

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 216**

51 Int. Cl.:

C07J 63/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013** **PCT/IB2013/061087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14097176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013** **E 13828837 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2935199**

54 Título: **Ésteres de ácido glicirretínico, preparación y aplicaciones cosméticas de los mismos**

30 Prioridad:

18.12.2012 IT MI20122169

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

GIULIANI S.P.A. (100.0%)

Via Palagi, 2

20129 Milano, IT

72 Inventor/es:

GIULIANI, GIAMMARIA;

BENEDUSI, ANNA;

BREGAGLIO, GUIDO y

MASCOLO, ANTONIO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 623 216 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

Ésteres de ácido glicirretínico, preparación y aplicaciones cosméticas de los mismos

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a ésteres de ácido glicirretínico con poliglicerolsorbitol y sus aplicaciones en el campo cosmético.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] El proceso de envejecimiento de la piel consiste en la evolución natural de la estructura y tejidos que afectan a este órgano que tiene lugar desde el período embrionario y continúa hasta la vejez.

15 [0003] Las características del envejecimiento de la piel son una reducción de la renovación y las funciones celulares, que va seguido de una disminución de las sustancias estructurales (colágeno, elastina, etc.) que proporcionan el tono y elasticidad a la piel que *per se* representa una barrera física que nuestro cuerpo establece contra el entorno exterior. Por esta razón, su integridad y funcionalidad son un requisito previo para una buena condición de salud de la misma.

20 [0004] Las agresiones medioambientales tales como los rayos ultravioletas, la exposición al humo del tabaco cigarrillo y las sustancias contaminantes junto con el proceso de envejecimiento natural contribuyen a la formación de una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres que, cuando están en exceso, pueden conducir pronto al cuerpo a una condición que afecta negativamente a la integridad de las proteínas celulares, las membranas, y los genes y que se describe como estrés oxidativo.

25 [0005] Esta condición de estrés, si se prolonga en el tiempo, produce una inflamación sistémica que a su vez determina los fenómenos conocidos de degeneración celular estrictamente correlacionados con el envejecimiento, proceso que, por lo tanto, está relacionado con la disminución de las capacidades protectoras del cuerpo (defensas antioxidantes, procesos de reparación del ADN, etc.).

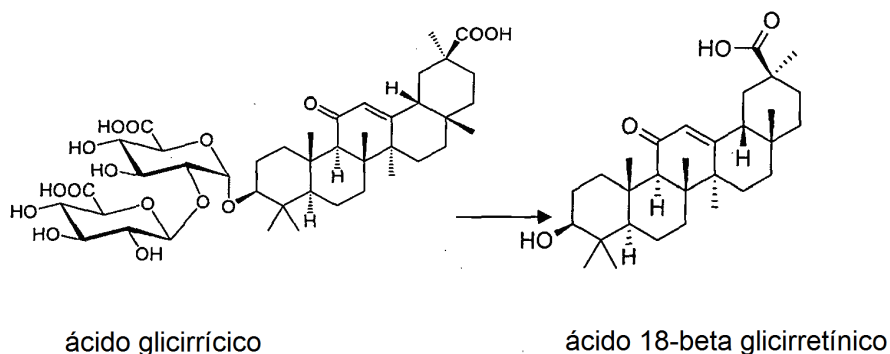
30 [0006] Por lo tanto, el uso de sustancias con propiedades antiinflamatorias o lenitivas representa una estrategia eficaz para contrarrestar y prevenir el inicio de esta condición de estrés.

35 [0007] Los derivados de la raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) se han utilizado durante mucho tiempo como sustancias lenitivas en la preparación para su uso en la piel, y existen diversas afecciones para las cuales la aplicación tópica de estas sustancias es ventajosa, por ejemplo, el tratamiento de eccema, dermatitis alérgica y de contacto, y el tratamiento de la psoriasis.

40 [0008] En la raíz de regaliz hay un gran número de sustancias (por ejemplo, sales de ácido glicirricico, asparagina, glabridina, glicirretol, formononetina, etc.) que en virtud de sus propiedades pueden realizar una acción beneficiosa para la piel. Entre estas sustancias, las más representativas desde el punto de vista cuantitativo son las sales del ácido glicirricico.

45 [0009] El ácido 18-beta glicirretínico es un triterpenoide pentacíclico que se obtiene hidrolizando ácido glicirricico, saponina triterpénica, presente de forma natural en la raíz y rizoma de *Glycyrrhiza Glabra*.

50 [0010] El ácido 18-beta glicirretínico (ácido glicirretínico) que se origina de la hidrólisis del ácido glicirricico es una parte de la molécula que tiene actividad lenitiva:



[0011] Desde el punto de vista químico-físico, el ácido glicirretínico 18-beta está en forma de un polvo blanco, inodoro, insoluble en agua y aceites, mientras que es soluble en etanol.

5 **[0012]** Se sabe que la introducción de una sustancia en una formulación puede realizarse por diferentes métodos dependiendo en primer lugar de las características químico-físicas del principio activo y del vehículo (o formulación) y que, por consiguiente, determinan su reparto o paso de la primera a través de las diversas capas que componen la piel, hasta la posibilidad de llegar al sistema circulatorio y, por lo tanto, a los diferentes tejidos del cuerpo.

10 **[0013]** Este último caso se denomina absorción percutánea que desde el punto de vista cuantitativo puede definirse como la cantidad de una determinada sustancia que se puede encontrar a un nivel sistémico dentro de un cierto intervalo de tiempo después de la aplicación sobre la piel.

15 **[0014]** En la administración tópica, el principio activo, viceversa, tiene que obtener la eficacia local más alta con la absorción sistémica más baja.

[0015] Las moléculas que tienen un alto peso molecular generalmente no son capaces de penetrar en las capas más profundas. Si no son susceptibles a la hidrólisis, están obligadas a permanecer en la superficie.

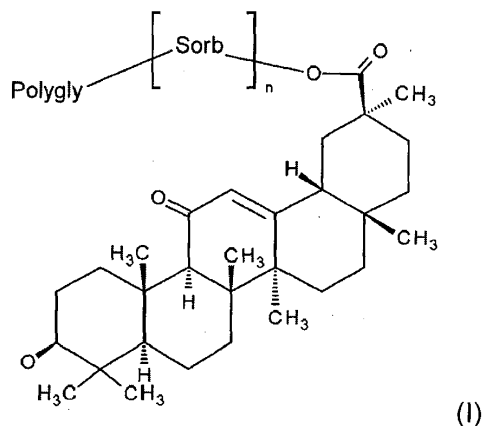
20 **[0016]** Por lo tanto, existe la necesidad de un producto capaz de aumentar la eficacia lenitiva del ácido glicirretínico permitiendo un paso modulado a través de la vía transdérmica y el logro de las capas más profundas de la dermis, y siendo al mismo tiempo altamente biocompatibles y tolerables por el cuerpo.

25 **[0017]** El documento EP1468696 desvela composiciones farmacéuticas antiinflamatorias que contienen glicirretinato de glicerilo.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 **[0018]** Los inventores han descubierto que mediante la modificación conveniente de un éster de ácido glicirretínico es posible aumentar la solubilidad del ácido glicirretínico aumentando las posibilidades de uso de esta sustancia en el campo cosmético.

35 **[0019]** De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I):



donde

40 n es un número entero de 1 a 3,
Sorb representa un resto de sorbitol, y
Polygly representa un resto de glicerol o poliglicerol.

45 **[0020]** De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende al menos un éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I) y al menos un vehículo cosméticamente aceptable.

[0021] De acuerdo con un aspecto más, la presente invención se refiere al proceso para la fabricación de dicho éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I).

[0022] De acuerdo incluso con un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de dicho éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I), o de dicha composición cosmética como un agente antienvjecimiento en el tratamiento tópico de la piel, particularmente la piel sensible.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] Las características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las realizaciones ejemplares proporcionadas a modo de ejemplos no limitantes, y a partir de las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 muestra los resultados del ensayo MTT de ácido 18-β-glicirretínico (Ejemplo 5) después de 24-48-72 h de tratamiento:% de viabilidad en comparación con las células de control en queratinocitos humanos NCTC 2544 después de 24-48-72 h de tratamiento con ácido 18-β-glicirretínico a una concentración de 2,5-5-10-20-40-80 μM. Los datos representan valores medios ± desviación estándar. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

- La figura 2 muestra los resultados del ensayo MTT del éster que tiene la fórmula (Ia) (Ejemplo 5) después de 24-48-72 h de tratamiento:% de viabilidad en queratinocitos humanos NCTC 2544 después de 24-48-72 h de tratamiento con el éster que tiene la fórmula (Ia) a una concentración de 0,625-1,25-2-2,5-5-10-20-40-80 μM. Los datos se expresan como valores medios ± desviación estándar. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

- La Figura 3 muestra la expresión del gen del factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α) en queratinocitos humanos NCTC 2544 según se determinó por RT-PCR en el Ejemplo 6. Las células NCTC 2544 se trataron a 37 °C durante 16, 24 y 48 horas, en CO₂ al 5 %, con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % (control negativo) y con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % complementado con LPS (5 μg/ml) (control positivo). Los valores representan los valores medios de 2 experimentos por duplicado.

