo vaso de precipitados al vaso de precipitados principal junto con alcohol bencílico, y se mezcla hasta uniformidad. Finalmente, la mezcla se homogeneizó durante 5 minutos y se enfrió a 25°C.

55

60

65

Tabla VI

Nombre comercial	Nombre INCI	% en peso
Agua deionizada	Agua deionizada	63,68
Glicerina 917	Glicerina	12
Varisoft TA-100	Cloruro de Distearildimonio	5
Snow White Petrolatum U.S.P.	Petrolato	4
Procol CS-20-D	Alcohol de Cetearilo y Ceteareth-20	3
Propal' NF	Palmitato de Isopropilo	3
Crodacol C-95	Alcohol de Cetilo	2,5
Quadrol	Etilenediamina de Tetrahidroxipropil	2,5
Glypure 70%	Ácido Glicólico	1,4
Dow Corning 225	Dimeticona	1,25
Alcohol de Bencilo	Alcohol de Bencilo	0,6
Extracto de polvo de macaria	Extracto de Partenio Crisántemo (Macaria)	0,5
Nipastat	Metilparaben y Butilparaben y Etilparaben y Propilparaben	0,3
Natrosol 250 HHR	Hidroxietilcelulosa	0,27

Ejemplo 6: La inmunomodulación de la sangre periférica humana de linfocitos de liberación de citoquinas estimuladas con PHA

[0099] La capacidad de las diversas aminos para afectar a las respuestas inflamatorias se ilustra por su capacidad para reducir la producción de citoquinas por los linfocitos humanos estimulados con el receptor de células T (TCR), activando el agente de fitohaemaglutinina - (PHA) en el siguiente ensayo.

[0100] Leucocitos humanos se obtuvieron de un varón adulto sano a través de leucoféresis, y se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio de crecimiento de linfocitos libre de suero (ex vivo-15, Biowhittaker, Walkersville, MD). PBL se estimularon con 10 $\mu\text{g/ml}$ de PHA en presencia o ausencia de muestras de ensayo siguiendo métodos publicados (Hamamoto Y., et al. Exp Dermatol 2:231-235, 1993). Se evaluaron los siguientes compuestos N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxipropil) etilenediamina (THPED, disponible de BASF bajo el nombre comercial "Quadrol" o "Neutrol"), N, N, N, N- Tetrametiletilenediamina (TEMED, disponible en Pfaltz & Bauer Chemicals (Waterbury, CT)), y dietilentiaramina (disponible de Sigma-Aldrich) Tras una incubación de 48 horas a 37°C con 5% de CO₂, el sobrenadante se eliminó y se evaluó por el contenido de citoquina con kit de detección de citoquinas múltiplex disponibles en el mercado. Los resultados se representan en la Tabla VII.

Tabla VII

Compuesto	Dosis	TNF % inh.	IL-2 % inh.	IFN % inh.	GMCSF % inh.
N,N,N,N- Tetrametiletilenediamina (TEMED)	100mg/ml	41,8%	47,3%	58,6%	47,3%
	10mg/ml	42 33,6%	6,6%	36,9%	47,4%
Tetrahidrox ietiletil enediamina (THEED)	100mg/ml	44,5%	61,8%	49,5%	23,0%
	10mg/ml	35,8%	27,7%	47,3%	16,6%
N,N,N',N'-Tetraquis(2-hidroxipropil)etileno diamina	100mg/ml	46,1%	41,3%	37,9%	15,8%
	10mg/ml	47,3%	10,6%	18,1%	10,3%
Dietilene triaramina	100mg/ml	3,3%	-19,5%	-35,0%	51,7%
	10mg/ml	9,9%	4,7%	-1,2%	36,6%
Tris[2-(isopropilamino)etilo] amina	100mg/ml	-15,3%	2,3%	12,5%	-52,8%
	10mg/ml	-10,7%	-7,7%	20,3%	-26,4%

5 (donde IL = interleucina-2 (citoquinas); IFN = interferón-gamma; TNF = factor de necrosis tisular-alfa; GM-CSF de granulocitos y macrófagos = factor estimulante); y % inh se refiere a porcentaje de inhibición de la citoquina.

10 **[0101]** Sobre la base de lo anterior, puede verse que los compuestos ensayados fueron capaces de modular la activación de linfocitos inducida por la estimulación de células T.

