

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 262**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60	(2006.01) A61P 17/06	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01) A61P 17/16	(2006.01)
A61K 31/07	(2006.01) A61P 19/02	(2006.01)
A61K 31/11	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/192	(2006.01)	
A61K 31/203	(2006.01)	
A61K 31/232	(2006.01)	
A61K 31/7008	(2006.01)	
A61Q 19/00	(2006.01)	
A61Q 19/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2011 PCT/FR2011/050732**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO2011121250**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2011 E 11720140 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2552397**

54 Título: **Composición cosmética y farmacéutica que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina y un compuesto de la familia de la vitamina A**

30 Prioridad:

02.04.2010 FR 1052536

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2017

73 Titular/es:

**LIBRAGEN (100.0%)
3 rue des Satellites Bâtiment Canal Biotech
31000 Toulouse, FR**

72 Inventor/es:

**AURIOL, DANIEL;
LEFEVRE, FABRICE;
NALIN, RENAUD y
REDZINIAK, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 262 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición cosmética y farmacéutica que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina y un compuesto de la familia de la vitamina A

Campo de la invención

- 5 La presente invención hace referencia a los campos cosméticos y terapéuticos.

Contexto de la invención

10 La D-glucosamina (glucosamina) es un aminoazúcar que es un precursor importante de la síntesis bioquímica de proteínas y glicolípidos. Se usa comúnmente en el tratamiento de la artrosis, aunque su aceptación como terapia varía. Se cree que la glucosamina favorece la formación y reparación del cartílago. En 2001, un ensayo clínico de tres años con doble anonimato que implicaba a 212 pacientes aquejados de artrosis (Reginster *et al.*, 2001, Lancet, 357, 251-6) mostró una mejora de los síntomas de 20 a 25 % en el grupo que tomaba glucosamina, mientras que el grupo de placebo mostró un ligero deterioro. El examen con rayos X mostró una grave disminución del espacio articular de la rodilla (signo de progresión de la enfermedad) para la mitad de los pacientes que tomaban glucosamina.

15 La D-N-acetilglucosamina (N-acetilglucosamina) es un derivado de glucosamina que presenta una mejor estabilidad. La glucosamina y la N-acetilglucosamina son metabolitos clave de funciones bioquímicas o están presentes en polímeros estructurales humanos y animales. Entre estos polímeros, los glicosaminoglicanos son polisacáridos largos no ramificados que consisten en una única unidad disacáridica repetida. La unidad repetida es una hexosa (6 átomos de carbono) o un ácido hexurónico ligado a una hexosamina (6 átomos de carbono que comprenden un
20 nitrógeno, como N-acetilglucosamina). Son ejemplos de glicosaminoglicanos el sulfato de condroitina (cartílago elástico, cartílago de hialina, hueso, dermis, córnea), el sulfato de dermatano (dermis, tendón, ligamento, cartílago fibroso), el sulfato de queratano (cartílago, córnea), la heparina/sulfato de heparano (hígado, pulmón, aorta) y el hialuronano (piel).

25 Los glicosaminoglicanos son un componente importante del tejido conectivo y pueden representar hasta un 30 % de la materia orgánica. Las cadenas de glicosaminoglicanos pueden estar ligadas de manera covalente con una proteína formando proteoglicanos. Por su densidad en subunidades de azúcar y sus cargas atractoras de iones negativos, el agua se adhiere a los glicosaminoglicanos, procurando así a los tejidos una resistencia aumentada a la presión. Los ejemplos de usos de glicosaminoglicanos incluyen heparina como anticoagulante, condroitinas que se encuentran en tejidos conjuntivos, cartílago y tendones y hialuronano que es un componente de la estructura
30 extracelular de la piel y lubricante del líquido sinovial en las articulaciones.

Por sus funciones mecánicas, estructurales y fisiológicas, los glicosaminoglicanos son polímeros importantes para la vida y la regulación de su metabolismo es un elemento importante de la salud humana y animal. Así, existe la necesidad constante de composiciones que permitan modular la producción de glicosaminoglicanos.

35 De manera interesante, la N-acetilglucosamina se ha usado para diferentes aplicaciones en el campo de la salud y la cosmética por su capacidad de estimular la síntesis de hialuronano. La N-acetilglucosamina se produce bien por hidrólisis ácida de la quitina contenida en el caparazón de gambas o cangrejos o bien por fermentación (al menos para la glucosamina, que puede acetilarse a continuación). Se ha descrito una formulación tópica de N-acetilglucosamina en la solicitud de patente US008/0020997. El documento EP1384482 describe la combinación de N-acetilglucosamina y un retinoide o provitamina A para aumentar la producción de ácido hialurónico.

40 El 6-fosfato de N-acetilglucosamina es una forma fosforilada en C6 de N-acetilglucosamina. Se ha demostrado que el 6-fosfato de N-acetilglucosamina es un intermedio en la síntesis de glicosaminoglicanos tales como hialuronano. En esta ruta específica, se isomeriza el 6-fosfato de N-acetilglucosamina a 1-fosfato de N-acetilglucosamina antes de activarse en forma de UDP-N-acetilglucosamina e incorporarse al polímero (véase la Figura 1). El 6-fosfato de N-acetilglucosamina es por tanto un metabolito intermedio que se produce en las células (compuesto endógeno) y que
45 no se sintetiza para excretarse en el espacio pericelular. Parece además que el 6-fosfato de N-acetilglucosamina no se produce por células de mamífero directamente a partir de N-acetilglucosamina.

50 Los azúcares fosforilados son bien conocidos por ser compuestos de alta energía usados por las células en las intersecciones de varias vías metabólicas. La mayoría de los azúcares fosforilados son compuestos transitorios reciclados de manera permanente por las células, como 6-fosfato de glucosa o 6-fosfato de fructosa. Al ser un metabolito intermedio en las células, los azúcares fosforilados son difícilmente aislables en cantidades suficientes a costes razonables para permitir ensayarlos. Además, los azúcares fosforilados son inestables y se hidrolizan rápidamente por las fosfatasa celulares y bacterianas a sus porciones azucaradas no fosfatadas correspondientes, excluyendo así su uso directo.

55 Aunque un solo documento, GB 896940, menciona en 1962 el uso de 6-fosfato de N-acetilglucosamina entre los derivados de N-acetilglucosamina para favorecer la cicatrización de heridas (sin proporcionar ningún dato experimental con este compuesto), ningún documento accesible al público o a la comunidad científica describe, a

nuestro entender, la evaluación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina por estos efectos potenciales terapéuticos o cosméticos.

Así, sigue siendo una necesidad constante poner a punto composiciones cosméticas y farmacéuticas que influyan en la producción de glicosaminoglicanos y su campo de uso es muy amplio.

5 Resumen de la invención

Los inventores han demostrado las propiedades sorprendentes e inesperadas del 6-fosfato de N-acetilglucosamina como compuesto exógeno sobre células humanas, especialmente en la producción de glicosaminoglicanos, demostrando así su utilidad en composiciones farmacéuticas, veterinarias y cosméticas, solo o en combinación con otros compuestos, en particular un compuesto de la familia de la vitamina A, con el fin de promover efectos beneficiosos sobre la salud y la estética. Han demostrado igualmente un efecto sinérgico para la combinación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con un compuesto de la familia de la vitamina A.

El objeto de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información no comprendida en las reivindicaciones se proporciona a modo de información.

La presente invención hace referencia por tanto al uso de una composición cosmética que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo cosméticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A para el tratamiento de pieles secas o para el tratamiento o la prevención del envejecimiento de la piel o las faneras, en particular para el tratamiento o la prevención de arrugas, en particular arrugas profundas y/o arrugas pequeñas, para la mejora de la elasticidad y/o del tono de la piel, para la reafirmación de la piel y/o para la regeneración/reforzamiento de la unión epidermodérmica y/o para aumentar la proliferación de células cutáneas (en particular, queratinocitos y fibroblastos) y/o para aumentar la síntesis de macromoléculas estructurales (en particular hialuronano y/o colágeno).

La presente invención hace referencia muy particularmente a una composición cosmética que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo cosméticamente aceptable y además un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster del mismo, retinal o retinaldehído (cis o trans), ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos. En un modo de realización aún más preferido, el compuesto de la familia de la vitamina A es retinol o un éster de mismo. Esta composición puede adaptarse a una administración tópica, oral o inyectable (en particular, adaptarse a una inyección intraepidérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o microinyección).

La presente invención hace referencia igualmente a una composición farmacéutica o veterinaria que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para el uso en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, eccema, trastornos articulares, trastornos ligados al déficit de cartílago y derrames de sinovia, para viscosuplementación y en tratamientos que acompañan a las intervenciones quirúrgicas del ojo. Comprende además un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster del mismo, retinal o retinaldehído (cis o trans), ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos. En un modo de realización aún más preferido, el compuesto de la familia de la vitamina A es retinol o un éster del mismo. Esta composición puede adaptarse a una administración tópica, oral o inyectable (en particular, adaptarse a una inyección intradérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o intramuscular y/o intravenosa y/o microinyección y/o intraarticular).

La presente invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica o veterinaria que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster del mismo, retinal o retinaldehído (cis o trans), ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos. En un modo de realización aún más preferido, el compuesto de la familia de la vitamina A es retinol o un éster del mismo. Se refiere a una composición según este modo de realización para la reparación y/o regeneración de tejidos dañados.

La presente invención se refiere al uso de 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria o un medicamento para uso en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, eccema, trastornos articulares, trastornos ligados al déficit de cartílago y derrames de sinovia, para viscosuplementación y en tratamientos que acompañan a intervenciones quirúrgicas del ojo.

La presente invención hace referencia finalmente a un dispositivo que comprende una composición farmacéutica, veterinaria o cosmética según la presente descripción, estando adaptado el dispositivo a una inyección (preferiblemente intraepidérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o microinyección y/o en el espacio articular) o a una administración tópica.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1: Esquema de la ruta de síntesis de hialuronano en células de mamíferos.

Figura 2: Análisis de la morfología de la piel después del tratamiento con 6-fosfato de N-acetilglucosamina.

Figura 3: Análisis de la producción de glicosaminoglicanos en la piel después del tratamiento con 6-fosfato de N-acetilglucosamina.

5 Figura 4: Análisis de la expresión del receptor CD44 en la piel después del tratamiento con 6-fosfato de N-acetilglucosamina.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han ensayado e identificado por primer vez los efectos del 6-fosfato de N-acetilglucosamina como compuesto exógeno (es decir, obtenido según un procedimiento técnico que no emplea ningún constituyente del cuerpo humano) sobre células humanas.

10 Han mostrado que, sorprendentemente, esta entidad química puede usarse en composiciones farmacéuticas, dermatológicas, veterinarias y cosméticas, sola o en combinación con otros compuestos, en particular aquellos de la familia de la vitamina A, para promover efectos beneficiosos sobre la salud y la estética a través de diferentes mecanismos que incluyen:

- 15 – la estimulación de la síntesis celular de macromoléculas estructurales del cuerpo humano, incluyendo glicosaminoglicanos como hialuronano y colágenos, en particular procolágeno 1;
- el aumento de la producción de CD44, receptor de ácido hialurónico;
- la estimulación de la división celular, en particular la de queratinocitos y fibroblastos y
- el reforzamiento de la unión dermoepidérmica.

20 Más precisamente, los inventores han demostrado la capacidad del 6-fosfato de N-acetilglucosamina de aumentar la producción de hialuronano por queratinocitos o fibroblastos. Además, han demostrado la capacidad del 6-fosfato de N-acetilglucosamina de estimular la división celular de fibroblastos. El 6-fosfato de N-acetilglucosamina permite así aumentar la síntesis de colágeno, en particular de procolágeno 1, por los fibroblastos, especialmente cuando se tratan con el sobrenadante de queratinocitos tratados por la combinación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con compuestos de la familia de la vitamina A. Finalmente, en modelos de piel humana, los inventores han mostrado que
 25 el tratamiento por 6-fosfato de N-acetilglucosamina permite estimular la síntesis de glicosaminoglicanos, y esto de manera bien distribuida por toda la dermis, estimular la unión dermoepidérmica y estimular la expresión del receptor CD44 en dermis y epidermis.