- La Figura 4 muestra la expresión del gen del factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α) en queratinocitos humanos NCTC 2544 según se determinó por RT-PCR en el Ejemplo 6. Las células NCTC 2544 se trataron a 37 °C durante 48 horas, en CO₂ al 5 %, con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % (control negativo), con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % complementado con LPS (5 μg/ml) (control positivo), con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % complementado con LPS (5 μg/ml) y ácido 18-β-glicirretínico (18-β) a una concentración de 2,5-5-10 μM, con: medio de cultivo basal, que contenía suero fetal bovino al 2,5 % complementado con LPS (5 μg/ml), y POLY-GLY-S a una concentración de 2,5-5-10μM. Los resultados se expresan como un porcentaje de inflamación en comparación con las células tratadas con LPS. Los valores representan los valores medios de 2 experimentos por duplicado.

- La Figura 5 muestra el espectro de ¹H RMN (en d₆-DMSO) del éster glicirretínico de poliglicerol-3-sorbitol, de acuerdo con una realización de fórmula (I),

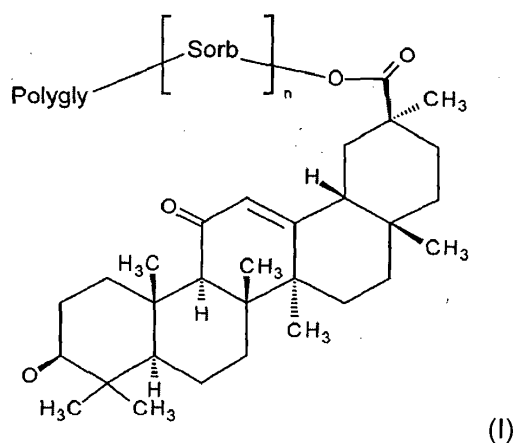
- La Figura 6 muestra el espectro de ¹³C RMN (en d₆-DMSO) del éster glicirretínico de poliglicerol-3-sorbitol, de acuerdo con una realización de fórmula (I),

- La Figura 7 muestra el espectro bidimensional COSY¹H RMN (en d₆-DMSO) del éster glicirretínico de poliglicerol-3-sorbitol, de acuerdo con una realización de fórmula (I),

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] En particular, se encontró que esterificando con un grupo sorbitol [Sorb]_n el ácido carboxílico del resto de ácido glicirretínico unido a la molécula de glicerol o poliglicerol (Polygly), la solubilidad de la molécula resultante aumenta sorprendentemente.

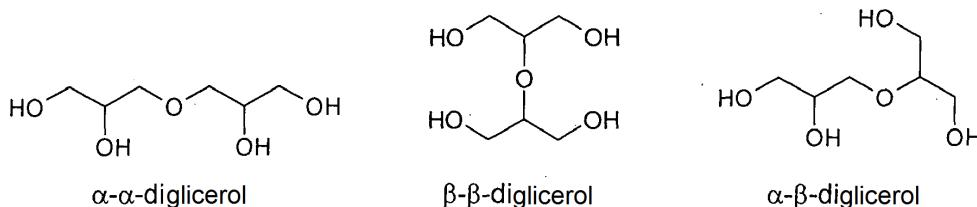
[0025] Por lo tanto, la presente invención se refiere a un éster del ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I):



donde

- 5 n es un número entero de 1 a 3,
 Sorb representa al menos un resto de sorbitol, y
 Polygly representa un resto de glicerol o poliglicerol.

10 **[0026]** Para los propósitos de la presente invención, el término poliglicerol se refiere a los productos de condensación entre las moléculas de glicerol, es decir, los dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros de glicerol. El ejemplo más sencillo es diglicerol o diglicerina que se obtiene condensando dos moléculas de glicerol. La reacción de deshidratación puede implicar los tres grupos hidroxilo de la molécula y, por lo tanto, puede tener condensaciones del tipo alfa-alfa (α - α , es decir, entre dos hidroxilos unidos a átomos de carbono primarios de dos moléculas de glicerol), beta-beta (β - β , es decir, entre dos hidroxilos unidos a átomos de carbono secundarios de dos moléculas de glicerol) y el tipo alfa-beta (α - β , es decir, entre un hidroxilo unido a un átomo de carbono primario de una molécula de glicerol y un hidroxilo unido a un átomo de carbono secundario de otra molécula de glicerol), como en las estructuras que se indican a continuación:



- 20 **[0027]** A medida que el grado de polimerización aumenta, también aumenta el número de isómeros potenciales, por ejemplo, varía de tres isómeros lineales diferentes para diglicerol a ocho isómeros lineales diferentes para triglicerol.
- 25 **[0028]** Las reacciones intramoleculares también pueden conducir a la formación de productos cíclicos. Típicamente, los procedimientos actualmente disponibles para obtener poligliceroles altamente puros se pueden dividir en dos tipos:
- 30 - Métodos destinados a separar productos cíclicos y secundarios, por ejemplo, descritos en la patente de Estados Unidos 3.968.169, a cuyo contenido se hace referencia en el presente documento,
 - métodos para obtener productos lineales altamente puros, por ejemplo, descritos en la patente de Estados Unidos 6.620.904, a cuyo contenido se hace referencia en el presente documento.

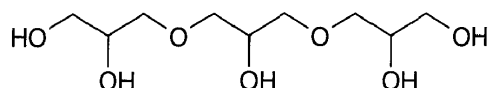
35 **[0029]** Para los propósitos de la invención, se ha encontrado que los restos de glicerol y oligómeros de los mismos que contienen hasta 10 unidades de monómero (poliglicerol-10) son particularmente preferidos; de hecho, un aumento en el grado de polimerización de los poligliceroles corresponde a una disminución de su pureza, junto con la presencia de un número creciente de restos que tienen un peso molecular diferente, lo que hace que las propiedades químico-físicas de los poliésteres finales sean cada vez menos homogéneas. Además, debe observarse que con un aumento en el grado de polimerización, y por lo tanto, en el peso molecular, se observa un aumento en la viscosidad y una reducción de la higroscopia de la molécula.

[0030] Típicamente, los poligliceroles pueden sintetizarse recurriendo a métodos que proporcionan la condensación de glicerol con catálisis alcalina (deshidratación del mismo) con eliminación de agua. El resultado de esta síntesis es normalmente una mezcla de oligómeros que puede comprender glicerol sin reaccionar, productos cíclicos y oligómeros muy altos. Las condiciones de temperatura, típicamente por encima de 200 °C, la duración de la síntesis y el vacío favorecen la formación de las estructuras deseadas. Mediante la deshidratación se obtienen diferentes polímeros de glicerina en los que las moléculas de glicerina están unidas entre sí a través de un puente de oxígeno. A partir de glicerol que contiene tres grupos hidroxilo, el número de -OH aumenta en uno por cada molécula de condensación de glicerina, por lo tanto, el diglicerol tiene cuatro grupos -OH libres, triglicerol tiene cinco grupos -OH libres, tetraglicerol tiene seis y así sucesivamente.

[0031] Preferiblemente, en el éster de la invención, Polygly indica un resto de poliglicerol que tiene un grado de polimerización de 1,5 a 10, más preferiblemente indica un resto de poliglicerol que tiene un grado de polimerización de 3 a 5.

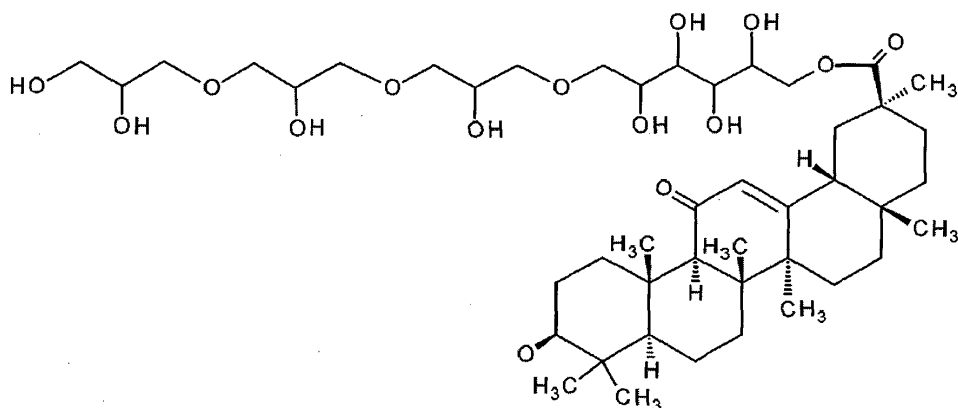
[0032] De acuerdo con algunas realizaciones, poliglicerol (polygly) que tiene la fórmula (I) contiene de 2 a 10 unidades de glicerol, preferiblemente 2 o tres unidades de (poli)glicerol.