Ejemplo 7: Actividad anti-inflamatoria de liberación de la radiación inducida por UV por mediadores proinflamatorios en las inconsistencias de epidermidis reconstituida

15 **[0102]** El efecto de diaminas se evaluó para actividad anti-inflamatoria tópica en equivalentes epidérmicos humanos. Equivalentes epidérmicos (PAI 200 HCF), de múltiples capas y la epidermis diferenciada que consiste en queratinocitos epidérmicos humanos normales, fueron adquiridos de MatTek (Ashland, MA). Tras la recepción, equivalentes epidérmicos se incubaron durante 24 horas a 37°C en medio de mantenimiento sin hidrocortisona. Equivalentes se trataron tópicamente (2 mg/cm²) con compuestos en etanol al 70%/ vehículo propilenglicol al 30% a la concentración indicada 2 horas antes de la exposición a la luz solar ultravioleta (simulador solar 1000W-Oriel equipado con un filtro de 1 mm Schott WG 320; dosis de UV aplicada: 70 kJ/m², medido a 360 nm). Equivalentes se incubaron durante 24 horas a 37°C con medio de mantenimiento a continuación, se analizaron los sobrenadantes para la liberación de citoquinas IL-1A usando kits disponibles en el comercio (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA). Los resultados se representan en la Tabla VIII.

25

Tabla VIII

Tratamiento (Dosis, as % w/v)	Medio +/- Std Dev of IL-1A Liberación (ng/ml)	Por cien de inhibición de inflamación de la piel
No tratado, NO UV	115,7 6 15,2	-
UV, Tratado Vehículo	320,6 6 35,6	-
UV, Matricaria (1,0%)	159,0 6 38,3**	50,4%
UV, Matricaria (0,5%)	287,4 6 75,4	10,4%
UV, THPED (0,5%)	357,3 6 92,1	0%
UV, Matricaria (0,5%) + THPED (0,5%)	180,0 6 67,4**	43,8%

** Indica diferencia significativa de UV, Vehículo tratado usando una prueba t de estudiante con conjunto de significación a P<0,05.

40

45 **[0103]** Por lo tanto, se encontró que THPED mejoró significativamente la actividad anti-inflamatoria de matricaria.

45

Ejemplo 8: Reducción del eritema de piel inducido por el nicotinato de metilo

50 **[0104]** Nicotinato de metilo (metilo 3-piridincarboxilato) es un vasodilatador conocido causando un aumento del flujo sanguíneo cutáneo tras su aplicación sobre la piel. Véase Guy R. H., Arch. Dermatol Res (1982) 273: 91-95. En este experimento, entre 1-5 mM de solución de nicotinato de metilo (Aldrich Chemical, St. Louis, MO) se aplicó por vía tópica durante 30 segundos bajo oclusión (2,5 cm de disco, Hill Top Research Inc, Cincinnati, Ohio) en el antebrazo palmar de 7 voluntarios. Formulación placebo o formulación que contiene matricaria solo o extracto de matricaria más THPED se aplicó por vía tópica 30 minutos antes de la exposición nicotinato de metilo. Enrojecimiento se evaluó por espectroscopia de reflectancia difusa. Ver Kollias N, et al., Photochem Photobiol. (1992) (56): 223-227. Un espectrofotómetro de red de diodos Ocean Optics (Dunedin, Fla.) conectado a un ordenador portátil HP a través de un puerto USB se utiliza para controlar el experimento y para recopilar y analizar los datos espectrales. Un haz de fibra óptica se utilizó para conducir la luz de la lámpara a la piel y transmitir las mediciones de la reflectancia de vuelta de la piel para el espectrofotómetro. Los resultados se representan en la Tabla IX.

60

65

Tabla IX

Tratamiento (Dosis, as % w/v)	Medio +/- Std Dev de Hemoglobina Aparente	Por cien de inhibición de eritema de la piel
Placebo	0,55 6 0,18	-
Matricaria (1%)	0,39 6 0,26 **	28,9%
Matricaria (0,5%)	0,49 6 0,20	8,7%
THPED (2,5%)+ Matricaria (0,5%)	0,40 6 0,21 **	26,0%

** Indica diferencia significativa de Placebo tratado usando una prueba t de estudiante con conjunto de significación a P<0,05.