Además, los inventores han puesto de manifiesto los efectos sinérgicos o potenciadores de la combinación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con los compuestos de la familia de la vitamina A, en particular retinol.

30 Por el contrario, la N-acetilglucosamina, sola o en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A, muestra efectos desfavorables, o no muestra efectos, o muestra efectos que no son comparables con los del 6-fosfato de N-acetilglucosamina.

El colágeno representa igualmente un grupo muy importante de polímeros estructurales en el cuerpo humano. El colágeno es la proteína más abundante del organismo, representando un 25-35 % del contenido total de proteínas del organismo. Se produce por las células del tejido conjuntivo. El procolágeno 1 se encuentra en particular en tendones, piel, pared arterial, endomisio de fibras musculares estriadas, fibrocartilago y la parte orgánica de huesos y dientes. Es un constituyente importante de la matriz extracelular de la dermis, desempeñando un papel en la integridad de la piel. El envejecimiento de la epidermis es debido a una atrofia de la epidermis, consecuencia del
 35 ralentizamiento de la proliferación de queratinocitos. Conlleva además una disminución del colágeno y por tanto un adelgazamiento de la dermis, teniendo como factor agravante la exposición al sol o a UV y el tabaquismo. El colágeno y el ácido hialurónico son conocidos como agentes para luchar contra las arrugas y arrugas pequeñas.

La unión dermoepidérmica es igualmente crucial para la buena nutrición de la epidermis y la elasticidad de la piel.

Esto es por lo que el 6-fosfato de N-acetilglucosamina, en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A, presenta un interés cierto en una composición cosmética para prevenir o disminuir los efectos del
 45 envejecimiento de la piel o las faneras, en particular de los cabellos. Dicha composición es por tanto útil para prevenir o disminuir las arrugas, en particular las arrugas profundas y/o arrugas pequeñas, para mejorar la elasticidad cutánea y para reafirmar la piel. En un modo de realización en que la composición de la invención se inyecta (en particular microinyección), es útil para el relleno de arrugas y arrugas pequeñas y para aumentar el volumen de los labios. En este modo de realización, puede comprender además o usarse en combinación con
 50 productos de relleno, especialmente productos reabsorbibles como ácido hialurónico, grasas, colágeno o proteínas no reabsorbibles como geles de poliacrilamida o siliconas. Puede usarse también para la regeneración o el reforzamiento de la unión epidermodérmica. Puede usarse para la estimulación de células cutáneas (especialmente melanocitos, queratinocitos y/o fibroblastos), por ejemplo aumentando su proliferación y/o la migración celular y/o la

síntesis de macromoléculas estructurales, especialmente colágeno y hialuronano. Esta composición permite por tanto mantener y/o reforzar la dermis y/o epidermis, mantener y/o reforzar su grosor y mantener y/o reforzar la tonicidad y elasticidad de la piel. Esta composición se adapta para los cuidados del cuerpo y/o de la cara y/o del cuello y/o de los cabellos.

5 En un primer modo de realización particular, el 6-fosfato de N-acetilglucosamina y el compuesto de la familia de la vitamina A pueden ser los únicos principios o agentes activos de la composición. En otro modo de realización particular, el compuesto comprende otros agentes o principios activos. Se detallan más adelante ejemplos de estos otros agentes o principios activos. Se entiende por principio o agente activo compuestos que presentan un efecto biológico.

10 En esta aplicación, la composición cosmética puede formularse para adaptarse a una administración por vía oral, por vía tópica a la piel, el cuero cabelludo o los cabellos, o por inyección intraepidérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o microinyección.

15 La composición cosmética según la presente invención para administración tópica puede estar en forma de soluciones acuosas, hidroalcohólicas, emulsiones (aceite en agua (Ac/Ag), agua en aceite (Ag/Ac) o múltiple (por ejemplo, Ac/Ag/Ac o Ag/Ac/Ag triple)), nanoemulsiones, geles acuosos o dispersiones de fase grasa en una fase acuosa. Puede formularse en forma de una crema más o menos fluida, un gel, un hidrogel, un producto filmogénico (especialmente basado en ácido hialurónico de alto peso molecular que tiene la propiedad de capturar el agua y formar un gel al extenderse), una loción, una mascarilla, una leche, un aceite, un ungüento, una cera, una espuma, una pasta, un suero, una pomada, un aerosol, una barra, un jabón o un champú.

20 La composición cosmética adaptada a una administración tópica puede emplearse en combinación con elementos mecánicos tales como dispositivos de palpado y rodado que tienen una acción mecánica y amasadora que hace penetrar el producto y activan la circulación del producto o sistemas emisores de ondas (luz, bajas frecuencias, frecuencias infrarrojas, etc.) que permiten activar la respuesta de la piel o aumentar directamente el efecto del producto.

25 La composición cosmética según la presente invención para administración oral puede estar en forma de sello, píldora, gragea, jarabe o comprimido.

La composición cosmética según la presente invención para administración inyectable se formula preferiblemente en forma estéril. Puede presentarse también en forma de polvo, añadiéndose el disolvente extemporáneamente en el momento del uso.

30 Los componentes de la composición cosmética, así como sus proporciones, pueden elegirse fácilmente por el especialista en la materia basándose en sus conocimientos generales. Por ejemplo, la composición puede incluir, de manera no exhaustiva, agua desionizada, magnesio, silicato de aluminio, goma de xantano, nailon 12, PCA de sodio, propilenglicol, óxidos de hierro rojos, talco, óxidos de hierro amarillos, óxidos de hierro negros, dióxido de titanio, estearato de glicerol, ácido esteárico, fosfato de DEA-cetilo, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, isobutilparabeno o neopentanoato de isoestearilo, palmitato de isopropilo, etileno/propileno/estireno, copolímeros, copolímero de butileno/propileno/estireno, fenoxietanol, acetato de tocoferilo, glicerina, trietilamina, ácido esteárico, estearato de propilenglicol, aceites minerales, diazolidinilurea, poliisobuteno hidrogenado, palmitato de octilo, neopentanoato de tridecilo, neopentanoato de octildodecilo, perfumes, metoxicinamato de octilo, benzofenona, salicilato de octilo, isoestearato de isopropilo, acetato de isoceteth-3 y combinaciones de los mismos.

40 La composición cosmética puede estar igualmente comprendida en un dispositivo adaptado al modo de administración considerado.

45 Dichos dispositivos pueden adaptarse a una administración tópica. Pueden citarse especialmente parches, apósitos oclusivos, minicámaras de oclusión, etc. Se entiende por parche cualquier tipo de parche conocido por el especialista en la materia, y especialmente aquellos que generan una ligera corriente al nivel de la piel cuando se pegan sobre la misma, permitiendo favorecer la penetración del producto en la misma. Se entiende por minicámaras de oclusión un dispositivo de tipo bolsita que se pega a la piel, lleno de composición cosmética, y que permite mantener una cantidad alta de esta composición en contacto con la piel para aumentar la cantidad de producto que se va a difundir en la misma.

50 Otros dispositivos se adaptarán a una inyección, en particular se adaptarán a una inyección intraepidérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o microinyección. Dichos dispositivos pueden comprender una aguja, microagujas o un dispositivo de inyección sin aguja. Dichos dispositivos son bien conocidos en mesoterapia. La invención hace referencia a kits que comprenden la composición según la presente invención y una jeringa o un dispositivo inyector.

55 Una composición que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina, eventualmente en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A, puede ser igualmente útil para la producción de tejidos humanos *in vitro* o *ex vivo*, especialmente de piel sintética, por ejemplo en el contexto de la ingeniería tisular. Así, la presente invención

hace referencia a un método para producir un tejido humano, preferiblemente un tejido cutáneo o conjuntivo, que comprende la puesta en contacto de las células del tejido, o conducidas a formar el tejido, con una composición que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A. Preferiblemente, las células comprenden queratinocitos y/o fibroblastos.

5 Por el impacto del 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A sobre la síntesis de glicosaminoglicanos, en particular hialuronano, puede usarse una composición farmacéutica o veterinaria que comprenda dicho o dichos principios activos en el tratamiento o la prevención de trastornos articulares o aquellos ligados al déficit de cartílago, por ejemplo como artritis, artrosis, osteoartritis y osteoartrosis, en la estimulación de la síntesis de lubricante natural, en la viscosuplementación y/o en el tratamiento del derrame de sinovia en seres humanos y animales. En la presente solicitud, los animales considerados son preferiblemente mamíferos, por ejemplo caballos o animales de compañía como perros y gatos. La presente invención hace por tanto referencia al uso de 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento o la prevención de trastornos articulares o aquellos ligados al déficit de cartílago, por ejemplo como artritis, artrosis, osteoartritis y osteoartrosis, para la estimulación de la síntesis de lubricante natural, para la viscosuplementación y/o destinada al tratamiento del derrame de sinovia en seres humanos y animales.

20 Hace referencia también a un método de tratamiento de trastornos articulares o aquellos ligados al déficit de cartílago, por ejemplo como artritis, artrosis, osteoartritis y osteoartrosis, a un método de tratamiento del derrame de sinovia, a un método de viscosuplementación o de estimulación de la síntesis de lubricante natural en un ser humano o un animal que lo necesite, que comprende la administración de una dosis eficaz de 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A. En las aplicaciones previstas en este modo de realización, puede administrarse 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A o formularse en una forma adaptada a administración tópica, oral o por inyección. La inyección puede hacerse, por ejemplo, mediante inyección en el espacio intraarticular, subcutánea o intramuscular.

25 Por otro lado, en consideración de los efectos beneficiosos del 6-fosfato de N-acetilglucosamina sobre la piel, puede usarse una composición farmacéutica, dermatológica o veterinaria que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A para el tratamiento o la prevención de psoriasis, eccema, dermatitis atópica o pieles secas.

30 En consideración del efecto excepcional de la combinación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con un compuesto de la familia de la vitamina A, especialmente sobre la producción de hialuronano por queratinocitos y fibroblastos, sobre la división celular de los fibroblastos y sobre la producción de colágeno por los fibroblastos, la presente solicitud considera muy particularmente una composición farmacéutica, dermatológica o veterinaria que comprenda esta combinación. Esta composición es útil en la regeneración de tejidos dañados. Así, la presente invención hace referencia al uso de 6-fosfato de N-acetilglucosamina y un compuesto de la familia de la vitamina A para la preparación de una composición farmacéutica, dermatológica o veterinaria destinada a la regeneración de tejidos dañados o a un método para regenerar los tejidos dañados en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración de una cantidad eficaz de 6-fosfato de N-acetilglucosamina y un compuesto de la familia de la vitamina A.

40 En particular, las composiciones farmacéuticas, dermatológicas o veterinarias de la invención pueden usarse en un tratamiento que acompaña o posterior a intervenciones quirúrgicas del ojo (por ejemplo, trasplante de córnea, glaucoma, desprendimiento de retina o catarata), intervenciones quirúrgicas o dermatológicas de la piel (por ejemplo, estiramiento, inyecciones de productos, en particular productos de relleno, exfoliación, blanqueamiento, dermoabrasión y tratamiento del acné) e intervenciones quirúrgicas del abdomen.

45 Para todas las aplicaciones descritas en la presente solicitud, ha de considerarse que las formulaciones siguientes son sustituibles entre sí:

- composición farmacéutica o veterinaria que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A, para uso para...
- uso de 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A, para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria para...
- producto que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A como producto de combinación para uso simultáneo, separado o escalonado en el tiempo para...
- método para... en un sujeto que lo necesita que comprende la administración de una cantidad eficaz de 6-fosfato de N-acetilglucosamina farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de la familia de la vitamina A.

Para todas estas aplicaciones, un modo de realización reside en el uso combinado de 6-fosfato de N-acetilglucosamina y un compuesto de la familia de la vitamina A, en particular retinol, o en una composición que comprenda dicha combinación.