[0033] En algunas realizaciones de la invención, Polygly es un resto de poliglicerol-3, más preferiblemente el trímero, en el que las tres unidades de glicerol están unidas entre sí en una configuración α - α :



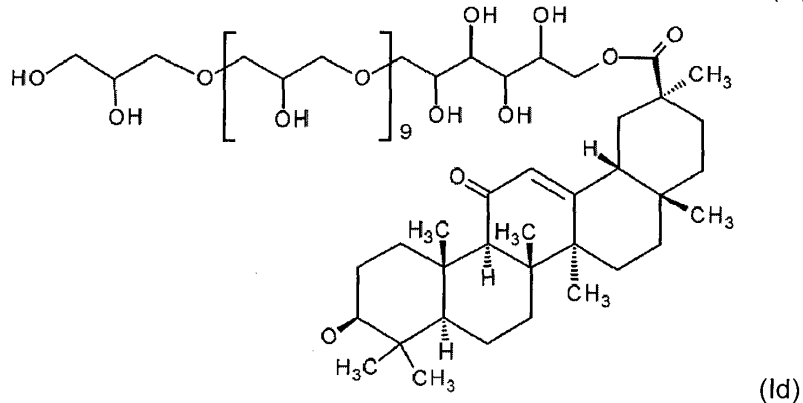
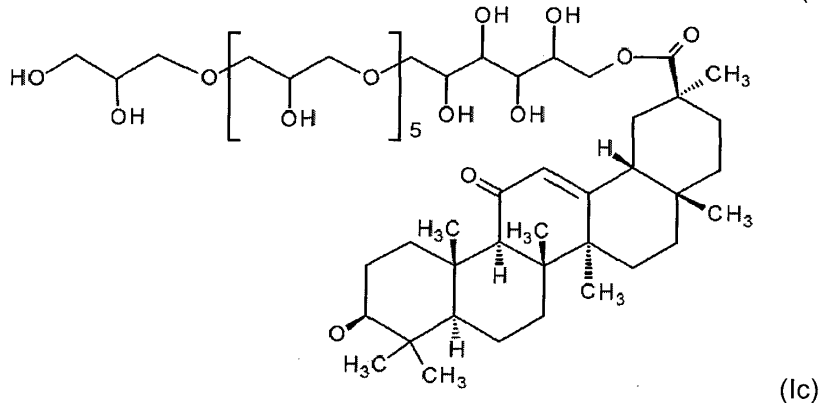
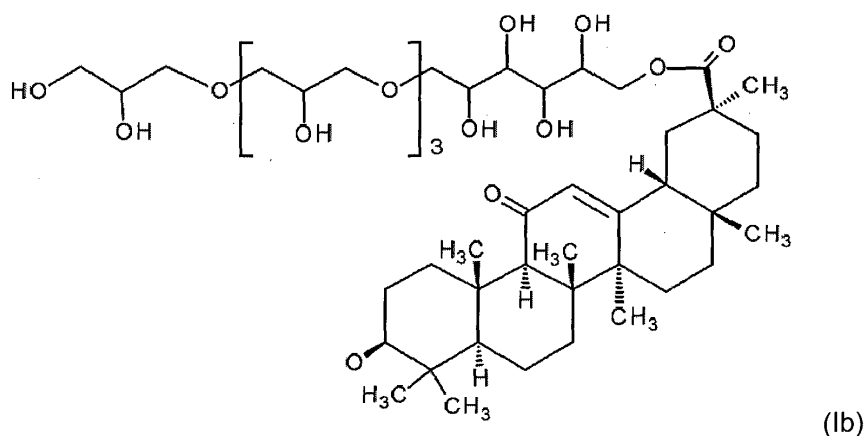
[0034] El resto de sorbitol, que es Sorb, está presente en el éster de la invención en un número de 1 a 3, preferiblemente, el éster de la invención comprende únicamente un resto de sorbitol, n es 1.

[0035] De acuerdo con una realización preferida, el éster de la presente invención comprende un resto de poliglicerol-3, en el que las tres unidades de glicerol están unidas entre sí en una configuración α - α , y un resto de sorbitol, que tiene la fórmula (Ia):



(Ia)

[0036] En otras realizaciones, el éster de la invención tiene las siguientes fórmulas:



5 **[0037]** De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para preparar el éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I), que comprende las etapas de:

- i) hacer reaccionar glicerol o poliglicerol para dar un éter; y
 ii) hacer reaccionar dicho éter con ácido glicirretínico para dar el éster que tiene la fórmula (I).

10

[0038] En la etapa i) el glicerol o el poliglicerol pueden usarse puros o en una mezcla de los mismos.

[0039] En algunas realizaciones de la invención, se usan glicerol or poliglicerol en una forma pura.

15

[0040] Etapa ii) de la esterificación puede catalizarse por ácidos o bases. En algunas realizaciones de la invención se usa un catalizador ácido, por ejemplo, ácido paratoluenosulfónico o ácido metanosulfónico, o sin catalizador añadido, en este caso aprovechando la acidez del propio ácido glicirretínico.

20

[0041] La síntesis de laboratorio puede realizarse usando diferentes equipos. Por ejemplo, puede usarse un reactor esférico de vidrio (matraz) colocado en el interior de un horno de microondas, dotado de un mezclador de anclaje, un termómetro de contacto, un tubo de succión de nitrógeno, un destilador Claisen complementado en la

parte superior por un destilador Graham y en la última boca un embudo de adición. Como alternativa, es posible utilizar un reactor que consiste en un matraz de vidrio pirex de dos bocas situado en el interior de un horno eléctrico de laboratorio y conectado a un candelabro de vidrio de tres cuellos, que permite el paso de la barra metálica para agitar mecánicamente el producto (barra central) y para hacer circular un flujo de nitrógeno. Las temperaturas de reacción son variables y pueden ser de 145 °C a 180 °C en caso de una síntesis en un horno microondas, y de 130 °C a 220°C en caso de una síntesis en un horno eléctrico.

[0042] Para la síntesis se usan típicamente cantidades aproximadamente equimolares de glicerol u oligómeros del mismo y ácido glicirretínico, o se suministra un ligero exceso de glicerol o poliglicerol, por ejemplo, un 5-10 %.

[0043] Ajustando convenientemente las relaciones molares entre los reactivos y los tiempos de reacción es posible obtener en el producto de reacción una prevalencia del éster deseado. De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere a un éster que tiene la fórmula (I) que puede obtenerse mediante el proceso de síntesis que se ha descrito anteriormente.

[0044] La caracterización del éster que tiene la fórmula (I) de la invención puede hacerse mediante medios cromatográficos, en particular, a través de la técnica SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). Con esta técnica se obtienen cromatogramas que indican picos, correspondientes a una sustancia o fracción que sale del instrumento, en función del tiempo; después de haber calibrado el instrumento con compuestos de referencia, teniendo convenientemente un volumen hidrodinámico similar al de las moléculas o el polímero a detectar; por ejemplo, un poliestireno que tiene un peso molecular conocido, la técnica proporciona entre otros los valores:

- Mn, peso molecular medio en número (media aritmética ponderada);
- Pm, peso molecular medio en peso (media ponderada);
- D (polidispersidad), relación Mp/mn.

[0045] Cuando más se aproxima el valor D a 1, más pura es la molécula.

[0046] La comparación entre los espectros ^1H y ^{13}C RMN (en d_6 -DMSO) de ácido glicirretínico, de poliglicerol-3-sorbitol y del producto de reacción o poliglicerol-3 sorbitol éster de ácido glicirretínico (fórmula I) de acuerdo con una realización de la invención, muestra en el producto (éster) de la invención ambas señales de ácido glicirretínico, por ejemplo en la ^1H RMN, están presentes las señales típicas de 7 grupos CH_3 en $\delta = 0,5-1,4$ ppm, y las señales de poliglicerol-3-sorbitol. Por otra parte, la señal de protón del grupo carboxilo está ausente para dar evidencia de la formación de un enlace éster.

[0047] En el espectro del producto, la evaluación de la integral de la señal de protón presente en el doble enlace carbono-carbono en $\delta = 5,4$ ppm y su comparación con la integral de los protones de poliglicerol-3-sorbitol en $\delta = 3,1-3,7$ ppm determina la relación entre los dos componentes comprendida entre aproximadamente 1:3 y 1:4 (con la ventaja de poliglicerol-3-sorbitol).

[0048] La presencia de picos a: 127 ppm con respecto a C sp^2 unido a C=O , a 170 ppm de C sp^2 sin protones, a 178 ppm del grupo O-C=O del éster y a 200 ppm de C con respecto al carbonilo conforman además la formación del éster.

[0049] De acuerdo con otro aspecto más, la invención se refiere a composiciones cosméticas, en particular composiciones para uso tópico, que comprenden al menos un éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I) y al menos un vehículo cosméticamente aceptable. Los vehículos cosméticamente aceptables adecuados para la composición de la invención pueden ser ingredientes seleccionados de entre modificadores de la reología, plastificantes, emulsionantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes de refracción, agentes solubilizantes, colorantes, lubricantes, estabilizadores, agentes acondicionadores, fragancias, aceites esenciales, adsorbentes, conservantes, agentes tamponantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes antiseborreicos, agentes antiestáticos, agentes absorbentes, filtros solares químicos o físicos, astringentes, agentes quelantes, agentes acondicionadores de la piel, agentes de recubrimiento, agentes desnaturalizantes, agentes despigmentantes, emolientes, agentes emulsionantes, agentes no filmógenos, agentes humectantes, agentes hidrótrofos, agentes lenitivos, agentes suavizantes, agentes matificantes o nacarados, agentes protectores de la piel, agentes reductores, agentes refrescantes, agentes reengrasantes, disolventes, emulsiones, estabilizantes, agentes tonificantes, agentes humectantes, o mezclas de los mismos.