[0105] Estos resultados indican que THPED potenció la actividad de reducción de enrojecimiento de la matricaria en un modelo de enrojecimiento humano inducido por nicotinato de metilo

Ejemplo 9. Estudio clínico para reducir la aparición de arrugas y la decoloración alrededor de los ojos

[0106] Una composición que contiene 2,5% THPED se comparó con una composición de placebo correspondiente a la reducción de la aparición de la decoloración y arrugas alrededor de los ojos. 25 sujetos fueron incluidos en el estudio, con todos los sujetos que completaron el protocolo. Tabla X da a conocer la formulación de las dos composiciones.

Tabla X

	Formulación Placebo	de	Formulación THPED	de
Ingredientes	% en peso		% en peso	
Agua deionizada	91,31		88,81	
PVM/MV Polímero cruzado de decadiene	1,5		1,5	
Disodio EDTA	0,1		0,1	
Cocoato de Sucrosa	0,75		0,75	
PEG-6 Gliceridas Cápricas/Caprílicas	0,75		0,75	
Glicol de Hexileno	1		1	
Hidróxido de Sodio	0,59		0,59	
Talc #2 Guangxi H8162	0,5		0,5	
Nilón 12	1		1	
Quaternium de Silicona -13	1		1	
Alcohol de Etilo	0,5		0,5	
THPED	-		2,5	
Fenoxietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, y Propilparaben	1		1	

[0107] Sobre 0,47-0,52 g de cada composición se aplicó bajo un ojo de cada sujeto y se dejó secar. Cada composición se aplica sólo una vez a la zona durante la duración de este estudio. Al inicio del estudio y treinta minutos después de la aplicación de la composición, un examinador entrenado evaluó las áreas de prueba utilizando una escala de diez puntos, donde:

0 = muy pobre, extremadamente notable, o grave

10 = excelente, no perceptible, o ninguno. Tabla XI ilustra la mejora porcentual total en respondedores determinados a partir de la clasificación en tiempo real para cada composición.

Tabla XI

	% Mejora	
	Composición THPED	Composición Placebo
Aspecto general del ojo	12,5*	0,00
Aspecto general debajo del ojo	12,5*	0,00
Aspecto del círculo oscuro	17,26*	1,09
Intensidad del círculo oscuro	17,85*	0,00
Tamaño del círculo oscuro	19,64*	0,00
Líneas finas/arrugas debajo del ojo	33,33*	2,17

donde, usando una prueba t de dos muestras suponiendo varianzas iguales, se calcularon los siguientes valores de significación: * = p <0,05 frente a placebo

[0108] Los resultados de la Tabla XI indican que la composición que contiene THPED tenía un efecto rápido, estadísticamente significativo en la reducción de la aparición de círculos oscuros y arrugas alrededor de los ojos.

Ejemplo 10: Inducción de la pigmentación in vitro

[0109] THPED se ensayó para determinar su efecto sobre la pigmentación, usando melanocitos, tinción DOPA y análisis de imagen computerizado. THPED se obtuvo de BASF (Florham Park, NJ). THPED se disolvió en medio de cultivo y el pH se ajustó a neutro (pH 7,2). THPED se ensayó a concentraciones que van desde 0,05-0,01%.

[0110] Las células B16 (una línea celular de melanoma murino) se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células fueron cultivadas en el Modified Eagle Medium de Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS), 4,5 mg/ml de glucosa, 2 mM L-glutamina, piruvato de sodio, sin fenol Invitrogen rojo, Carlsbad, CA). Las células B16 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos (Corning Costar, San Diego, CA), a 40.000 células por pocillo en el medio de cultivo anterior. Las células se dejaron crecer durante la noche y después se trataron con varias concentraciones de THPED a pH 7,2 para el total de 48 horas. El medio fresco que contenía los tratamientos experimentales fueron cambiados una vez al día.