5 La composición farmacéutica o veterinaria puede formularse para adaptarse a una administración por vía oral, por inhalación, tópica (especialmente sobre la piel, cuero cabelludo, ojo o una mucosa, por ejemplo bucal, vaginal o nasal), rectal, o por inyección parenteral, intraepidérmica, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional o intracraneal o por técnicas de infusión. Preferiblemente, la composición farmacéutica o veterinaria puede formularse para adaptarse a una administración por vía oral, por inhalación, tópica (especialmente sobre la piel, cuero cabelludo, ojo o una mucosa, por ejemplo bucal, vaginal o nasal), rectal o por inyección intraepidérmica, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intraarticular o intrasinovial. Por ejemplo, la composición farmacéutica o veterinaria puede formularse en forma de sellos, comprimidos, cápsulas, comprimidos, jarabes, cremas, lociones o geles. La composición puede comprender excipientes cuya lista no exhaustiva incluye talco, lactosa, estearato de magnesio, monoestearato de glicerol, dióxido de silicio coloidal o precipitado, polivinilpirrolidona reticulada, fosfato de calcio dibásico dihidratado, celulosa microcristalina, almidón, povidona, carboximetilcelulosa de sodio, polisorbato 80, ácido láctico, carbómero, alcohol cetílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, glucosa, dextrosa, trietilamina, glicerina, fructosa, sacarosa, polímeros y nanoestructuras. La composición farmacéutica o veterinaria puede estar comprendida igualmente un dispositivo adaptado al modo de administración considerado. Las formulaciones descritas para la composición cosmética pueden aplicarse a la composición farmacéutica o veterinaria.

20 En el caso de formulaciones orales, y en particular de comprimidos, el vehículo comprende a menudo lactosa y almidón. Se añaden igualmente agentes lubricantes como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, los diluyentes incluyen lactosa y almidón. Para las suspensiones acuosas, se combina el ingrediente activo con emulsionantes y agentes de suspensión. Es igualmente posible incorporar agentes edulcorantes, colorantes o gustativos.

25 En el caso de formulaciones rectales, como supositorios, estas formulaciones pueden prepararse mezclando el principio activo con excipientes adaptados que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura rectal. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

30 Para administración tópica, la composición puede formularse especialmente en forma de ungüento que contiene el principio activo disuelto o suspendido en los vehículos apropiados. Dichos vehículos incluyen de manera no exhaustiva aceites minerales, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, puede formularse en forma de crema o de loción que contiene el principio activo disuelto o suspendido en vehículos apropiados. Dichos vehículos incluyen de manera no exhaustiva aceites minerales, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

35 Para aplicación oftálmica, la composición puede formularse en forma de suspensión micronizada en una solución salina estéril isotónica a pH ajustado o, preferiblemente, en forma de solución en una solución salina estéril isotónica a pH ajustado, sin o con conservante antimicrobiano tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, la composición puede formularse así en forma de ungüento que contiene un material como vaselina.

40 En las formas inyectables, la composición puede ser una suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas bien conocidas por el especialista en la materia usando agentes humectantes o dispersantes y agentes de suspensión. Preferiblemente, estará en forma de solución o suspensión estéril. Los disolventes y vehículos aceptables incluyen de manera no exhaustiva agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se usan a menudo aceites estériles no volátiles en el medio de suspensión o el disolvente. Con este objetivo, puede usarse un aceite no volátil cualquiera mezclado, como monoglicéridos y diglicéridos. Los ácidos grasos como ácido oleico y sus derivados glicéridos son igualmente útiles en la preparación de composiciones inyectables, al igual que aceites naturales farmacéuticamente aceptables como aceite de oliva y aceite de ricino, en particular sus versiones polioxietilenadas. Estas soluciones aceitosas pueden comprender agentes de suspensión o de dilución como carboximetilcelulosa para la formulación de emulsiones y suspensiones. Pueden incluirse también tensioactivos como Tween, agentes emulsionantes y agentes que aumenten la biodisponibilidad.

50 El 6-fosfato de N-acetilglucosamina es un compuesto que no está disponible en gran cantidad. Se prepara por tanto preferiblemente mediante el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO08/142155 (en particular en el ejemplo 1).

55 Especialmente, se mezcla la N-acetilglucosamina de fuente marina (derivada de la quitina de gambas o cangrejos) con fosfato inorgánico seleccionado y la enzima fosforilante adaptada en un reactor que contiene agua y sales durante varias horas. Durante esta reacción, la enzima injerta un fosfato sobre la N-acetilglucosamina para dar 6-fosfato de N-acetilglucosamina. Este compuesto puede purificarse entonces con la ayuda de varias etapas de precipitación usando diferentes alcoholes (tales como isopropanol y/o etanol). Se purifica la solución acuosa final sobre una resina intercambiadora de iones para retirar los iones restantes. El 6-fosfato de N-acetilglucosamina

puede concentrarse en agua y esterilizarse por microfiltración (filtro de 0,2 μm). La pureza final puede evaluarse mediante métodos analíticos. Este método permite preparar 6-fosfato de N-acetilglucosamina que puede usarse directamente a partir de la solución acuosa concentrada o que puede secarse para obtener un polvo cristalino que se disuelve rápidamente en una fórmula acuosa cualquiera.

- 5 El 6-fosfato de N-acetilglucosamina puede usarse igualmente en las composiciones y productos de la descripción en forma de sales, en particular una sal farmacéutica o cosméticamente aceptable. Así, dichas sales incluyen especialmente sales de adición de ácidos, sales de adición de bases, sales metálicas y sales de amonio o alquilamonio, en particular aquellas farmacéutica o cosméticamente aceptables. Las sales de adición de ácidos incluyen las sales inorgánicas y las sales orgánicas. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adaptados
10 comprenden ácidos clorhídrico, bromhídrico, yódico, fosfórico, etc. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adaptados comprenden los ácidos acético, fórmico, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, tricloroacético, trifluoroacético, etc. Se proporcionan otros ejemplos de sales de ácidos orgánicos o inorgánicos en *J. Pharm Sci.*, 1977, 66, 2 y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" editado por P. Heinrich Stahl y Camille G. Wermuth, 2002. Los ejemplos de sales metálicas incluyen las sales de
15 litio, sodio, potasio o magnesio, etc. Los ejemplos de sales de amonio y alquilamonio incluyen las sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio, etc. Los ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolaminolina, etc.

Las composiciones de la presente invención, sean cosméticas, farmacéuticas, dermatológicas o veterinarias, pueden comprender un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente aceptable en el campo cosmético,
20 farmacéutico, dermatológico o veterinario, respectivamente.

Se entiende por "compuesto de la familia de la vitamina A" en la presente solicitud un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en retinol (también llamado vitamina A) o un éster del mismo, retinal o retinaldehído (cis o trans), ácido retinoico (trans), retinaldehído, isotretinoína (ácido cis-retinoico), adapaleno, tretinoína (ácido retinoico, trans) y la mezcla de los mismos. Preferiblemente, el compuesto se selecciona entre el grupo consistente en retinol o
25 un éster del mismo, retinal o retinaldehído (cis o trans), ácido retinoico, retinaldehído, isotretinoína, tretinoína o la mezcla de los mismos.

En un modo de realización particular, el compuesto de la familia de la vitamina A es retinol o un éster del mismo.

La cantidad de 6-fosfato de N-acetilglucosamina usada en las composiciones y productos de la invención depende del efecto cosmético o terapéutico y puede por tanto variar. En un modo de realización particular, una escala de
30 concentración de 6-fosfato de N-acetilglucosamina comprendida entre aproximadamente 0,001 g/l o g/kg y aproximadamente 1000 g/l o g/kg de composición, y preferiblemente comprendida entre aproximadamente 0,01 g/l o g/kg y aproximadamente 100 g/l o g/kg de composición, y más preferiblemente comprendida entre aproximadamente 0,1 g/l o g/kg y aproximadamente 10 g/l o g/kg de composición parece adaptada, muy particularmente, para una administración tópica.

35 En un modo de realización más preferido, el compuesto de la familia de la vitamina A se combina con 6-fosfato de N-acetilglucosamina en una cantidad sinérgica o potenciadora.

En un modo de realización particular, el compuesto de la familia de la vitamina A, en particular retinol o un éster del mismo, está presente en la composición a una concentración comprendida entre aproximadamente 3 $\mu\text{g/l}$ o $\mu\text{g/kg}$ y
40 aproximadamente 3 g/l o g/kg de composición y preferiblemente entre aproximadamente 100 mg/l o mg/kg y aproximadamente 1,5 g/l o g/kg de composición.

Una de las desventajas del retinol es que genera efectos secundarios indeseable, y especialmente una irritación de la piel. La sinergia o efecto potenciador se ha demostrado a concentraciones bajas, en particular concentraciones más bajas que las usadas generalmente en cosmética y terapia. Así, en un modo de realización preferido, el
45 compuesto de la familia de la vitamina A se combina con 6-fosfato de N-acetilglucosamina en una cantidad no o menos tóxica y no o menos irritante que depende de la aplicación final de la composición. Así, en este modo particular de realización, el compuesto de la familia de la vitamina A, en particular retinol o un éster de mismo, está presente en la composición a una concentración comprendida entre aproximadamente 3 $\mu\text{g/l}$ o $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 50 mg/l o mg/kg de composición y preferiblemente entre aproximadamente 3 $\mu\text{g/l}$ o $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 10 mg/l o mg/kg de composición.

50 Las composiciones y kits de la presente invención pueden comprender además otros componentes, en particular compuestos que presenten un efecto. Especialmente, pueden comprender por ejemplo captadores de radicales libres, preferiblemente polifenoles estabilizados tales como los descritos en la solicitud de patente US 2009/0233876. Por otro lado, pueden comprender también inhibidores de fosfatasa para evitar la degradación del 6-fosfato de N-acetilglucosamina a N-acetilglucosamina, por ejemplo cisteína. Pueden comprender también inhibidores de
55 hialuronidasa para impedir o disminuir la degradación de hialuronano neosintetizado producido bajo la estimulación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina, por ejemplo ácido 6-palmitoil-L-ascórbico o 6-hexadecanoato de ácido ascórbico. Pueden comprender activadores de hialuronano sintasas de manera que aceleren la síntesis de hialuronano estimulada por 6-fosfato de N-acetilglucosamina y tengan una acción sinérgica con el mismo, por

ejemplo, eicosanoides tales como prostaglandina E2 o ácidos retinoicos (trans). Pueden comprender derivados de ácido glucurónico como, por ejemplo, ácido glucurónico, sus sales, ésteres y amidas o ácido UDP-glucurónico, para permitir acelerar la síntesis de hialuronano estimulada por 6-fosfato de N-acetilglucosamina y tener una acción sinérgica con el mismo.

5 La invención se comprenderá aún mejor con la lectura de los ejemplos siguientes.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Estimulación de la producción de ácido hialurónico por queratinocitos humanos tratados con 6-fosfato de N-acetilglucosamina

1. Principio de la prueba

10 Se pusieron en cultivo queratinocitos humanos normales hasta la obtención de células confluentes. Se trataron las células durante 48 h con los productos para evaluar. Se recogieron los sobrenadantes, que contenían ácido hialurónico, y se efectuó la valoración extemporáneamente. Se efectuó la cuantificación del ácido hialurónico mediante una prueba de microplaca de tipo ELISA.

Se realizó la valoración proteica para cada pocillo de la microplaca celular.

15 2. Productos ensayados

Se ensayó 6-fosfato de N-acetilglucosamina (NAG6P) 20, 10 y 5 mM.

3. Preparación de las células

Se obtuvieron los primocultivos de queratinocitos humanos normales (KHN) a partir de células aisladas de extracciones cutáneas (cirugía plástica).

20 Se sembraron los KHN a una densidad de 130.000 células/pocillo en medio de cultivo específico KSFM, (Gibco® Invitrogen) en una placa de 24 pocillos. Se dispuso la placa en una estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h.