[0050] Las composiciones para uso tópico de la invención pueden ser para aclarar y tienen propiedades adecuadas para aplicaciones en el campo cosmético y dermatológico.

[0051] De acuerdo con algunas realizaciones, al menos un éster de ácido glicirretínico que tiene la fórmula (I) está presente en la composición cosmética de la invención en cantidades del 0,01 al 20 % en peso, preferiblemente del

0,05 al 5 % en peso sobre el peso de la composición.

[0052] La composición cosmética de la invención puede estar en cualquier forma adecuada para aplicación local o tópica.

[0053] La composición de la invención puede estar en forma líquida, por ejemplo, en forma de una loción, solución, suspensión, champú, leche, o en forma sólida o semisólida o fluida, por ejemplo, como un acondicionador, serum, pomada o crema.

[0054] En algunas realizaciones, la composición de la invención está en forma líquida, por ejemplo, en forma de una loción basada en agua que contiene uno o más vehículos y/o excipientes adecuados para aplicaciones cosméticas.

[0055] En la forma líquida, la composición puede contener generalmente agua de aproximadamente el 1 al 99,9 % en peso. En algunas realizaciones, el agua está presente en cantidades del 5 al 95 % en peso. En otras realizaciones, el agua está presente en cantidades del 10 a 90 % en peso.

[0056] En algunas realizaciones de la invención, la composición cosmética es anhidra o contiene una cantidad de agua de menos del 10 % en peso.

[0057] En otras realizaciones de la invención, el vehículo cosméticamente aceptable es anhidro o contiene una cantidad de agua menor del 2 % en peso, confinada dentro de una cápsula de gelatina blanda.

[0058] En algunas realizaciones, el vehículo de la composición de la invención es una preparación base para formulaciones cosméticas, preferiblemente para la formulación de preparaciones fluidas adecuadas para aplicación en la piel.

[0059] La composición de la invención puede aplicarse, en una cantidad eficaz, directamente sobre la porción a tratar, típicamente la cara o la piel del cuerpo o sobre el cuero cabelludo.

[0060] En las realizaciones particularmente preferidas, la composición de la invención tiene las siguientes formulaciones, donde la concentración de cada componente se expresa en % en peso sobre el peso total de la composición:

Formulación 1 - SERUM HIDRATANTE	
Componente	Concentración p/p (%)
Copolímero de VP de acriloldimetiltaurato de amonio	0,10-1,50
Sorbato potásico	0,01 - 0,10
Benzoato sódico	0,01 - 0,10
Pentilenglicol	0,50 - 4,00
Éster que tiene la fórmula (I)	0,05 - 1,00
Propanodiol	0,50 - 8,00
Hidróxido sódico	0,005-0,20
Ácido cítrico	c.s. a pH 5,2-5,4;
Glicerol	0,50-8,00
PEG-8 Dimeticona	0,50-8,00
Agua	c.s. hasta 100
Formulación 2 - CHAMPÚ LENITIVO	
Componente	Concentración p/p (%)
Laureth sulfosuccinato disódico	1,00-7,00
Di-PPG-2-Mireth-10 Adipato	0,50-3,00
Cocoanfodiacetato disódico	0,50-3,00
Lauril sulfato de amonio	0,50-3,00
Policuaturnio-10	0,10-0,50
EDTA tetrasódico	0,05-0,20
Fragancia	0,10-1,50
Hidroxipropiltrimonio de almidón de maíz hidrolizado	0,05-1,00
BHA	0,005-0,015
Cloruro potásico	0,50-1,50
Dimeticona PEG-7 isoestearato	0,5-1,50
Dioleato de metilglucosa PEG-120	0,10-0,90

Laureth-3	0,01-0,80
Isoestearato de glicerilo PEG-90	0,10-0,80
Glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8	0,50-1,00
Éster que tiene la fórmula (I)	0,05-1,00
Hidroximetilglicinato sódico	0,20-0,45
Ácido cítrico	c.s. a pH 5,5 - 6,0
Agua	c.s. hasta 100

Formulación 3 - DESMAQUILLANTE	
Componente	Concentración p/p (%)
Agua	c.s. hasta 100
Etilhexilglicerina	0,25-0,50
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40	0,50 - 6,00
PPG-26-Buteth-26	0,50 - 6,00
Metilpropanodiol	0,50 - 4,00
Propanodiol	0,10-6,00
EDTA disódico	0,025-0,05
Fenoxietanol	0,20-0,80
Hidróxido sódico	c.s. a pH 5,2
Éster que tiene la fórmula (I)	0,05 - 1,80

Formulación 4 - LECHE CORPORAL	
Componente	Concentración p/p (%)
Glicerina	1,00-6,00
Metilpropanodiol	1,00-6,00
Cetil Hidroxetilcelulosa	0,10-0,40
Goma xantano	0,10-0,40
Almidón de tapioca	1,00-2,00
EDTA disódico	0,025-0,20
Estearato de sorbitán	2,00-5,00
Cocoato de sacarosa	0,10-1,00
Palmitato de etilhexilo	1,00-5,00
Polideceno hidrogenado	100-5,00
Triglicéridos caprílicos/cápricos	1,00-5,00
Manteca de Karité (<i>Butyrospermum parkii</i>)	1,00-5,00
Aceite de semilla de hierba de la pradera (<i>Limnanthes alba</i>)	1,00-3,00
Dimeticona	1,00-3,00
Hidroximetilglicinato sódico	0,10-0,20
Éster que tiene la fórmula (I)	0,05-1,00
Fenoxietanol	0,70-0,90
Ácido láctico	c.s. a pH 5,5 - 6,0
Fragancia	0,30
Delta tocoferol	0,02-0,25
Sorbitil furfural	0,10-0,90
Agua	c.s. hasta 100

Formulación 5 - AGUA TONIFICANTE	
Componente	Concentración p/p (%)
Glicerina	1,00-5,00
Éster que tiene la fórmula (I)	0,50-10,0
Inositol	0,05-0,50
Trehalosa	0,50-1,00
Alantoína	0,001-0,10
Fragancia	0,05-0,30
Fenoxietanol	0,3-0,60
Hidroximetilglicinato sódico	0,05-0,20
Ácido láctico	c.s. a pH 5,5 ± 0,15
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40	2,00-15,00
Metilpropanodiol	1,00-6,00
Éster que tiene la fórmula (I)	0,05-1,50
Agua	c.s. hasta 100

5 [0061] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratamiento cosmético que

comprende la aplicación local de una cantidad eficaz de una aplicación cosmética del tipo que se ha descrito anteriormente.

[0062] Las composiciones cosméticas de la invención ofrecen ventajas en comparación con el uso cosmético o dermatológico del ácido glicirretínico como tal o composiciones cosméticas que lo contienen como será evidente a partir de los siguientes Ejemplos. El glicerol o el poliglicerol son sustancias inocuas que se pueden utilizar y son capaces de formar estructuras poliméricas muy diferentes entre ellas, lineales, ramificadas e hiper-ramificadas con mejores características de solubilidad y citotoxicidad en comparación con los polímeros de glicol polietilénico (utilizados en composiciones conocidas). Además, seleccionando un peso molecular preciso de la cadena poliglicérica, es posible modular las propiedades de las composiciones que la contienen, siendo estas propiedades del tipo químico-físico, por ejemplo, la solubilidad o cinética de absorción del principio activo, hasta la realización de formas de liberación modificada del ácido glicirretínico reguladas por un mecanismo químico, debido al hecho de que el enlace éster, en ciertas condiciones, puede ser susceptible a la hidrólisis o la escisión enzimática *in situ*.

[0063] Aplicado sobre la piel, el éster de la invención, debido a la presencia de una serie de grupos hidroxilo capaces de formar puentes de hidrógeno con muchas moléculas de agua, se comporta como un depósito multifuncional para ácido glicirretínico, capaz de normalizar y humedecer la piel en profundidad.

[0064] Finalmente, el éster de la invención es particularmente ventajoso, a la luz de la mayor tolerabilidad en comparación con el ácido glicirretínico, con el fin de producir una acción de normalización del sebo para la piel. Como se sabe, a nivel de las glándulas sebáceas, la concentración de hormonas andrógenas es el factor regulador más importante de la secreción de sebo; en particular, la enzima 5-alfa reductasa convierte la 4-androstenediona en dihidrotestosterona, un metabolito capaz de aumentar significativamente la secreción sebácea.

[0065] Una ventaja adicional obtenida con el uso cosmético del éster de la invención está relacionada con la acción antimicrobiana del ácido glicirretínico que produce una reducción global de la actividad lipasa de origen bacteriano, asociada a una menor producción de ácidos grasos libres que determina una acción de normalización del sebo para la piel.