[0111] Al final del tratamiento, las células se lavaron durante 5 minutos, dos veces, en solución salina tamponada con fosfato (PBS, de Life Technologies, Gaithersburg, MD), después se fijaron brevemente en 10% de formalina tamponada (de Sigma St. Louis, MO) durante 10 minutos, se lavaron tres veces con PBS y se tñieron con 0,1% de L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA, de Sigma, St. Louis, MO) en PBS durante 2-3 horas a 37°C, seguido por tres lavados con PBS. DOPA es un sustrato para la tirosinasa; por lo tanto, un aumento en la tinción representa un aumento de la actividad de la tirosinasa y la producción de pigmento. Imágenes de células DOPA manchadas fueron tomadas usando un microscopio Leica DMIL (Bannockburn, IL) y una cámara digital OPTRONICS DEI-750 (Goleta, California). Todas las imágenes fueron obtenidas y analizadas con el software Image Pro Plus 4,0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

[0112] El cambio de pigmento se evaluó utilizando la escala definida en la Tabla XII.

Tabla XII

Puntuación	Descripción
0	Sin cambios en tinción DOPA
1	Aumento mínimo en tinción DOPA
2	Aumento moderado en tinción DOPA
3	Aumento fuerte en tinción DOPA
4	Aumento muy fuerte en tinción DOPA

[0113] La Tabla XIII representa la puntuación global en el cambio de pigmentación, tal como se evaluó mediante tinción DOPA, como se establece anteriormente, cuando las células B16 fueron expuestas a THPED (0,05% y 0,025 y 0,01% (w/v)) o forskolina (10 ug/ml, Sigma, St. Louis, MO), que es un conocido inductor de la pigmentación. Esta

tabla demuestra que el tratamiento THPED inesperadamente resultó en un aumento de los niveles de actividad de la tirosinasa similares o superiores a las producidas por forskolina.

Tabla XIII

	Puntuación de pigmentación
Control	0
Forskolina, 10 ug/ml (control positivo)	3
THPED 0,05%	4
THPED 0,025%	2
THPED 0,01%	1

Ejemplo 11: THPED induce la actividad de la tirosinasa *in vitro*

[0114] THPED también se ensayó para determinar su capacidad para inducir la actividad de tirosinasa en células B16 mediante la medición espectroscópica del producto final, la melanina. Las células B16 fueron tratadas con THPED a diferentes concentraciones a pH 7,2 durante 48 horas y las células se lisaron en 250 ml de PBS que contenía 1% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Los lisados se corrigieron y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C para sedimentar cualquier material insoluble. Los lisados (100 ml) se transfirieron a una placa de ensayo de 96 (Corning Costar, San Diego, CA) y se mezcló con 100 ml de 0,1% (w/v) en PBS DOPA. A continuación, la absorbancia a 490 nm se controló de 0 a 12 horas usando un espectrofotómetro de placas VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y el software analítico Pro SoftMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las actividades de tirosinasa se normalizaron para la proteína total usando el ensayo de proteínas BioRad Dc (Bio Rad, Hercules, CA).

[0115] La Tabla XIV muestra los resultados de la actividad de tirosinasa a los 3 horas, normalizados por sus controles relativos (células B16 no tratadas, normalizados a 100%), lo que demuestra que el tratamiento THPED inesperadamente mejoró la actividad de la tirosinasa. Esta Tabla demuestra la especificidad de las composiciones de esta invención en la inducción de la pigmentación (por ejemplo, el aumento de la actividad de tirosina hasta 201,90%, lo que es equivalente a la forskolina, un control positivo).

Tabla XIV

Tratamientos	% actividad de tironasa relativa al control no tratado
No tratado	100,00
forskolina, 10 µg/ml (control positivo)	202,35
THPED, 0,05%	201,90
THPED, 0,025%	167,39
THPED, 0,01%	10 ⁴ ,15

Ejemplo 12: THPED Aumenta los niveles de proteína de tirosinasa *in vitro*

[0116] THPED también se ensayó para determinar su capacidad para inducir los niveles de proteína de tirosinasa en células B16. Las células B16 fueron tratadas con THPED a diferentes concentraciones a pH 7,2 durante 48 horas y las células se lisaron en 250 µl de PBS que contenía 1% de Triton X-100. Lisados de células B16 que contienen 3,7 µg de proteína (para el análisis de proteínas de la tirosinasa) y 1,2 µg de proteína (para el análisis de proteínas β-actina) se sometieron a electroforesis en minigeles de 4-20% Tris-Glicina SDS PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirieron a membrana de PVDF (Bio Rad, Hercules, CA), y se sondearon con anticuerpos para la tirosinasa (1:200 en PBS + 0,2% Tween 20 + 5% de BSA, obtenido de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y β-actina (1:2000 en PBS + 0,2% Tween 20 + 5% de BSA, obtenida de Sigma, St. Louis, MO). Expresión de proteínas de la tirosinasa y β-actina se analizaron usando el reactivo ECL y Hyperfilm ECL obtenido de Amersham (Piscataway, NJ). La lámina fue desarrollada usando un Procesador Konica SRX-101A (East Orange, Nueva Jersey).