4. Tratamiento de las células

25 Se pusieron en presencia de las células los diferentes productos a las concentraciones respectivas (diluciones en el medio de cultivo KSFM, 600 µl) durante 48 h. Se dejaron las células sin tratamiento: condición de testigo.

Se evaluó cada condición de tratamiento de las células en 3 pocillos de queratinocitos humanos normales.

5. Valoraciones de ácido hialurónico

Después de 24 h de tratamiento, se realizó una extracción intermedia de 220 µl de los sobrenadantes para cada pocillo. Se volvió a disponer la placa en la estufa a 37 °C, 5 % de CO₂.

30 Después de 48 h de tratamiento, se extrajeron los sobrenadantes restantes (≈350 µl) y se centrifugaron.

Se efectuó la valoración de los sobrenadantes celulares según el método descrito en el kit Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit (HA-ELISA, Echelon Biosciences Inc.). Se trata de una valoración de tipo ELISA, un revelado por espectrofotometría efectuado a 405 nm (Safire, Tecan).

Para cada pocillo celular, se efectuaron duplicados de las medidas.

35 6. Expresión de resultados

Se reseñaron las medidas de densidad óptica DO obtenidas para cada muestra sobre una gráfica (curva patrón específica del kit). Se determinó la concentración de ácido hialurónico en ng/ml.

7. Síntesis proteica

40 Se trataba de valorar las proteínas presentes en los sedimentos celulares correspondientes a los sobrenadantes para los que se realizó la valoración de ácido hialurónico.

La valoración se expresaba en µg de proteínas por pocillo celular.

El principio del método usado, ácido bicinonínico o BCA, era similar al del método de Lowry.

7.1. Principio

Las proteínas reducen el Cu⁺⁺ a Cu⁺ de forma dependiente de la dosis. El ácido bicinonínico es un cromógeno

altamente específico de los iones Cu^+ , formando con estos últimos un complejo coloreado cuya absorbancia se mide a 550 nm.

7.2. Reactivos

5 Se efectuó la valoración a partir de dos soluciones: el ácido bicinconínico y el sulfato de cobre. Cuando se mezclan estos dos reactivos, forman una solución verde reducida a violeta en presencia de Cu^+ .

Se reagrupan estos reactivos en el kit de valoración BCA-1 de Sigma. Se proporciona igualmente una solución patrón de proteínas (BSA 1 mg/ml en NaCl 0,15 M).

7.3. Valoración de proteínas

10 Después de 48 h de tratamiento, se extrajeron los sobrenadantes de los pocillos de la microplaca para la valoración de ácido hialurónico. A continuación, se despegó el césped celular recuperado en una solución de PBS mediante sonicación y después se disolvió con la ayuda de una solución de NaOH 0,1 M. Se añadió entonces la mezcla de ácido bicinconínico + sulfato de cobre. Se dispuso la placa en estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO_2) en la oscuridad. Después de 30 minutos, se midió la absorbancia a 550 nm (Genios, Tecan).

15 En paralelo, se realizó una escala patrón a partir de una solución madre de BSA 1 mg/ml (P-0914): 0 a 100 μg /pocillo.

Las medidas de densidad óptica de los pocillos se convirtieron en μg de proteínas por pocillo de KHN gracias a la escala.

7.4. Expresión de los resultados

20 Para cada pocillo celular y cada condición de tratamiento, se obtuvo una valoración cuantitativa de la liberación de ácido hialurónico. Esta valoración se ha relacionado con una cantidad de células, expresada en μg de proteínas.

El resultado final se ha expresado entonces en ng/ml de ácido hialurónico/ μg de proteínas.

Se han promediado los valores cuantitativos de los pocillos tratados con la misma concentración de producto. Se ha comparado esta media con la media de las medidas obtenidas para los pocillos testigo (prueba t de Student, comparación de medias, diferencia significativa al 95 % si $p < 0,05^*$ y al 99 % si $p < 0,01^{**}$).

25 Se ha determinado el porcentaje de estimulación de los productos comparando los valores medios de las condiciones testigo y de tratamiento:

$$\% \text{ de estimulación} = (\text{tratado-testigo}) / \text{testigo}$$

Se expresan los resultados en las tablas 1 y 2 (abreviatura: NAG6P: 6-fosfato de N-acetilglucosamina).

24 H 00 – NAG6P	Ácido hialurónico (ng/ml)	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	789,5 ± 229	
NAG6P 10 mM	1067,3 ± 111,9	35 %*

*prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

30 **Tabla 1: Valoración a las 24 h 00 del ácido hialurónico producido por los queratinocitos**

48 h 00- NAG6P	Ácido hialurónico (ng/ml)	Proteínas (μg /pocillo)	(ng/ml/ μg proteína) de	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	1243,4 ± 232,3	17,9 ± 1,4	70,5 ± 18,4	
NAG 6P 20 mM	3076 ± 260,8	11,7 ± 1,9	269,6 ± 55,3	282 %**
NAG 6P 10 mM	2503,2 ± 552,8	15,3 ± 2,9	165,7 ± 32,4	135 %**
NAG 6P 5 mM	1817,9 ± 145,1	15,2 ± 2	122,1 ± 25,6	73 %*

* prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

** prueba de Student: $p < 0,01$ – resultado significativo al 99 %

Tabla 2: Valoración a las 48 h 00 del ácido hialurónico producido por los queratinocitos

Conclusiones:

5 La adición de N-acetilglucosamina a los queratinocitos humanos normales induce la estimulación de la producción de ácido hialurónico por células cutáneas a partir de las 24 h 00, de forma dependiente de la dosis. Este efecto se confirma y refuerza a las 48 h 00 para alcanzar un aumento de la tasa de producción de +282 % con relación a las células que no han recibido 6-fosfato de N-acetilglucosamina.

10 El 6-fosfato de N-acetilglucosamina es por tanto un excelente estimulante de la producción de ácido hialurónico por las células de la piel. El NAG6P presenta por tanto interés por estimular la renovación de la matriz extracelular de la piel a nivel epidérmico, con el fin de limitar la formación de arrugas y arrugas pequeñas o de promover su atenuación, y de favorecer y mantener la hidratación de la piel (gracias a la alta potencia de captura del agua del ácido hialurónico).

EJEMPLO 2: Estimulación de la producción de ácido hialurónico por los queratinocitos humanos tratados con 6-fosfato de N-acetilglucosamina en sinergia con propionato de vitamina A

15 Se realizó un experimento según las condiciones descritas en el ejemplo 1, usando propionato de vitamina A en sinergia con 6-fosfato de N-acetilglucosamina. Se disolvió propionato de vitamina A en DMSO.

Para estas condiciones de prueba de propionato de vitamina A ± NAG 6P, se expresó el porcentaje de estimulación con respecto al control de DMSO (dilución 1/10000 correspondiente a la cantidad de DMSO efectivamente presente) en sustitución del testigo.

Se expresan los resultados en las tablas 3 y 4 (abreviatura: NAG6P: 6-fosfato de N-acetilglucosamina).

24 H sinergia	Ácido hialurónico (ng/ml)	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	789,5 ± 229	
NAG 6P 10 mM	1067,3 ± 111,9	35 %*
Propionato de vit. A 1 µM	1056 ± 186,5	34 %*
NAG 6P 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	1569,6 ± 193	99 %**

20 * prueba de Student: p<0,05 – resultado significativo al 95 %

** prueba de Student: p<0,01 – resultado significativo al 99 %

Tabla 3: Valoración a las 24 h 00 del ácido hialurónico producido por los queratinocitos

48 H sinergia	Ácido hialurónico (ng/ml)	Proteínas (µg/pocillo)	(ng/ml/µg de proteína)	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	1243,4 ± 232,3	17,9 ± 1,4	70,5 ± 18,4	/
NAG6P 10 mM	2503,2 ± 552,8	15,3 ± 2,9	165,7 ± 32,4	135 %**
Control de DMSO ^a	1028,9 ± 122,8	15,6 ± 3,3	66,9 ± 7,7	/
Propionato de vit. A 1 µM	1944,8 ± 393,2	14,3 ± 1	137,1 ± 32,2	105 %*
NAG6P 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	3833,3 ± 216,3	13,5 ± 2	287,4 ± 35,7	330 %**

^acontrol de DMSO: dilución 1/10000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación de NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM.

25 *prueba de Student: p<0,05 – resultado significativo al 95 %

**prueba de Student: p<0,01 – resultado significativo al 99 %

Tabla 4: Valoración a las 48 h 00 del ácido hialurónico producido por los queratinocitos

Conclusiones:

5 Notablemente, se ha observado que, al asociar 6-fosfato de N-acetilglucosamina con propionato de vitamina A, se obtiene un efecto sinérgico sobre la estimulación de la producción de ácido hialurónico por los queratinocitos desde las 24 h 00. De forma aún más notable, este efecto es superior a la suma de los efectos de cada compuesto tomado individualmente (+99 % de aumento de la tasa de ácido hialurónico a las 24 h 00 con los dos compuestos frente a +34 % y +35 % respectivamente para propionato de vitamina A y 6-fosfato de N-acetilglucosamina solos).

10 Este efecto sinérgico se confirma y refuerza al cabo de 48 h 00, ya que la asociación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con propionato de vitamina A induce un aumento de +330 % de la producción de ácido hialurónico por los queratinocitos, frente a +105 % y +135% respectivamente para propionato de vitamina A y 6-fosfato de N-acetilglucosamina solos.

15 La asociación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina con un derivado de vitamina A mejora por tanto la eficacia del 6-fosfato de N-acetilglucosamina sobre la estimulación de la producción de ácido hialurónico por las células de la piel. El NAG6P en sinergia con el propionato de vitamina A presenta por tanto interés para estimular la renovación de la matriz extracelular de la piel a nivel epidérmico, con el fin de limitar la formación de arrugas y arrugas pequeñas o de promover su atenuación, y de favorecer y mantener la hidratación de la piel (gracias a la alta potencia de captura del agua del ácido hialurónico).

EJEMPLO 3: Estimulación indirecta (mediada por los queratinocitos) de la producción de ácido hialurónico por fibroblastos humanos normales gracias al 6-fosfato de N-acetilglucosamina solo o en asociación con propionato de vitamina A, comparación con N-acetilglucosamina

20 1. Principio de la prueba

Se pusieron en cultivo fibroblastos dérmicos humanos normales hasta la obtención de células confluentes. Se trataron las células durante 48 h con sobrenadantes de queratinocitos humanos normales cultivados anteriormente en presencia de los productos para evaluar. Se recogieron los sobrenadantes de fibroblastos, que contenían ácido hialurónico, y se efectúa extemporáneamente la valoración.

25 Se efectuó la cuantificación del ácido hialurónico mediante una prueba en microplaca de tipo ELISA. Se realizó una valoración proteica para cada pocillo de la microplaca celular.

2. Productos ensayados

- 30 * Productos de N-acetilglucosamina (NAG) o 6-fosfato de N-acetilglucosamina (NAG6P) aplicados durante 48 H a 10 y 5 mM sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.
- * Propionato de vitamina A aplicado durante 48 H a 1 µM sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.
- * Asociación de NAG 10 mM + propionato de vitamina A 1 µM aplicada durante 48 h sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.
- 35 * Asociación de NAG6P 10 mM + propionato de vitamina A 1 µM aplicada durante 48 H sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.

3. Preparación de las células

Se obtuvieron los primocultivos de queratinocitos humanos normales (KHN) a partir de células aisladas de extracciones cutáneas (cirugía plástica).

40 Se sembraron los KHN a una densidad de 130.000 células/pocillo en medio de cultivo específico KSFM, (Gibco® Invitrogen) en una placa de 24 pocillos. Se dispuso la placa en una estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h.

Se obtuvieron los primocultivos de fibroblastos humanos normales (FHN) a partir de células aisladas de extracciones cutáneas (cirugía plástica).