[0066] Se entiende que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para el éster de la invención también deben considerarse igualmente preferidos y ventajosos para la composición cosmética, el proceso de preparación y los usos del éster y la composición cosmética.

[0067] A continuación se indican Ejemplos de preparación de compuestos de acuerdo con la presente invención, así como ejemplos de evaluación de su eficacia, proporcionados a modo de ejemplos no limitativos.

[0068] En el trabajo experimental a que se hace referencia en los ejemplos, se han utilizado los siguientes materiales de partida:

- ácido glicirretínico, título mínimo al 98 %, Selectchemie, Milán - Italia;
- poliglicerol-3, poliglicerol-4 y poliglicerol-6, CAS 25618-55-7: PG-3 vegetal puro, PG-4 vegetal puro y PG-6 vegetal puro, respectivamente Spiga Nord, Carasco (Genova), Italia;
- poliglicerol-10, CAS 25618-55-7: Natrulon H10, Lonza;
- sorbitol al 70 % Neosorb 70/70B no cristizable Roquette Freres SA, (F);
- sorbitol en polvo Neosorb P100 T Roquette Freres SA, (F).

[0069] El PG-3 poliglicerol vegetal puro, preferido para los propósitos de la invención, se ha caracterizado con el ensayo SEC antes de su uso, proporcionando los siguientes resultados: Mn = 4818; Pm = 4931; Mp = 4693; D = 1.023. El índice de polidispersidad, igual a 1,02, indica un producto muy puro, esencialmente formado sólo por una unidad de poliglicerol-3.

[0070] En cuanto a la pureza del poliglicerol, cabe señalar que los productos comerciales utilizados pueden contener también monómeros y oligómeros con un nivel de polimerización más bajo y más alto. Por ejemplo, el Poliglicerol-3 puede contener hasta 15 de glicerol, así como poligliceroles de mayor peso molecular.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación del éster que tiene la fórmula (Ia)

i) Preparación de éster de poliglicerol-3 y sorbitol

[0071] Se han puesto 240 g de poliglicerol-3 en un reactor esférico de vidrio (matraz) situado en el interior de un horno de microondas. El matraz está dotado de un mezclador de anclaje, un termómetro de contacto, un tubo de

succión de nitrógeno, un destilador Claisen complementado en la parte superior por un destilador Graham y en la última boca un embudo de adición.

5 **[0072]** Después de una primera limpieza con nitrógeno, se activaron tanto el calentamiento como una agitación lenta. Una vez se alcanzó la temperatura de 90/95 °C, el sistema se colocó bajo una corriente muy ligera de nitrógeno.

[0073] Se añadieron 0,25 g de ácido metanosulfónico, ajustando una agitación vigorosa en el interior del reactor.

10 **[0074]** En este punto, la mezcla de reacción se puso a alto vacío y se añadieron por goteo 260 g de sorbitol (solución al 70 %) en el matraz.

[0075] Al final de la adición de sorbitol (aproximadamente 60 minutos), se dejó reaccionar durante 2 horas más, siempre a una temperatura de 90-95 °C. Por lo tanto, la mezcla de reacción se dejó enfriar.

15 ii) Preparación del éster que tiene la fórmula (Ia)

[0076] Se pusieron 404 g de éter de poliglicerol-3 y sorbitol y 470 g de ácido glicirretínico en un reactor esférico de vidrio (matraz) situado en el interior de un horno de microondas.

20 **[0077]** Después de una primera limpieza con nitrógeno, se activó el calentamiento. Una vez se alcanzó la temperatura de 120 °C, la mezcla de reacción se puso al vacío, el sistema se puso en agitación ligera y corriente ligera de nitrógeno. A 160 °C, se ajustó una agitación vigorosa en el interior del reactor.

25 **[0078]** La destilación del agua de reacción comenzó a aproximadamente 146 °C. Durante aproximadamente 80 minutos, se destiló aproximadamente el 20 % del agua de reacción total. En este punto, el transcurso de la esterificación se siguió de la determinación del índice de acidez (indicador: fenoltaleína).

30 **[0079]** Cuando el índice de acidez alcanzó un valor inferior a 5 y la temperatura de 180 °C (generalmente después de 60 minutos de reacción), se consideró que la esterificación se había logrado.

[0080] El sistema se enfrió a 80 °C y el reactor se descargó.

35 **[0081]** La destilación del agua de reacción se redujo significativamente cuando el producto alcanzó aproximadamente 160 °C. La duración de la reacción de laboratorio fue de aproximadamente 3 horas. Se obtuvo un producto denso, ligeramente de color ámbar y casi inodoro.

Ejemplo 2. Preparación del éster que tiene la fórmula (Ia)

40 i) Preparación de éter de poliglicerol-3 y sorbitol

[0082] Si se utiliza un sistema de calefacción convencional, y no el horno de microondas del Ejemplo 1, se han considerado las siguientes variaciones:

45 Después de la limpieza con nitrógeno y la agitación lenta, el poliglicerol se calentó a 120-140 °C y, una vez se alcanzó tal temperatura, se añadió el catalizador (ácido metanosulfónico al 0,20-0,35 %). Opcionalmente, también pudo añadirse un 0,1 % de ácido hipofosfórico para proteger el producto de una coloración excesiva.

50 Posteriormente, el sistema se puso al vacío a -0,5 bar con respecto a la presión atmosférica. Se añadieron lentamente varias veces 182,17 g de sorbitol en polvo. El sistema se mantuvo siempre a 140 °C al vacío a 0,5 bar hasta la finalización de la reacción (aproximadamente 3-5 horas) y la obtención de un producto uniforme líquido de una fase viscoso y muy transparente.

55 ii) Preparación del éster que tiene la fórmula (Ia)

[0083] Se pusieron 404 g de poliglicerol-3 éter y sorbitol y 470 g de ácido glicirretínico en un reactor esférico de vidrio (matraz).

60 **[0084]** Después de la limpieza con nitrógeno y la agitación lenta, la temperatura de reacción se llevó a 150 + 10 °C.

[0085] Una vez se alcanzó la temperatura deseada, se añadió el catalizador, ácido paratoluenosulfónico, a un porcentaje igual al 0,3 %.

[0086] Si es necesario, también pudo añadirse un 0,1 % de ácido hipofosfórico para proteger el producto de una coloración excesiva.

5 [0087] El sistema se puso al vacío a -0,5 bar (con respecto a la presión atmosférica).

[0088] Después de aproximadamente 3-4 horas, la reacción se completó, obteniendo un producto uniforme líquido de "una fase" de color ámbar altamente viscoso.

10 [0089] El transcurso de la esterificación se siguió de la determinación del índice de acidez que alcanzó un valor inferior a 5 (indicador: fenolftaleína).

Ejemplo 3. Preparación del éster que tiene la fórmula (Ib)

15 [0090] El proceso fue como en el Ejemplo 1, pero en este caso se usaron 314 g de poliglicerol-4 y, posteriormente, (esterificación con ácido 18 beta glicirrético) cantidades equimolares de los dos reactivos.

Ejemplo 4. Preparación del éster que tiene la fórmula (Ic)

20 [0091] El proceso fue como en el Ejemplo 1, pero en este caso se usaron 462 g de poliglicerol-6 y, posteriormente, (esterificación con ácido 18 beta glicirrético) cantidades equimolares de los dos reactivos.

Ejemplo 5. Preparación del éster que tiene la fórmula (Id)

25 [0092] El proceso fue como en el Ejemplo 1, pero en este caso se usaron 758 g de poliglicerol-10 y, posteriormente, (esterificación con ácido 18 beta glicirrético) cantidades equimolares de los dos reactivos.

Ejemplo 6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del éster de fórmula (Ia)

30 [0093] Los efectos antiinflamatorios del éster que tiene la fórmula (Ia) del Ejemplo 1 (denominado "POLY-GLY-S" para abreviar la descripción) se han investigado en un modelo de inflamación *in vitro*, en queratinocitos humanos NCTC2544 y usando lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* como mediador del estado inflamatorio. El efecto del derivado en los modelos utilizados se ha comparado con el ácido 18-β-glicirrético (denominado "18-β" para abreviar la descripción).

35 [0094] Además, se determinó el potencial inflamatorio *in vitro* de POLY-GLY-S hacia un control positivo (células tratadas con 5 µg/ml de lipopolisacárido). Los datos obtenidos se han comparado con los obtenidos, en el mismo modelo experimental, usando 18-β.

40 MATERIALES

Modelo biológico

45 [0095] La línea de queratinocitos humanos NCTC2544 (Perry V.P. et al., 1957) se ha obtenido en el Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Génova, Italia.

Cultivo y propagación de la línea celular

50 [0096] La línea inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC 2544 (Perry V.P. et al., 1957) se mantuvo en cultivo en matraces estériles (25 cm³), se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda en CO₂ al 5 % en medio de cultivo MEM (medio mínimo esencial) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %, en presencia de penicilina al 1 % y estreptomicina.

55 [0097] La división 1:3 se realiza cada 2 días una vez se alcanza la monocapa, mediante lavado con PBS 1 x (tampón fosfato sin Ca²⁺ ni Mg²⁺) y desprendiendo las células con una solución de tripsina-EDTA a 37 °C durante 2 minutos.