[0117] La Tabla XV muestra los niveles de proteína de tirosinasa, normalizados a control de β-actina, después de los distintos tratamientos. El nivel de proteína de tirosinasa en células B16 no tratadas se normalizó a 1. La Tabla XV demuestra que el tratamiento THPED aumentó los niveles de proteína de tirosinasa. Esta Tabla demuestra la especificidad de las composiciones de esta invención en la inducción de la pigmentación (por ejemplo, aumentando

el nivel de proteína de tirosinasa de hasta 36 veces en relación con las células tratadas PBS, lo que es equivalente a la forskolina (34 veces, control positivo).

5

Tabla XV

Tratamiento	Incremento relativo en proteína de tirosinasa
Control (PBS tratado)	1
Forskolina, 20 µg /ml	34
THPED, 0,05%	36
THPED, 0,025%	25
THPED, 0,01%	3

10

15

Ejemplo 13: Tratamiento de los Trastornos del acné

20

25

30

[0118] trastornos del acné a menudo se clasifican como tipos no inflamatorios o inflamatorios. El acné no inflamatorio se caracteriza por comedones cerrados (puntos blancos) y comedones abiertos (puntos negros), que consisten en masas compactas de la queratina, sebo y bacterias que dilatan el conducto folicular. Se forma comedones cuando un conducto pilosebáceo está obstruido y/o cuando hay una mayor producción de sebo por una glándula sebácea. La formación del comedón puede estar seguida por la inflamación, como resultado de la proliferación y/o la sobreproducción de sebo bacteriano. Típicamente, las bacterias son bacterias OBIC anaerobias tales como Propionibacteria (*P. acnes*). El acné inflamatorio se caracteriza por pápulas (espinillas), pústulas y lesiones noduloquísticas que pueden conducir a la cicatrización. Hay varios factores que se cree que desempeñan un papel importante en la patogénesis del acné, incluyendo: producción de sebo, la estimulación hormonal, poros obstruidos, y patógenos de la piel. Los niveles de sebo se incrementan en pacientes con acné en aproximadamente un 70% en comparación con los niveles de sebo de los sujetos de control.

35

40

45

[0119] El sebo humano difiere en su composición de otros mamíferos. Los principales lípidos en sebo humano son los triglicéridos, ésteres de cera, y escualeno (Greene, et al. JID 54, 240-247, 1970). El escualeno, por ejemplo, no se encuentra en muchos mamíferos. Triglicérido, el cual es un componente principal del sebo humano, está pobremente representado en otras especies y, en muchos (por ejemplo chimpancé) parece estar totalmente ausente (Thody, AJ, Shuster, S., *Physiol. Rev.* 69, 383-415, 1989). El escualeno se puede oxidar más al escualeno monohidroperóxido (Sq-OOH), que es el producto inicial de ultravioleta-peroxidación. Esto puede conducir a la formación de comedones, el inicio de una respuesta inflamatoria, la citotoxicidad y comedogenicidad (Chiba et al *J Biochem Mol Toxicol.* 2001;15 (3):150-158). Por lo tanto la disminución de la formación de escualeno en el sebo puede conducir a la disminución de la formación de comedones, y la aparición de acné incluyendo pápulas (granos), pústulas y cicatrices. Sin embargo, los principales lípidos en sebo humano también pueden funcionar para mantener la hidratación de la piel como se muestra por una correlación entre el contenido de sebo y contenido de agua de la piel (Aisen E et al, *Acta Derm Venereol* (1997) 77:142-143). Diversos enfoques han tratado de reducir la producción de sebo. Por ejemplo, los retinoides tópicos han demostrado reducir la síntesis de los principales lípidos en sebo humano (Stewart ME et al, *J Invest Dermatol* (1984) 82:74-78); Sin embargo, la supresión no selectiva de sebo puede conducir a piel seca (Shalita AR, et al, *Clin Ther* (2004) 26:1865-1873).