45 Se sembraron los FHN a una densidad de 90.000 células/pocillo en medio de cultivo E-199 + 0,5 % de SVF, (Gibco® Invitrogen) en una placa de 24 pocillos. Se dispuso la placa en una estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h.

Se efectuó la puesta en placa de los 2 tipos celulares KHN y FHN con 48 h de intervalo.

4. Tratamiento de las células

Se pusieron los diferentes productos, a las concentraciones respectivas, en presencia de KHN (diluciones en el medio de cultivo KSFM, 600 µl) durante 48 h. Se dejaron las células si tratamiento: condición testigo. Se usaron 2 placas celulares para evaluar separadamente NAG y NAG en asociación con propionato de vitamina A por un lado y después NAG6P y NAG6P en asociación con propionato de vitamina A por otro lado.

5 Se evaluó cada condición de tratamiento de las células en 3 pocillos de KHN.

Después de 48 h, se extrajo una parte de los sobrenadantes celulares de KHN (300 µl/pocillo). Se procedió entonces a la transferencia pocillo a pocillo de los sobrenadantes celulares de KHN a los sobrenadantes celulares de FHN (300 µl de E-199/pocillo, medio reciente sin SVF).

10 Se obtuvo así un volumen final de 600 µl/pocillo de tratamiento (contenido en un medio KSFM/E-199 50/50) que permanece aplicado durante 48 h sobre los FHN.

5. Valoraciones del ácido hialurónico

Después de 48 h de tratamiento, se extrajeron los sobrenadantes celulares de FHN y se centrifugaron. Se efectuó la valoración del ácido hialurónico en los sobrenadantes celulares según el método descrito en el ejemplo 1. Para cada pocillo celular, se efectuaron duplicados de medidas.

15 6. Expresión de los resultados

Se reseñaron las medidas de densidad óptica DO obtenidas para cada muestra sobre una gráfica (curva patrón específica del kit). Se determinó la concentración de ácido hialurónico en ng/ml.

7. Síntesis proteica

20 Se trata de valorar las proteínas presentes en los sedimentos celulares correspondientes a los sobrenadantes para los que se ha realizado la valoración de ácido hialurónico. Se realizó la valoración según el método descrito en el ejemplo 1, y se expresó el resultado en µg de proteínas por pocillo celular.

Para cada pocillo celular y cada condición de tratamiento, se obtuvo una valoración cuantitativa de la liberación de ácido hialurónico. Esta valoración se ha relacionado con una cantidad de células expresada en µg de proteínas.

Se expresó entonces el resultado final en ng/ml de ácido hialurónico/µg de proteínas.

25 Se promediaron los valores cuantitativos de los pocillos tratados con la misma concentración de producto. Se comparó esta media con la media de las medidas obtenidas para los pocillos testigo (prueba t de Student, comparación de medias, diferencia significativa al 95 % si $p < 0,05^*$ y al 99 % si $p < 0,01^{**}$).

Se determinó el porcentaje de estimulación de los productos comparando los valores medios de las condiciones de control y tratamiento:

30 $\% \text{ de estimulación} = (\text{tratado-testigo})/\text{testigo}$

Para las condiciones de propionato de vitamina A ± NAG o NAG6P (transferidas), se expresó el porcentaje de estimulación con respecto al control de DMSO (dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO efectivamente presente) en sustitución del testigo.

Los resultados presentados en las tablas 5 y 6 siguientes corresponden a la media de 3 pocillos.

48 H NAG	Ácido hialurónico (ng/ml)	Proteínas (µg/pocillo)	(ng/ml/µg proteína) de	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	3559,3 ± 374	8,4 ± 0,8	429,9 ± 78,4	/
NAG 10 mM	4056,1 ± 315,5	15,7 ± 0,6	258,8 ± 8,1	-40 %**
NAG 5 mM	4277,6 ± 488	12,2 ± 2,7	358,9 ± 81,8	-17 %
Control de DMSO ^a	3001,7 ± 354,6	8 ± 2,3	387,3 ± 73,4	/
Propionato de vit. A 1 µM	3645,6 ± 667,8	12 ± 3,7	316,6 ± 68	-18 %
NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	4439,4 ± 445,9	10 ± 1,2	443,4 ± 15,2	15 %

^acontrol de DMSO: dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación de NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM,

*prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

**prueba de Student: $p < 0,01$ – resultado significativo al 99 %

5 **Tabla 5: Valoración a las 48 h 00 del ácido hialurónico producido por los fibroblastos, efecto de NAG sola o en asociación con propionato de vitamina A**

48 H NAG 6P	Ácido hialurónico (ng/ml)	Proteínas (µg/pocillo)	(ng/ml/µg de proteína)	% de estimulación de la síntesis de ácido hialurónico
Testigo	3351 ± 287,4	8,9 ± 0,9	375,9 ± 13,5	/
NAG 6P 10 mM	3507,6 ± 213,3	9,2 ± 0,3	382,9 ± 20,5	2 %
NAG 6P 5 mM	3524,1 ± 198,6	8,8 ± 0,5	410,7 ± 38,3	7 %
Control de DMSO ^a	3058 ± 552	8,4 ± 0,7	364,3 ± 54,2	/
Propionato de vit. A 1 µM	3358,8 ± 615,3	8,8 ± 0,9	389,2 ± 108,3	7 %
NAG 6P 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	4075,4 ± 433,4	7,9 ± 0,2	517,6 ± 28,2	42%**

^acontrol de DMSO: dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación de NAG6P 10 mM + propionato de vit. A 1 µM,

*prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

10 **prueba de Student: $p < 0,01$ – resultado significativo al 99 %

Tabla 6: Valoración a las 48 h 00 del ácido hialurónico producido por los fibroblastos, efecto de NAG6P solo o en asociación con propionato de vitamina A

Conclusiones:

15 Después de haber incubado durante 48 h 00 los queratinocitos en presencia de NAG sola o propionato de vitamina A solo, tras haber transferido el sobrenadante de estas células sobre fibroblastos, se observó una disminución de la síntesis de ácido hialurónico por estos fibroblastos (disminución significativa a NAG 10 mM). El mismo experimento realizado combinando NAG en asociación con propionato de vitamina A conduce a una baja estimulación del 15 % de la producción de ácido hialurónico por los fibroblastos que han recibido el sobrenadante de cultivo de los queratinocitos.

20 De forma sorprendente, incubando en las mismas condiciones los queratinocitos en presencia de NAG6P sola o de propionato de vitamina A solo, y tras haber transferido el sobrenadante de estas células sobre fibroblastos, se observó una pequeña estimulación de la síntesis de ácido hialurónico por estos fibroblastos. El mismo experimento realizado combinando NAG6P en asociación con propionato de vitamina A conduce a una alta estimulación del 42 % de la producción de ácido hialurónico por los fibroblastos que han recibido el sobrenadante de cultivo de los queratinocitos.

25 Al contrario que la N-acetilglucosamina, que no ha revelado ningún efecto, el 6-fosfato de N-acetilglucosamina en asociación con propionato de vitamina A es capaz de estimular la producción de ácido hialurónico por las células dérmicas a través de los queratinocitos. La asociación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina en asociación con propionato de vitamina A estimula por tanto la producción de ácido hialurónico al nivel de las células situadas naturalmente al nivel de la dermis.

30 La NAG6P en sinergia con propionato de vitamina A presenta por tanto interés por estimular la renovación de la matriz extracelular de la piel al nivel dérmico, con el fin de limitar la formación de arrugas y arrugas pequeñas o de promover su atenuación, y de favorecer y mantener la hidratación de la piel (gracias a la alta potencia de captura del agua del ácido hialurónico) en profundidad.

35 **EJEMPLO 4: Estimulación indirecta (mediada por queratinocitos) de la producción de procolágeno 1 por fibroblastos humanos normales gracias a 6-fosfato de N-acetilglucosamina solo o en asociación con propionato de vitamina A, comparación con N-acetilglucosamina**

1. Principio

Se realizó este experimento según el mismo método que se detalla en el ejemplo 3. Se recogen los sobrenadantes de fibroblastos, que contienen procolágeno I, y se efectúa la valoración extemporáneamente. Se efectuó la valoración del procolágeno I mediante una prueba en microplaca de tipo EIA.

5 2. Valoraciones de procolágeno I

Después de 48 h de tratamiento, se extrajeron los sobrenadantes celulares de FHN y se centrifugaron.

Se efectuó la valoración del procolágeno I en los sobrenadantes celulares según el método descrito en el kit Procollagen Type I C-peptide EIA (MK101, Takara). Se trata de una valoración de tipo EIA, revelado por espectrofotometría efectuado a 450 nm (Safire, Tecan).

10 Para 2 pocillos celulares, se efectuaron los duplicados de medidas, mientras que el 3º pocillo se evaluó con una sola valoración.

3. Expresión de los resultados

Se reseñaron las medidas de densidad óptica DO obtenidas para cada muestra sobre una gráfica (curva patrón específica del kit). Se determinó la concentración de procolágeno I en ng/ml.

15 Como en el ejemplo 3, se realizó una valoración de las proteínas presentes en los sedimentos celulares correspondientes a los sobrenadantes para los que se ha realizado la valoración de procolágeno I.

Se expresó por tanto el resultado final en ng/ml de procolágeno I/µg de proteínas.

20 Se promediaron los valores cuantitativos de los pocillos tratados con la misma concentración de producto. Se comparó esta media con la media de las medidas obtenidas para los pocillos testigo (prueba t de Student, comparación de medias, diferencia significativa al 95 % si $p < 0,05^*$ y al 99 % si $p < 0,01^{**}$).

Se determinó el porcentaje de estimulación de los productos comparando los valores medios de las condiciones testigo y de tratamiento:

$$\% \text{ de estimulación} = (\text{tratado-testigo})/\text{testigo}$$

25 Para las condiciones de propionato de vitamina A ± NAG o NAG 6P (transferidas), se expresó el porcentaje de estimulación con relación al control de DMSO (dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO efectivamente presente) en sustitución del control.

Los resultados presentados en las tablas 7 y 8 a continuación corresponden a la media de 3 pocillos.

48 H NAG	Procolágeno I (ng/ml)	Proteínas (µg/pocillo)	(ng/ml/µg de proteína)	% de estimulación
Testigo	767,4 ± 94,3	8,4 ± 0,8	91,4 ± 20,6	/
NAG 10 mM	700,9 ± 32,7	15,7 ± 0,6	44,9 ± 1,3	-51 %**
NAG 5 mM	685,9 ± 38,6	12,2 ± 2,7	57,3 ± 10,5	-37 %*
Control de DMSO ^a	611,7 ± 78,7	8 ± 2,3	75,7 ± 13,7	/
Propionato de vit. A 1 µM	706,1 ± 73,8	12 ± 3,7	64,3 ± 20,1	15 %
NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	715 ± 26,3	10 ± 1,2	72,4 ± 9,6	-4 %

^acontrol de DMSO: dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación de NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM,

30 *prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

**prueba de Student: $p < 0,01$ – resultado significativo al 99 %

Tabla 7: Valoración a las 48 h 00 del procolágeno 1 producido por fibroblastos, efecto de NAG sola o en asociación con propionato de vitamina A

48 H NAG 6P	Procolágeno I (ng/ml)	Proteínas (µg/pocillo)	(ng/ml/µg proteína) de	% de estimulación
Testigo	675,5 ± 81,8	8,9 ± 0,9	73,2 ± 4,4	/
NAG 6P 10 mM	677,7 ± 64,6	9,2 ± 0,3	72,7 ± 4,4	-1 %
NAG 6P 5 mM	653,4 ± 36,6	8,8 ± 0,5	74,6 ± 5,3	2 %
Control de DMSO ^a	672,4 ± 67,5	8,4 ± 0,7	78,0 ± 2,0	/
Propionato de vit. A 1 µM	704,4 ± 38,6	8,8 ± 0,9	81,9 ± 13,0	5 %
NAG 6P 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	744,7 ± 74,9	7,9 ± 0,2	94,7 ± 3,5	21 %**

^acontrol de DMSO: dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación de NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM,

*prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

5 **prueba de Student: $p < 0,01$ – resultado significativo al 99 %

Tabla 8: Valoración a las 48 h 00 del procolágeno 1 producido por los fibroblastos, efecto de NAG6P sola o en asociación con propionato de vitamina A

Conclusiones:

10 Después de haber incubado durante 48 h 00 los queratinocitos en presencia de NAG sola o de propionato de vitamina A solo, tras haber transferido el sobrenadante de estas células sobre fibroblastos, se observó una disminución de la síntesis de procolágeno 1 por estos fibroblastos (disminución significativa a NAG 10 mM). El mismo experimento realizado combinando NAG en asociación con propionato de vitamina A parece inducir una disminución de la síntesis de procolágeno 1 por estos fibroblastos.