Reactivos e instrumentos usados

60 [0098]

REACTIVOS	EMPRESA
-----------	---------

EMEM (EBSS) sin L-glutamina	Lonza (BE12-125F)
Solución de aminoácidos (100 x)	Lonza (BE13-114E)
FBS ES	Lonza (DE14-850F)
PEN STREP MIX (Penicilina 10.000 UI/ml, Estreptomicina 10.000 UI/ml)	Lonza (DE17-602F)
L-glutamina 200 mM	Lonza (BE17-605E)
DMSO	SIGMA (D1435)
PBS 1 x con/sin Ca^{2+} o Mg^{2+}	Lonza (BE17-516F)
Mezcla de tripsina-verseno (EDTA) (1 x)	Lonza (BE17-161 E)
Azul de tripano	Sigma (T8154-20ML)
MEM Eagle EBSS (2 x), con/sin L-Gln, rojo de fenol	Lonza (BE12-668-E)
MTT	Sigma (M21281G)
Cloroformo	Sigma (366919)
Agarosa	Sigma (A9539)
Solución de bromuro de etidio	Sigma (E1510)
Tampón de carga en gel	Sigma (G2526)
Tri-reactivo	Sigma (T9424)
2-Propanol	Sigma (59304)
Tampón tris Acetato-EDTA	Sigma (T9650)
Agua	Sigma (95284)
Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad	Applied Biosystems (4368814)
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems (4324018)
Lipopolisacárido de <i>E. Coli</i>	Sigma (L4391)

INSTRUMENTOS	EMPRESA
Microscopio de fase invertida/contraste	Leica
Campana de flujo laminar	Steril Manufacturing Division
Incubadora HeraCell CO2 (Mod:150 ADV)	Thermo Scientific
Baño digital termostático	Stuart
Congelador horizontal a -80 °C	Elcold
Cámara Burkert	Carlo Erba
Báscula (Mod. AM100)	Mettler
Lector de microplacas espectrofotométrico (Mod: ELX808) + Software Gen5	BioTek
Espectrofotómetro UV-visible (MOD: 6715, BS-6715B0)	JenWay
Vórtex analógico (Mod. Sa8, BS-SAB)	Stuart
Sistema PCR en tiempo real (Mod: Mx3000P)	Stratagene
PcDell + Software MX3000P versión 1.2 y 2.00	Stratagene
Trans-UV (ACDM-ECXF15M)	Vilber Lourmat
Cámara de electroforesis horizontal (MOD: 250-5159)	Ward
Fuente de alimentación de cámara de electroforesis (MOD: 36-5112)	Ward
Cámara digital + Dispositivo de protección UV (S630)	Samsung
Centrífuga de mesa (Galaxy 7d)	VWR
Mezclador (TR13)	Girmy

Compuestos activos ensayados

5 [0099]

NOMBRE DE IDENTIFICACIÓN ÚNICO	"POLY-GLY-S" Éster que tiene la fórmula (Ia) (Ejemplo 1)	"18-β" Ácido 18-beta-glicirético
ALMACENAMIENTO	ta	ta
CONCENTRACIONES	0,625, 1,25, 2, 2,5, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 80 μM*	2,5, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 80 μM*
* Todas las concentraciones se refieren al compuesto activo en la matriz de uso		

Control

- 10 [0100] **Control negativo:** Los queratinocitos humanos NCTC2544 se mantuvieron en cultivo en EMEM (EBSS) en FBS al 2,5 %, complementado con L-glutamina 2 mM, una solución aminoacídica al 1 % y una mezcla de penicilina al 1 % (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 Ug/ml) a 37 °C, CO₂ al 5 %.

[0101] Control positivo: Los queratinocitos humanos NCTC2544 se trataron con LPS (5 µg/ml) en EMEM (EBSS) en FBS al 2,5 %, complementado con L-glutamina 2 mM, una solución aminoacídica al 1 % y una mezcla de penicilina al 1 % (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 Ug/ml) a 37 °C, CO₂ al 5 %.

5 MÉTODOS

Ensayo MTT

10 **[0102]** El ensayo MTT es útil para evaluar la viabilidad celular *in vitro* tras el tratamiento con compuestos diluidos. El método MTT se ha usado como una medida indirecta de la viabilidad celular.

[0103] Se han examinado los efectos sobre la proliferación celular de NCTC 2544 a partir de los compuestos 18-β y POLY-GLY-S a diferentes concentraciones.

15 **[0104]** Las células se han colocado en placas a bajas densidades y se han tratado con diferentes concentraciones de compuestos activos y control negativo, en un medio de cultivo EMEM, sin rojo de fenol complementado al 10 % con FCS, L-glutamina 2 mM, una solución al 1 % de NEAA y una mezcla de antibióticos al 1 % durante 24, 48 y 72 horas, y la viabilidad celular se ha evaluado mediante el ensayo MTT. El porcentaje de viabilidad celular comparado con el control (Figuras 1-2) se ha calculado después de 24, 48 y 72 horas de incubación. El ensayo mostró que
20 después de 24 horas de incubación, ninguna de las concentraciones de ácido 18-β-glicirrético (Figura 1) y de éster que tenía la fórmula (Ia) (Figura 2) mostraron un efecto citotóxico sobre NCTC2544 en comparación con el control. Se han obtenido los mismos resultados después de una exposición prolongada de las células (48-72 horas) a los compuestos ensayados para todas las concentraciones consideradas.

25 **Ensayo de evaluación de la inflamación**

[0105] La expresión del gen de TNF-α en las células NCTC 2544 se evaluó por RT-PCR.

30 **[0106]** El análisis de la expresión génica implica cuatro etapas:

1. Tratamiento celular con compuestos activos durante 48 h;
2. Extracción de ARN;
3. Transcripción inversa en ADNc;
4. Transcripción inversa cuantitativa.

35 *Tratamiento de las células NCTC2544*

[0107] En las condiciones experimentales, en relación con los resultados obtenidos en el ensayo MTT anterior, POLY-GLY-S y 18-β se han ensayado a una concentración de 20 µM (concentración final en el medio de cultivo). Se
40 ha ensayado tanto el control positivo como el control negativo.

Ensayo antiinflamatorio en NCTC2544

Día 1: Siembra celular

45 **[0108]** Cuando las células (queratinocitos humanos NCTC 2544) habían alcanzado aproximadamente un 80 % de confluencia, se retiraron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/ml en placas de 12 pocillos y después se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % (24 h).

50 **Días 2-3: Exposición a sustancias durante 48 horas**

[0109] Cuando las células habían alcanzado aproximadamente un 80 % de confluencia, el medio completo se retiró; las células se lavaron con PBS 1 x y se incubaron en EMEM (EBSS) con FBS al 2,5 %, complementado con L-glutamina 2 mM, una solución al 1 % de NEAA y una mezcla al 1 % de antibióticos a 37 °C, CO₂ al 5 % durante al
55 menos 4 h.

[0110] POLY-GLY-S y 18-β se disolvieron en EMEM complementado con FBS al 2,5 %, L-glutamina 2 mM, una solución al 1 % de NEAA y una mezcla de penicilina al 1 % (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 µg/ml).

60 **[0111]** Se han incluido en cada placa controles que contenían sólo medio de cultivo (control negativo) y medio de cultivo más LPS (5 µg/ml) (control positivo).

[0112] Las células se expusieron a concentraciones crecientes de compuestos a ensayar, es decir 2,5-5-10 µM.

[0113] En cada pocillo se añadió LPS a una concentración de 5 µg/ml. Cada muestra se ensayó por duplicado.

[0114] Después, las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h.

Extracción de ARN

[0115] El ARN total se extrajo de las células usando una única solución homogénea Tri-reactivo (Sigma Aldrich) para aislar el ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0116] La pureza del ARN total extraído se evaluó leyendo la absorbancia a 260 nm, es decir, valor de λ correspondiente a la absorbancia máxima del ácido nucleico. También se leyó la absorbancia a 280 nm para evaluar la contaminación de proteínas o fenoles. Se consideró que el ARN era de buena calidad si la relación $R = A_{260}/A_{280}$ era $>1,4$.

[0117] Después de determinar la concentración de ARN total y la pureza, cada muestra de ARN se diluyó en agua DEPC a una concentración final de 2 µg/ml. Esta es la concentración requerida por el kit de transcripción inversa. También se llevó a cabo una electroforesis en gel para evaluar la integridad del ARN total extraído.

Transcripción inversa en ADNc

[0118] El ARN total extraído y cuantificado se amplificó usando el "kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad" (Applied Biosystems).

[0119] Se usaron cebadores aleatorios con el fin de garantizar una síntesis eficaz de la primera cadena de ARNm.

[0120] Se usó el sistema de RT-PCR Mx3000P (Stratagene) para la amplificación y cada ARN total se amplificó por duplicado.