50

[0120] La capacidad de THPED de afectar selectivamente el contenido de escualeno presente en sebo humano sin afectar a otros componentes del sebo se ilustra por su capacidad para reducir selectivamente el contenido de escualeno presente en la piel humana usando el siguiente ensayo.

55

60

[0121] Los métodos utilizados son los descritos anteriormente por Pappas et al. (*J Invest Dermatol* 2002 Ene; 118(1):164-171). En resumen, las muestras de piel de la cara (las cuales de otro modo se habrían desechado) se obtuvieron de pacientes de sexo femenino 45-65 años de edad. Los sujetos eran mujeres sanas sin antecedentes de retinoide o tratamiento con láser o la quimioterapia. Las muestras se obtuvieron a partir de la cirugía de estiramiento facial dentro de 5 horas desde el final de la cirugía. Dos mm golpes de biopsia se tomaron de tejidos ricos en glándulas sebáceas y se cultivaron en medio libre de suero. El medio consistía en DMEM y F12 (3: 1) (Gibco San Diego, CA) como se describió previamente (Guy y Kealy, *Dermatología* 1998; 196 (1): 16-20.) conteniendo, L-glutamina, penicilina-estreptomocina, piruvato de sodio, una mezcla de selenio-insulina-transferrina, y oligoelementos (Gibco San Diego, CA) y 3,3,5-triyodo-L-tironina (Sigma, St Louis, MO). Finalmente, antes de la incubación de las biopsias, la concentración de THPED se ajustó a 25 mM y se añadió acetato marcado con C14 (2 mCi/ml).

65

[0122] Para cada punto experimental, 5 golpes de biopsia se homogeneizaron en 2 ml de CHCl₂: MeOH (2:1) hasta que se obtuvo un homogenado lechoso sin la presencia de restos visuales. El homogeneizado se transfiere a un tubo de vidrio que contiene 1 ml de cloruro de potasio 0,88%. A continuación, el homogeneizador se enjuagó con 2

ml de disolvente de extracción dos veces, y se añadieron estos lavados al extracto combinado. Después de la separación de fases, la fase acuosa se retira y se desecha mientras que el extracto orgánico total restante se evaporó bajo una corriente suave de argón antes del análisis HPTLC.

5 **[0123]** Los componentes de lípidos extraídos de las glándulas explantadas se analizaron por separación cromatográfica en placas Whatman HPTLC de sílice G de 10 x 20 cm que habían sido cargadas previamente con cloroformo, se calienta en un horno de vacío a 105°C durante 30 min y se enfría a temperatura ambiente en un desecador. Después de la detección de los lípidos que se disolvieron en CHCl₃: MetOH (2:1), se revelaron las placas tres veces, como se informó anteriormente (3), como sigue: 1) fase de hexano a la parte superior 2) tolueno, a la parte superior y 3) hexano/éter/ácido acético (70:30:1) de 10 cm desde la parte superior. Entre cada fase móvil, un tiempo de secado de 15 minutos a temperatura ambiente en una campana de humos estándar se llevó a cabo para asegurar la completa evaporación del disolvente. Escualeno, ceras y ésteres de esteroles se separan durante las dos primeras fases, mientras que los diversos lípidos polares se resuelven durante la tercera fase.

15 **[0124]** Muestras de biopsia de la piel facial humana en presencia de THPED demostraron disminución de la acumulación de escualeno sin afectar sustancialmente a otros componentes de sebo tales como triglicéridos. Los resultados de dos experimentos diferentes que comprenden dos donantes diferentes se resumen en la siguiente Tabla XVI:

20 **Tabla XVI**

	Inhibición de acumulación de escualeno, (por cien de vehículo tratado)	Inhibición de acumulación de triglicerida, (por cien de vehículo tratado)
25 THPED (25 um)	44,0 %	2,65 %

30 **[0125]** A diferencia de los compuestos que disminuyen o suprimen la producción de sebo, interfiriendo en la síntesis de los principales lípidos en el sebo humano (triglicéridos, ésteres de ceras y escualeno) THPED se demostró eficaz para reducir selectivamente la formación de escualeno sin afectar a otros componentes del sebo. Los principales lípidos de sebo humano funcionan para mantener la barrera de lípidos en la piel, regulando el contenido de agua de la piel y de este modo evitan que la piel se vuelva seca y agrietada. La disminución del escualeno por THPED podría disminuir la formación de comedon, y la aparición de acné incluyendo pápulas (espinillas), pústulas y cicatrices.