15 De forma sorprendente, al incubar en las mismas condiciones los queratinocitos en presencia de NAG6P en asociación con propionato de vitamina A, y tras haber transferido el sobrenadante de estas células sobre fibroblastos, se observó una estimulación de la síntesis de procolágeno 1 por estos fibroblastos. Este efecto de estimulación obtenido combinando NAG6P con propionato de vitamina A es superior a la suma de los efectos de estos compuestos tomados individualmente.

20 Al contrario que la N-acetilglucosamina, que no reveló ningún efecto, el 6-fosfato de N-acetilglucosamina en asociación con propionato de vitamina A es capaz de estimular la producción de procolágeno 1 por células dérmicas por mediación de queratinocitos. La asociación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina en asociación con propionato de vitamina A estimula por tanto la producción de procolágeno 1 al nivel de las células naturalmente presentes en la dermis.

25 La NAG6P es por tanto capaz de inducir a través de los queratinocitos la producción de procolágeno 1 por fibroblastos en sinergia con propionato de vitamina A, y esta asociación presenta por tanto interés para estimular la renovación de la matriz extracelular de la piel con el fin de limitar la formación de arrugas y arrugas pequeñas o de promover su atenuación, y de favorecer y mantener la hidratación de la piel (gracias a la alta potencia de captura del agua del ácido hialurónico) en profundidad.

30 **EJEMPLO 5: Estimulación indirecta (mediada por queratinocitos) de la proliferación de fibroblastos humanos normales gracias a N-acetilglucosamina sola o en asociación con propionato de vitamina A**

Se trata de evaluar la proliferación de fibroblastos humanos normales (primocultivos dérmicos) después de tratamiento durante 48 h por sobrenadantes de queratinocitos humanos transferidos.

35 La prueba "ELISA de proliferación celular, BrdU" permite cuantificar la proliferación celular mediante la medida de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante la etapa de síntesis de ADN seguida de detección de luminiscencia. Es un método sensible y no radiactivo (alternativo a la incorporación de [³H]-timidina).

1. Principio

Se pusieron las células en presencia del tratamiento durante un tiempo definido (estufa a 37 °C, 5 % de CO₂). A

continuación, se añadió el análogo de pirimidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) a las células y se volvieron a poner las mismas en incubación (estufa a 37 °C, 5 % de CO₂) durante un tiempo mínimo de 2 h. Durante este periodo, se incorpora la BrdU al ADN de las células proliferativas en lugar de timidina.

5 Se retiró el medio de cultivo, se fijaron entonces las células y se desnaturalizó el ADN al mismo tiempo (accesibilidad del anticuerpo). Se añadió un anticuerpo anti BrdU-POD (peroxidasa). Este se fija a BrdU incorporada al ADN recién sintetizado. Se detectó entonces el complejo inmunitario por adición del sustrato luminol y después lectura de la luminiscencia (Genios, Tecan).

2. Productos para ensayar

10 6-Fosfato de N-acetilglucosamina (NAG6P) aplicado durante 48 h a 10 y 5 mM sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.

Propionato de vitamina A aplicado durante 48 h a 1 µM sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.

Asociación de NAG6P 10 mM + propionato de vitamina A 1 µM aplicada durante 48 h sobre queratinocitos humanos normales y después transferencia del sobrenadante sobre fibroblastos humanos normales.

3. Preparación de células

Se obtuvieron los primocultivos de queratinocitos humanos normales (KHN) a partir de células aisladas de extracciones cutáneas (cirugía plástica).

20 Se sembraron los KHN a una densidad de 130.000 células/pocillo en medio de cultivo específico KSFM, (Gibco® Invitrogen) en una placa de 24 pocillos. Se dispuso la placa en una estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h.

Se obtuvieron los primocultivos de fibroblastos humanos normales (FHN) a partir de células aisladas de extracciones cutáneas (cirugía plástica).

25 Se sembraron los FHN a una densidad de 5.000 células/pocillo en medio de cultivo E-199 (Gibco® Invitrogen) en una placa de 96 pocillos blanca de luminiscencia específica (BD Falcon 353947). Se dispuso la placa en una estufa húmeda (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h.

Se efectuó la puesta en placa de los 2 tipos celulares KHN y FHN a 48 h de intervalo.

4. Tratamiento de las células

30 Se pusieron los diferentes productos, a las concentraciones respectivas, en presencia de KHN (diluciones en el medio de cultivo KSFM, 600 µl) durante 48 h. Se dejaron las células sin tratamiento: condición testigo. Se evaluó cada condición de tratamiento de las células en 3 pocillos de KHN.

Después de 48 h, se extrajo una parte de los sobrenadantes celulares de KHN. Se transfirió cada sobrenadante extraído (2 veces 100 µl) procedente de un pocillo de la placa de KHN (24 pocillos) a 2 pocillos de la placa de FHN que contenían ya 100 µl de E-199/pocillo.

35 Se obtuvo así un volumen final de 200 µl/pocillo de tratamiento (contenido en un medio KSFM/E-199 50/50) que queda aplicado durante 48 h a los FHN.

5. Medida de la proliferación

Se efectuó la cuantificación de la proliferación celular según el método descrito en el kit "ELISA de proliferación celular, BrdU" (Roche Applied Science n°11669915001). Se trata de una valoración de tipo inmunológico, revelado por luminiscencia (Génios, Tecan).

6. Expresión de los resultados

Se promediaron las medidas de luminiscencia (ULR/s) de los 6 pocillos tratados con la misma condición. Se comparó esta media con la medida de las medidas obtenidas para los 6 pocillos testigo (prueba t de Student, comparación de medias, diferencia significativa al 95 % si $p < 0,05^*$ y al 99 % si $p < 0,01^{**}$).

45 Se expresó la proliferación de células tratadas en porcentaje con relación al control (células no tratadas) de 100 % (DO de tratado/DO de testigo x 100).

Para las condiciones de propionato de vitamina A ± NAG 6P (transferidas), se expresó el porcentaje de proliferación con relación al control de DMSO (dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO efectivamente presente) en sustitución del control.

Los resultados presentados en la tabla 9 siguiente corresponden a la media de 6 pocillos que han recibido la transferencia de 6 sobrenadantes de KHN.

	ULR	% de proliferación
Testigo	4121 ± 205	/
<u>NAG 6P</u> 10 mM	4903 ± 377	119 %**
<u>NAG 6P</u> 5 mM	4985 ± 184	121 %**
Control de DMSO*	4240 ± 187	100 %
Propionato de vitamina A, 1 µM	4640 ± 267	109 %**
<u>NAG 6P</u> 10 mM + propionato de vit. A 1 µM	5693 ± 391	134 %**

^aControl de DMSO: dilución 1/10.000 correspondiente a la cantidad de DMSO presente en el tratamiento con propionato de vitamina A y la asociación NAG 10 mM + propionato de vit. A 1 µM.

5 *prueba de Student: $p < 0,05$ – resultado significativo al 95 %

**prueba de Student: $p < 0,01$ - resultado significativo al 99 %

Tabla 9: Valoración a las 48 h 00 de la proliferación celular de los fibroblastos, efecto de NAG6P sola o en asociación con propionato de vitamina A

Conclusiones:

10 Después de haber incubado durante 48 h 00 los queratinocitos en presencia de NAG6P sola, tras haber transferido el sobrenadante de estas células sobre fibroblastos, se observó de forma sorprendente un aumento significativo de la proliferación de fibroblastos. De forma aún más sorprendente, este aumento no está ligado a la dosis de NAG6P usada en la preincubación de los queratinocitos, indicando que probablemente no es NAG6P el que podría actuar directamente sobre la proliferación de fibroblastos. El NAG6P induce por tanto muy ciertamente una respuesta de
15 queratinocitos que, bajo el efecto de este compuesto, producen una o varias moléculas (probablemente ácido hialurónico de diferente tamaño) en su sobrenadante, que va o van a activar la proliferación de fibroblastos.

De forma notable, la combinación de NAG6P con propionato de vitamina A muestra una estimulación mayor de la proliferación de fibroblastos que cada uno de estos productos ensayados separadamente.

20 La NAG6P es por tanto capaz de inducir a través de los queratinocitos la división de fibroblastos, sola o en sinergia con propionato de vitamina A, y presenta por tanto interés para estimular la renovación celular de la piel.

EJEMPLO 6: Prueba de los efectos del 6-fosfato de N-acetilglucosamina sobre la piel humana

En este estudio, se evaluó el efecto de la N-acetilglucosamina sobre la piel humana mantenida en condiciones de supervivencia. Se comparó este efecto con el de una crema comercial "RetinOX + Jour" que contenía retinol (0,02 a 0,05 %). Se evaluaron los efectos siguientes más particularmente a lo largo de este estudio:

- 25
- la morfología general de la piel después de coloración con tricrómico de Masson,
 - el contenido de glicosaminoglicanos (GAG) ácidos después de coloración con azul alcian,
 - la tasa de expresión del receptor CD44 de ácido hialurónico después de inmunomarcaje de este receptor.

1. Producto probado

Producto probado: 6-fosfato de N-acetilglucosamina (NAG6P) al 1 % (P1); 0,1 % (P2) y 0,01 % (P3) plv.

30 2. Modelo biológico

A partir de una plastia abdominal de mujer de tipo caucásico de 36 años (P712AB36), se prepararon 33 explantes (de un diámetro de aproximadamente 10 mm) y se pusieron en condiciones de supervivencia en medio específico de supervivencia de explantes cutáneos. Se repartieron los explantes en 11 lotes de 3 explantes:

ES 2 617 262 T3

Lote	Nº de explantes	Tratamiento	Extracción	Evaluaciones
T J0	3	Ninguno	J0	Morfología GAG CD44
T J6	3	Ninguno	J6	GAG CD44
R J6	3	Crema RetinOx + jour	J6	GAG CD44
P1 J6	3	Principio activo NAG6P al 1 %	J6	GAG CD44
P2 J6	3	Principio activo NAG6P al 0,1 %	J6	GAG CD44
P3 J6	3	Principio activo NAG6P al 0,01 %	J6	GAG CD44
T J10	3	Ninguno	J10	Morfología GAG CD44
R J10	3	Crema RetinOx + jour	J10	Morfología GAG CD44
P1 J10	3	Principio activo NAG6P al 1 %	J10	Morfología GAG CD44
P2 J10	3	Principio activo NAG6P al 0,1 %	J10	Morfología GAG CD44
P3 J10	3	Principio activo NAG6P al 0,01 %	J10	Morfología GAG CD44

3. Tratamiento

Los días J0, J2, J3, J6 y J8, se aplicó la crema RetinOx+ jour sobre los explantes a razón de 1 mg/cm².

- 5 A J0, J2, J3, J6 y J8, se depositaron 30 µl de los productos P1, P2 y P3 sobre discos de papel de filtro aplicados sobre los explantes

Los testigos no recibieron ningún tratamiento.

4. Extracciones

A J0, se extrajeron los 3 explantes del lote T0 y se cortaron en dos. Se fijó una mitad con líquido de Bouin ordinario y se congeló la otra mitad a -80 °C.

A J6 y a J10, se extrajeron 3 explantes de cada lote y se trataron de la misma manera.