Condiciones de amplificación	Etapas 1:	Etapas 2:	Etapas 3:	Etapas 4:
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	25 °C
Tiempo	10 min	120 min	60 s	mantenimiento

[0121] Después de la amplificación, las muestras se diluyeron con 30 µl de agua DEPC y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

PCR en tiempo real

[0122] El análisis por RT-PCR se realizó usando sondas lineales TaqMan (Applied Biosystems). Estas sondas son el sistema de detección más utilizado y publicado para las aplicaciones qPCR. Se seleccionaron las sondas y el cebador en base a estudios bibliográficos específicos anteriores.

[0123] Se utilizó el método de cuantificación relativa donde se compara la concentración génica relativa de interés (diana) con muestras desconocidas con respecto a un calibrador o muestra de control (células no tratadas).

[0124] Se usaron los siguientes genes:

NOMBRE DEL GEN	ID DE ENSAYO TAQMAN	Programa de amplificación		Longitud de amplicón
GAPDH (constitutivo)	Hs99999905_m1	95 °C	15 s	122
		60 °C	60 s	
		durante 40 ciclos		
TNF-α (diana)	Hs00174128_m1	95 °C	15 s	105
		60 °C	60 s	
		durante 40 ciclos		

Procedimiento experimental

[0125] Se realizó una RT-PCR usando células tratadas en momentos diferentes de tratamiento y ADNc de células de control. Se añadieron 10 µl de mezcla maestra de expresión génica TaqMan 2 x y 1 µl de expresión génica 20 x TaqMan al ADNc. Cada muestra biológica se trató por duplicado y se amplificó como se indica en la tabla:

ETAPA	Etapa 1: Incubación UDG	Etapa 2: Activación de ADN polimerasa AmpliTaQ Gold	Etapa 3: PCR	
	Mantenimiento	Mantenimiento	Ciclo (50 ciclos)	
			Desnaturalizar	Hibridar/Extender
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15 s	Mantenimiento

Recopilación de datos

5 [0126] Los datos proporcionados a partir del instrumento Stratagene Mx3000P se han registrado desde el software interno MXpro v. 4.01. Una vez completada la amplificación, el software aplica automáticamente el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores de Ct diana y normalizador deberían estar idealmente dentro de aproximadamente diez ciclos entre sí.

10 [0127] La cuantificación comparativa resultante es un diagrama relativo comparativo. Un valor igual a uno significa que no hay cambios en la expresión génica del gen diana entre la muestra que se está estudiando y el calibrador, mientras que si es más alta significa regulación ascendente, si es inferior a uno significa regulación descendente. Un valor se considera significativamente significativo si es superior o inferior a una vez (regulado en ascenso o en descenso) en comparación con el calibrador.

Resultados

15 [0128] TNF- α se sobreexpresa típicamente en la piel de individuos que padecen psoriasis (Kristensen et al, 1993; Ettehadi et al, 1994) y juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. El papel clave del TNF- α se apoya además tanto en la evidencia de que en la psoriasis otros genes regulados por TNF- α están excesivamente expresados y que los antagonistas de TNF- α se usan como agentes terapéuticos altamente eficaces en la mayoría de los pacientes (Richardson y Gelfand, 2008). Recientemente, se ha sugerido que el TNF- α inhibe la expresión de las proteínas de barrera (por ejemplo, FLG y LOR), que los antagonistas de TNF- α pueden contribuir a la mejora clínica de pacientes que padecen psoriasis, aumentando la expresión de las proteínas de barrera (Kim et al.2011).

25 [0129] McRitchie et al. (1997) han demostrado recientemente que 10 μ g/ml de LPS de *E. coli* estimulan masivamente la producción de TNF- α por células epiteliales alveolares dentro de las 4 h. En el estudio realizado, se encontró que el tratamiento con LPS de *E. coli* (5 μ g/ml) tenía un efecto similar sobre la inducción de TNF- α y, por lo tanto, sobre el proceso inflamatorio en células NCTC 2544 a partir de 16 h de tratamiento.

30 [0130] De hecho, se evaluó que el tratamiento de NCTC2544 durante 16, 24 y 48 horas con LPS (5 μ g/ml) en EMEM con FBS bajo (2,5 %) estimuló significativamente la producción de TNF- α y, por lo tanto, se estudió la expresión del gen de TNF- α en las células NCTC 2544 después de la exposición a los dos compuestos que se examinaron.

35 [0131] A las 16 horas de incubación, se encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la expresión del gen de TNF- α en comparación con el control negativo y las células NCTC 2544 tratadas con LPS (5 μ g/ml) (control negativo) (Figura 3). En comparación con el control negativo, la expresión del gen de TNF- α en las células NCTC 2544 aumentó significativamente ($P < 0,05$) de aproximadamente tres veces después de 24 horas de tratamiento con LPS (5 μ g/ml) y este efecto se mantuvo también después 48 horas de incubación (Figura 3).

40 [0132] Después de este experimento de validación preliminar, se evaluó la expresión del gen de TNF- α mediante RT-PCR en las células NCTC 2544, después de tratamientos con 2,5-5 y 10 μ M de 18- β , y 2,5-5 y 10 μ M de POLY - GLY-S, añadido en células con LPS a 5 μ g/ml en EMEM con FBS bajo (2,5 %). Para una mejor representación de los datos recogidos, los resultados se han expresado como una relación porcentual en comparación con las células tratadas sólo con LPS. Después de 48 horas de tratamiento (Figura 4), 18- β ya no tenía efecto antiinflamatorio. Por el contrario, POLY-GLY-S (Figura 4) en todas las concentraciones ensayadas fue significativamente eficaz ($P < 0,05$) en la inhibición de la expresión del gen de TNF- α . Por otra parte, los porcentajes de inhibición de la expresión del gen de TNF- α eran mayores que las mismas concentraciones de 18- β . En particular, 2,5, 5 y 10 μ M de POLY-GLY-S produjeron una inhibición del 43,99 %, 40,71 % y del 54,36 %, respectivamente.

Conclusiones

[0133] En base a los datos obtenidos, se observa que, al usar 2,5-5 y 10 μ M, tanto 8- β como POLY-GLY-S se toleraron bien por los queratinocitos humanos NCTC2544.

55 [0134] En cuanto al ensayo antiinflamatorio, se valoró en primer lugar la validación del método utilizado, ya que se observó un claro aumento de TNF- α después del tratamiento celular con LPS 5 μ g/ml en comparación con las

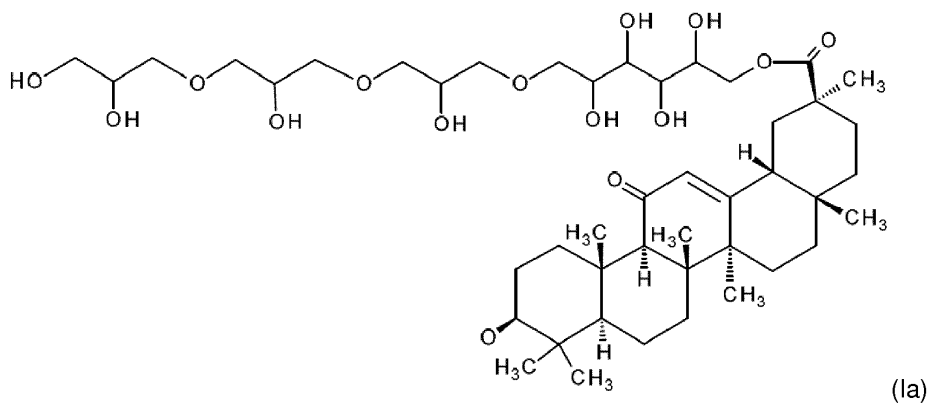
células no tratadas.

- 5 **[0135]** POLY-GLY-S mostró un efecto antiinflamatorio sobre la expresión del gen de TNF- α después de 48 horas de incubación. En todas las concentraciones ensayadas, POLY-GLY-S fue capaz de reducir la expresión del gen de TNF- α en al menos un 50%, produciendo un efecto inhibidor mayor que el producido por 18- β .

Chemical structure of a polyglycoside derivative of a steroid. The steroid core is shown with various methyl groups (CH₃) and a ketone group (C=O). A polyglycoside chain is attached to the steroid via an ester linkage. The polyglycoside chain is represented as [Sorb]_n, where 'Sorb' is a sorbitol unit. The label 'Polygly' is placed to the left of the chain.

n es un número entero de 1 a 3,
Sorb representa un resto de sorbitol, y
Polygly representa un resto de glicerol o poliglicerol.

5. El éster de la reivindicación 1 que tiene la fórmula (Ia):



9. El uso de la composición cosmética de la reivindicación 6 para el tratamiento cosmético tópico de la piel,

particularmente la piel sensible.

10. Un proceso para preparar el éster de ácido gliciretínico que tiene la fórmula (I), que comprende las etapas de:

- 5 i) hacer reaccionar glicerol o poliglicerol con sorbitol para dar un éter; y
 ii) hacer reaccionar dicho éter con ácido gliciretínico para dar el éster que tiene la fórmula (I).