35 Ejemplo 14: Evaluación del Estudio Clínico para la Reducción del tamaño de los poros en la piel

40 **[0126]** Una composición que contiene 2,5% THPED se comparó con una composición de placebo correspondiente a la reducción de tamaño de poro en la piel facial. 31 sujetos fueron incluidos en el estudio, con todos los sujetos que completaron el protocolo. Tabla XVII da a conocer la formulación de las dos composiciones.

45 **Tabla XVII**

	Formulación de THPED	Formulación de Placebo
Ingredientes	% en peso	% en peso
Agua deionizada	88,81	91,31
PVM/MV polímero cruzado de decadiene	1,5	1,5
50 Disodio de EDTA	0,1	0,1
Cocoato de Sucrosa	0,75	0,75
Gliceridas Cápricas/Caprílicas PEG-6	0,75	0,75
Glicol de Hexileno	1	1
55 Hidróxido de Sodio	0,59	0,59
Talc #2 Guangxi H8162	0,5	0,5
Nilón 12	1	1
Quaternium de Silicona -13	1	1
Alcohol de etilo	0,5	0,5
60 THPED	2,5	--
Fenoxietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, y Propilparaben	1	1

65

5 se aplicó en torno a 0,45-0,52 g de cada composición en un lado de la cara para cada sujeto y se dejó secar. Cada
 composición se aplica sólo una vez a la zona durante la duración de este estudio. Al inicio del estudio y 45 minutos
 después de la aplicación de la composición, se tomaron imágenes digitales en paralelo con polarización de toda la
 cara para documentar los cambios observados en el tamaño de los poros. La reducción de tamaño de poro se
 10 evaluó mediante análisis por ordenador de imágenes polarizadas en paralelo de la cara.

[0127] El análisis por ordenador de imágenes polarizadas en paralelo demostró que 74,2% de los sujetos tratados
 con THPED obtiene una reducción en el tamaño de los poros. El tratamiento THPED dio como resultado una
 respuesta del 19,4% mayor reducción de poros que el placebo solo.

15 **[0128]** La Tabla VIII ilustra el porcentaje total de reducción de poros en los respondedores sujetos al tratamiento
 THPED sobre el placebo.

Tabla VIII

	THPED
% de reducción de tamaño de poro sobre placebo	7,11% *

25 donde, utilizando una prueba t pareada, se calcularon los siguientes valores de significación:

* = p <0,01 frente a placebo

30 **[0129]** Tabla XIX ilustra el por cien de los sujetos que observaron una reducción medible de tamaño de poro.

Tabla XIX

	% de sujetos con reducción de poros	
	THPED	Placebo
% de sujetos	74,2% *	54,8%

40 Por lo tanto, se demostró que THPED inhibía la reducción de la aparición de poros en 74,2% de los sujetos.

45

50

55

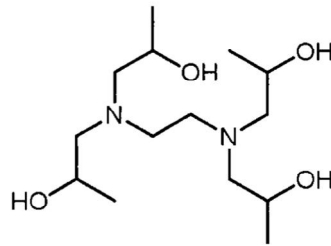
60

65

Reivindicaciones

5 1. Un método de tratamiento de al menos un signo de envejecimiento en la piel apretando la piel flácida, floja o suelta, dicho método seleccionado del grupo que consiste en la mejora de la elasticidad de dicha piel, la mejora de la firmeza de dicha piel, y la reducción de la aparición de arrugas o la celulitis en la piel, método que comprende la administración a la piel en necesidad de dicho tratamiento de una composición que comprende dichos N, N, N', N'-tetraquis (2-hidroxiopropil) etilendiamina:

10



15

20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende la mejora de la elasticidad de dicha piel.

30 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende la mejora de la firmeza de dicha piel.

4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende la reducción de la aparición de arrugas en la piel.

35

40

45

50

55

60

65