5. Histología

5 Después de 48 horas de fijación en líquido de Bouin ordinario, se deshidrataron las extracciones y se impregnaron con parafina con la ayuda de un autómata de deshidratación Leica 1020. Se pusieron en bloque según el modo operativo MO-H-153 con la ayuda de un centro de inclusión de tejidos Leica EG 1160. Se realizaron cortes de 5 µm según el modo operativo MO-H-173 con la ayuda de un micrótopo de tipo Minot, Leica RM 2125 y se pegaron sobre portaobjetos de vidrio histológicos Superfrost®.

10 **5.1 Examen de la morfología general**

Se efectuó la observación de la morfología general sobre cortes de parafina después de coloración con tricómico de Masson, variante de Goldner según el modo operativo MO-H-157.

5.2 Visualización de GAG ácidos

Se visualizan los GAG ácidos después de coloración con azul alcian. Se observan en toda la dermis papilar.

15 En esta zona, los GAG buscados aparecen en azul y son GAG ácidos.

Un análisis de imágenes permite cuantificar la intensidad de la coloración.

5.3 Inmunomarcaje de CD44

20 Se marcó CD44 sobre cortes congelados con un anticuerpo monoclonal anti-CD44, (Invitrogen MHC D4400), realizado en ratón a 1/100, durante una hora a temperatura ambiente con un sistema amplificador de biotina/estreptavidina revelado con FITC con los núcleos contracolorados con yoduro de propidio.

Resultados

Morfología general

El día J0:

25 El estrato córneo de los explantes era moderadamente grueso, muy moderadamente laminado y claramente queratinizado en superficie y en su base. La epidermis presentaba de 5 a 6 capas celulares con una buena morfología. El relieve de la unión dermoepidérmica era moderado. La dermis papilar presentaba colágeno con fibras bastante gruesas que formaban una red bastante densa. Estaba bien celularizada.

El día J10 (véase la figura 2):

30 La estructura epidérmica y dérmica de los explantes estaba ligeramente alterada, con una clara queratinización en la base del estrato córneo y una ligera paraqueratosis. La espongirosis era baja al nivel de las capas basales.

La aplicación de la referencia RetinOx+ jour inducía una reacción muy clara de tipo retinoico sobre los explantes con una acantosis epidérmica muy clara (5 a 6 capas celulares/19 a 20). La dermis papilar era densa.

35 La aplicación del producto NAG6P sobre los explantes conllevaba claras modificaciones de la morfología epidérmica. La dermis papilar era bastante densa. En particular, la aplicación del producto NAG6P al 0,01 % (P3) conllevaba evoluciones de la morfología general y una reorganización/refuerzo netos de la unión epidermodérmica de los explantes. La dermis papilar era más o menos densa.

Visualización/cuantificación de GAG ácidos

Análisis visual

El día J0:

40 Los GAG ácidos son moderados en el conjunto de la dermis papilar. Son claros en los fibroblastos.

El día J6 (véase la figura 3):

En los explantes no tratados, se han expresado ligeramente más que los observados a T0.

Con la crema RétinOx+ jour, eran moderados y bastante densos a lo largo de la unión epidermodérmica (JDE), así como en el resto de la dermis papilar.

Con el producto NAG6P, eran moderados a lo largo de la JDE y estaban presentes en toda la dermis papilar, y esto de forma dependiente de la dosis: los GAG ácidos eran más densos con NAG6P al 1 % que al 0,01 %.

El día J10:

En los explantes no tratados, los GAG eran parecidos a los observados en J6.

- 5 Con la referencia RetinOx+ jour, eran claros y bastante densos a lo largo de la JDE, así como en el resto de la dermis papilar.

Con el producto NAG6P, se confirma el efecto observado en J6: los GAG ácidos eran moderados a lo largo de la JDE y estaban presentes en toda la dermis papilar, y esto de forma dependiente de la dosis: los GAG ácidos eran más densos a NAG6P al 1 % que al 0,01 %.

10 *Análisis cuantitativo*

Se realizó la cuantificación de los GAG ácidos por análisis de imágenes. Se expresan los resultados de esta cuantificación en la tabla 10 siguiente, en porcentaje de la superficie analizada.

% de superficie analizada	J0		J10	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Explantes testigo	37,9	11,6	11,4	5,7
Explantes tratados con crema RetinOX+jour	/	/	23,8	8,7
Explantes tratados con NAG6P al 1 %	/	/	21,0	3,4
Explantes tratados con NAG6P al 0,1 %	/	/	16,3	6,3
Explantes tratados con NAG6P al 0,01 %	/	/	14,0	4,0

Tabla 10: Porcentaje de superficie ocupada por GAG ácidos en la dermis papilar

Expresión del receptor CD44 de ácido hialurónico

15 El día J0:

La expresión de CD44 era clara y muy regular en los explantes.

En la epidermis, el CD44 era más o menos puntiforme, bien membranoso y pericelular en todas las capas vivas hasta la granulosa. En la dermis papilar, era muy claro en los fibroblastos y en fibras finas.

El día J6:

- 20 En el lote no tratado, la expresión de CD44 disminuía tanto en la epidermis como en la dermis papilar.

En el lote tratado con la crema RetiOx + Jour, el CD44 se sobreexpresaba moderadamente.

El CD44 estaba ligeramente sobreexpresado en el lote tratado con el producto NAG6P al 1 % y al 0,1 %. Esta sobreexpresión era muy moderada con el producto NAG6P al 0,01 %.

El día J10 (véase la figura 4):

- 25 En el lote no tratado, la expresión de CD44 estaba ligeramente sobreexpresada, sobre todo en la epidermis sobre las capas basales más que en la dermis papilar.

En el lote tratado con la crema RetiOx + Jour, el CD44 estaba moderadamente sobreexpresado.

Esta sobreexpresión era muy clara con el producto NAG6P al 0,01 % tanto en la epidermis como en la dermis papilar.

30 Conclusiones

A lo largo de este estudio, se ha observado de forma notable que la aplicación de 6-fosfato de N-acetilglucosamina sobre la piel humana induce varios fenómenos:

- una reorganización observable de la estructura epidermodérmica con un refuerzo claro de la unión epidermodérmica, sin fenómeno de acantosis al contrario que la crema RetinOX + Jour;

- un aumento de la cantidad de GAG ácidos (por tanto principalmente de ácido hialurónico, que es el GAG ácido principal de la piel), no localizado únicamente al nivel de la unión epidermodérmica como para la crema RetinOX + Jour, sino bien repartido en toda la dermis papilar;
- un aumento de la tasa de receptor CD44 de ácido hialurónico, indicando una actividad de síntesis de ácido hialurónico por la piel y una activación de las células cutáneas.

De forma notable, este compuesto solo actúa de manera tan o incluso más eficaz que una crema comercial basada en retinol (por ejemplo, el 6-fosfato de N-acetilglucosamina no provoca el fenómeno de acantosis sobre la piel, al contrario que la crema comercial).

El 6-fosfato de N-acetilglucosamina presenta por tanto interés para estimular varios fenómenos al nivel de la piel:

- voluminizarla a través de la estimulación de la síntesis de GAG, componentes de la matriz tridimensional de soporte de la piel,
- reforzar los intercambios de nutrientes entre epidermis y dermis a través de una mejora de la unión epidermodérmica,
- alisar la piel y reafirmarla a través de la mejora de la unión epidermodérmica y la síntesis de GAG,
- promover su regeneración a través de la estimulación del receptor CD44.

EJEMPLO 7: Ejemplos de composiciones para el cuidado de la piel basadas en 6-fosfato de N-acetilglucosamina (NAG6P)

6.1 Crema regenerativa para pieles envejecidas (fuera de la invención)

A-Fase acuosa

20	Glicerina	2,0 %
	Hexilenglicol	3,0 %
	Goma de xantano	0,5 %
	Conservantes	cs
	Carbómero	0,35 %
25	NAG6P	0,1 %
	Agua	cs hasta 100 %

B-Fase grasa

	Escualano	15 %
	Alcohol cetílico	2 %
30	Alcohol araquidílico/alcohol behenílico/glucósido de araquidilo	1 %
	Estearato de glicerol	5 %
	Agua	1,5 %
	NaOH	0,35 %
	Conservante + perfume	cs

35 6.2. Emulsión hidratante y emoliente

A-Fase grasa

	Cetareth-2	3,5 %
	Cetareth-21	2 a 4 %
	Aceite de germen de trigo	3 %
40	Ciclometicona	7 %

ES 2 617 262 T3

	Palmitato de octilo	8 %
	<i>B-Fase acuosa</i>	
	Agua	cs hasta 100 %
	Glicerina	7,0 %
5	Hexilenglicol	3,0 %
	NAG6P	0,1 %
	Conservantes	cs
	<i>C-Ingredientes añadidos a la emulsión a una temperatura inferior a 40 °C</i>	
	Hialuronato de sodio	0,1 %
10	Agua	5 %
	Tocoferol	0,05 %
	Palmitato de vitamina A	0,1 %
	Fosfolípidos	0,5 %
	Ceramidas 3	0,1 %
15	Poliacrilamida e isoparafina C ₁₄₋₁₃ y laureth-7	2 a 3,5 %
	<u>6.3 Leche-crema solar para pieles fotoenvejecidas (fuera de la invención)</u>	
	<i>A –Fase grasa</i>	
	Monoestearato de glicerol	2 %
	Estearato de PEG-100	3 %
20	Benzoato de alquilo C12-C15	10 %
	Dimeticona	5 %
	Acetato de tocoferol	1 %
	Octiltriazona (Uvinul T150)	1,5 %
	Butilmetoxidibenzoilmetano (Eusolex 9020)	2,0 %
25	Alcohol cetosteárico	1 %
	<i>B-Fase acuosa</i>	
	Agua	cs hasta 100 %
	Conservantes	0,6 %
	Glicerina	7 %
30	Hexilenglicol	3,0 %
	Carbómero	0,5 %
	EDTA tetrasódico	0,2 %
	NAG6P	0,1 %
	Hialuronato de sodio HPM	0,1 %
35	Agua	5 %
	NaOH	0,5 %
	Conservante + perfume	cs

6.4. Crema antiarrugas posinyección "Filler" (relleno)

A –Fase grasa

	Escualano	5 %
	Alcohol cetílico	2 %
5	Dimeticona	5 %
	Palmitato de octilo	5 %

B-Fase acuosa

	Butilenglicol	0,5 - 4 %
	Agua	cs hasta 100 %
10	NAG6P	0,1 %
	Glicerina	2,0 %
	Hexilenglicol	3,0 %
	Goma de xantana	0,5 %
	Conservantes	cs

15 *C-Ingredientes añadidos a la emulsión a una temperatura inferior a 40 °C*

	Acetato de tocoferol	0,1 a 1 %
	Piridoxina	0,01 a 0,05 %
	Palmitato de vitamina A	0,01 a 1 %
	d-Pantenol	0,1 a 1 %
20	Ácido cítrico	0,1 a 0,5 %
	Gluconato de cinc	0,1 a 1 %
	Citrato trisódico	1 a 2,5 %
	Agua	5 %

6.5 Loción desmaquilladora para pieles maduras (fuera de la invención)

25	Polisorbato 20	1,0 %
	Glucósido caprílico/caprílico (Oramix CG110)	2,0 %
	NAG6P	0,1 %
	Cocoato de PEG-7-glicerilo	0,5 %
	Hexilenglicol	4-5 %
30	d-Pantenol	0,1 %
	Manitol	0,02 %
	Conservantes	cs
	Agua	cs hasta 100 %

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de una composición cosmética que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo cosméticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster del mismo, retinal o retinaldehído, ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos, para el tratamiento de pieles secas o para el tratamiento o la prevención del envejecimiento de la piel o de sus faneras, para la mejora de la elasticidad y/o del tono de la piel, para la reafirmación de la piel y/o para la regeneración/refuerzo de la unión epidermodérmica y/o para aumentar la proliferación de fibroblastos y/o para aumentar la síntesis de macromoléculas estructurales seleccionadas entre hialuronato y/o procolágeno 1.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 para el tratamiento o la prevención de arrugas.
3. Uso según la reivindicación 1 para el tratamiento o la prevención de arrugas profundas y/o arrugas pequeñas.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto de la familia de la vitamina A es retinol o un éster del mismo.
- 10 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la composición está adaptada para administración tópica, oral o inyectable.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que la composición está adaptada para administración tópica.
7. Composición cosmética que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo cosméticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster del mismo, retinal o retinaldehído, ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos.
- 15 8. Composición farmacéutica o veterinaria que comprende 6-fosfato de N-acetilglucosamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la familia de la vitamina A seleccionado entre el grupo consistente en retinol o un éster de mismo, retinal o retinaldehído, ácido retinoico, isotretinoína, adapaleno, tretinoína y la mezcla de los mismos.
- 20 9. Composición según la reivindicación 7 u 8, que comprende retinol o un éster del mismo.
10. Composición según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, eccema, trastornos articulares, trastornos ligados al déficit de cartílago y derrames del sinovio, para viscosuplementación o en tratamientos que acompañan a intervenciones quirúrgicas del ojo.
- 25 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, adaptada para administración tópica, oral o inyectable.
12. Dispositivo que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, estando adaptado el dispositivo a una inyección.
- 30 13. Dispositivo según la reivindicación 12, que está adaptado a una inyección intraepidérmica y/o intradérmica y/o transdérmica y/o subcutánea y/o microinyección y/o en el espacio articular.
- 35

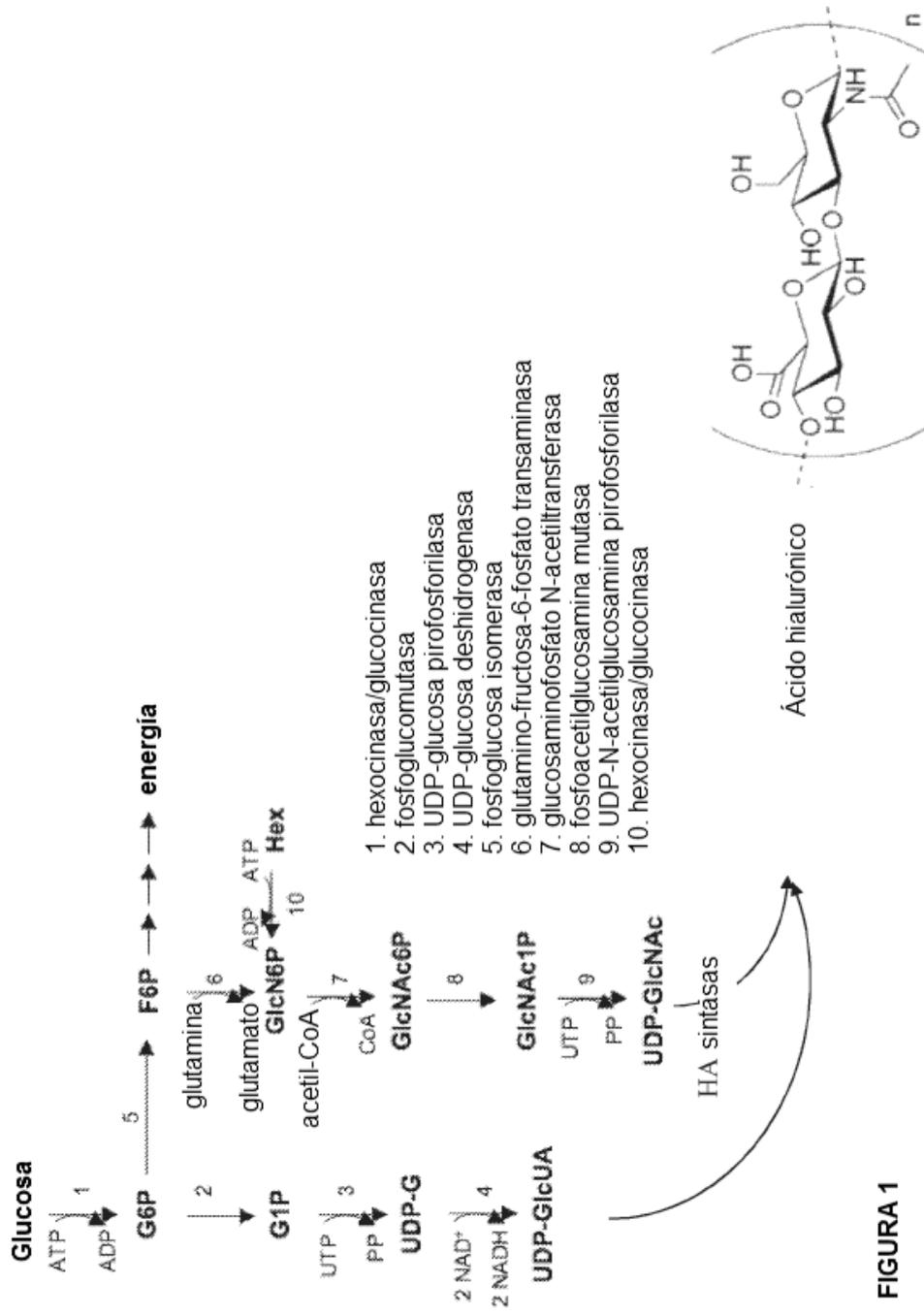
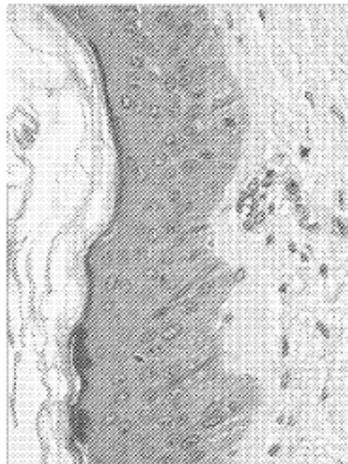


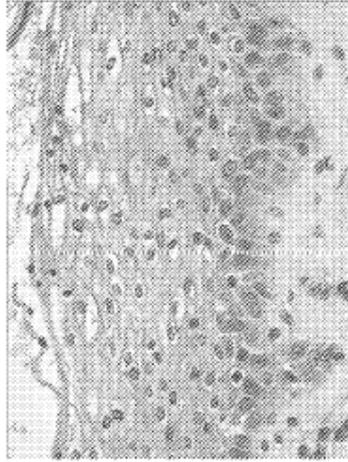
FIGURA 1

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LA PIEL DESPUÉS DE 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON 6-FOSFATO DE N-ACETILGLUCOSAMINA



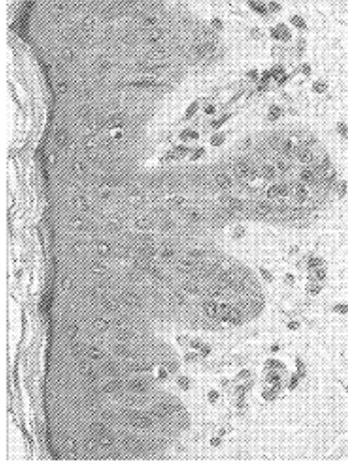
Muestra: piel sin producto

Análisis: buena estructura de la epidermis, baja JED



Muestra: piel con crema RetinOX + Jour

Análisis: fuerte estimulación de la epidermis (acantosis) y baja JED



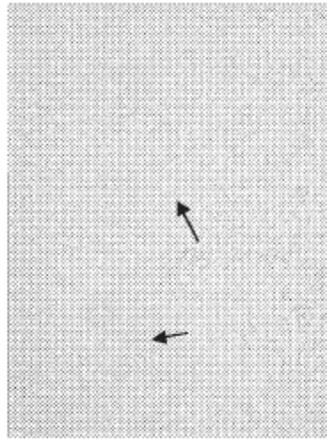
Muestra: piel con 6-fosfato de N-acetilglucosamina 0,1 g/l

Análisis: excelente estimulación y reorganización de la JED

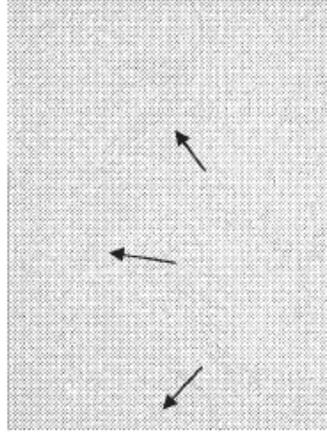
Abreviatura, JED: unión epidermodérmica

FIGURA 2

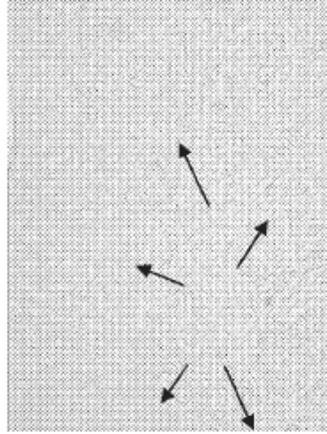
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE GLICOSAMINOGLICANOS EN LA PIEL DESPUÉS DE 6 DÍAS DE TRATAMIENTO CON 6-FOSFATO DE N-ACETILGLUCOSAMINA



Muestra: piel sin producto
Análisis: baja cantidad de GAG situados principalmente al nivel de la DEJ



Muestra: piel con crema RetinOX + Jour
Análisis: aumento de la tasa de GAG principalmente alrededor de la DEJ

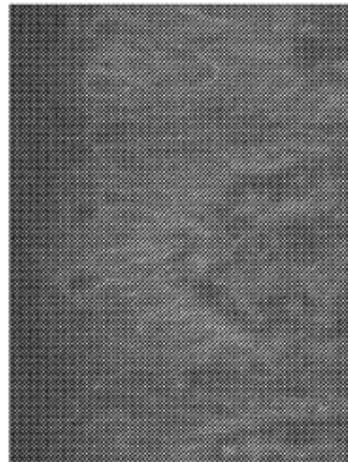


Muestra: piel con 6-fosfato de N-acetilglucosamina 10 g/l
Análisis: aumento visible de los GAG bien distribuidos por toda la dermis papilar

Abreviaturas: GAG: glicosaminoglicanos
DEJ: unión epidermodérmica

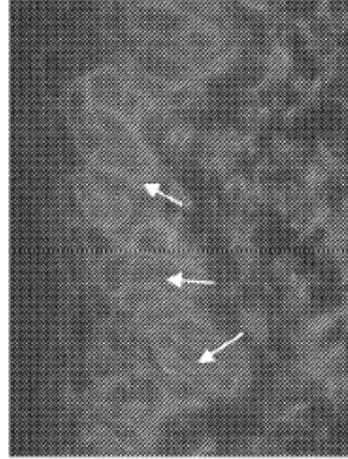
FIGURA 3

ANÁLISIS DEL RECEPTOR CD44 EN LA PIEL DESPUÉS DE 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON 6-FOSFATO DE N-ACETILGLUCOSAMINA



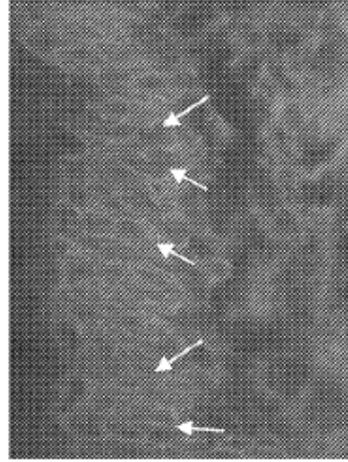
Muestra: piel sin producto

Análisis: expresión neta del receptor CD44 al nivel de la membrana basal



Muestra: piel con crema RetinOX + Jour

Análisis: expresión reforzada del receptor CD44 al nivel de la membrana basal



Muestra: piel con 6-fosfato de N-acetilglucosamina 0,1 g/l

Análisis: expresión netamente reforzada del receptor CD44 al nivel de la membrana basal

FIGURA 4