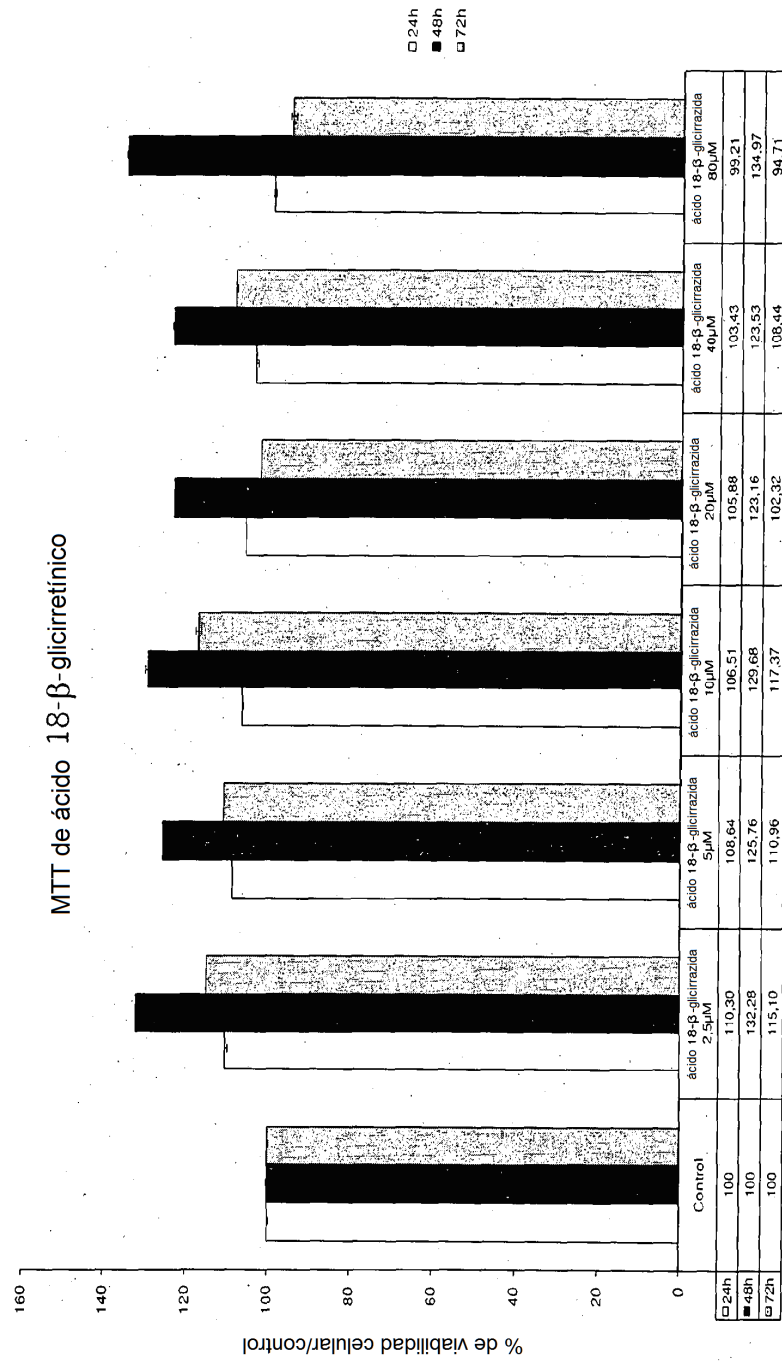


Figura 1

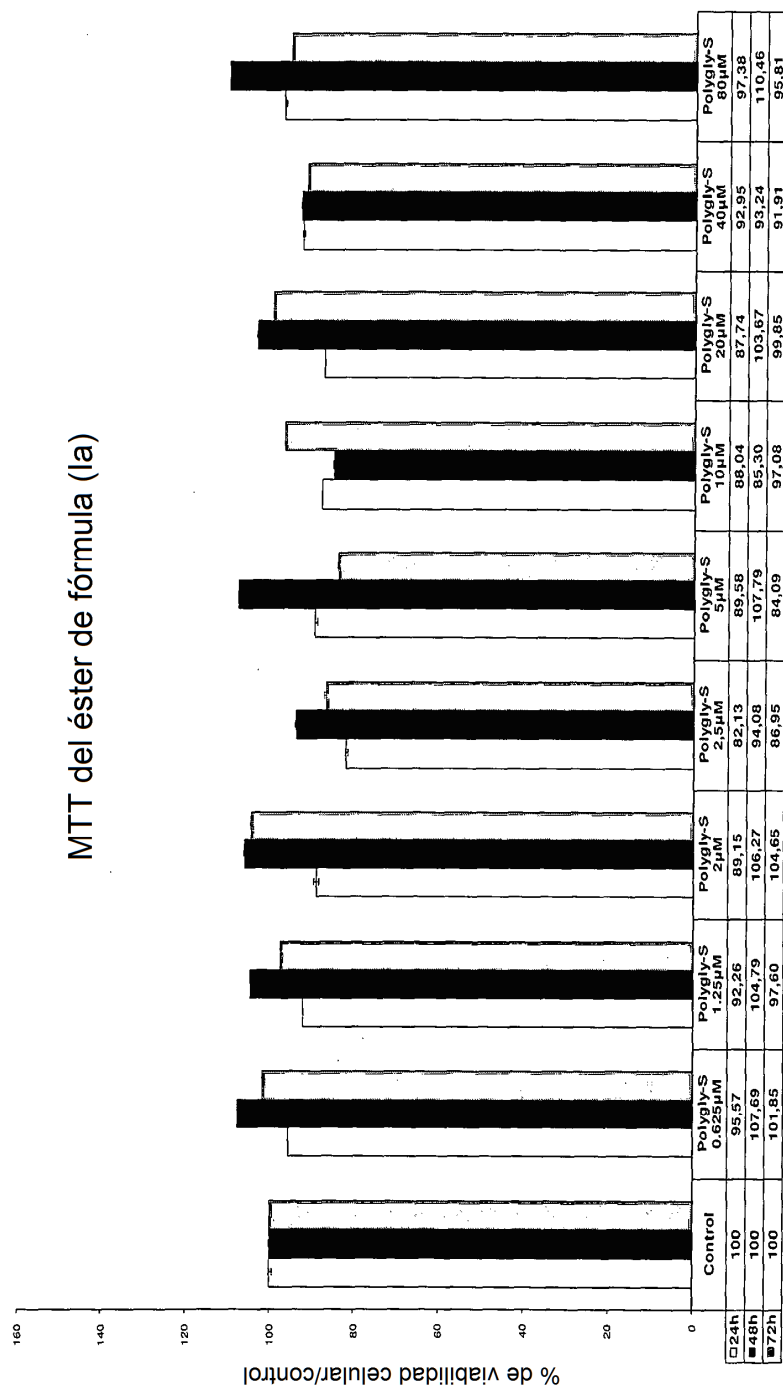


Figura 2

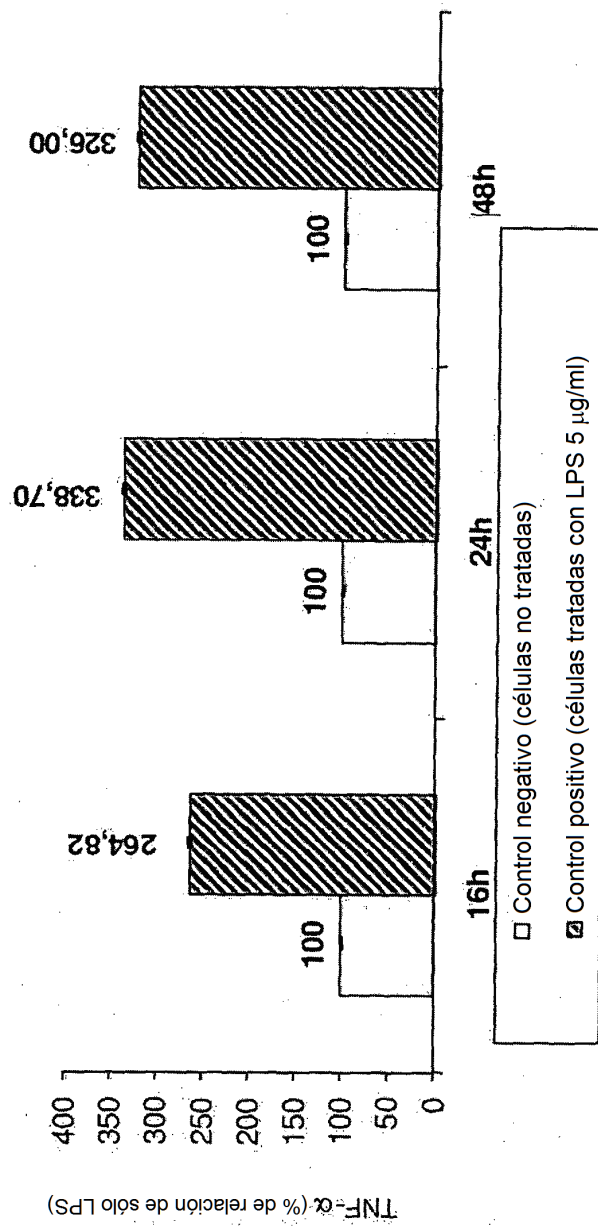


Figura 3

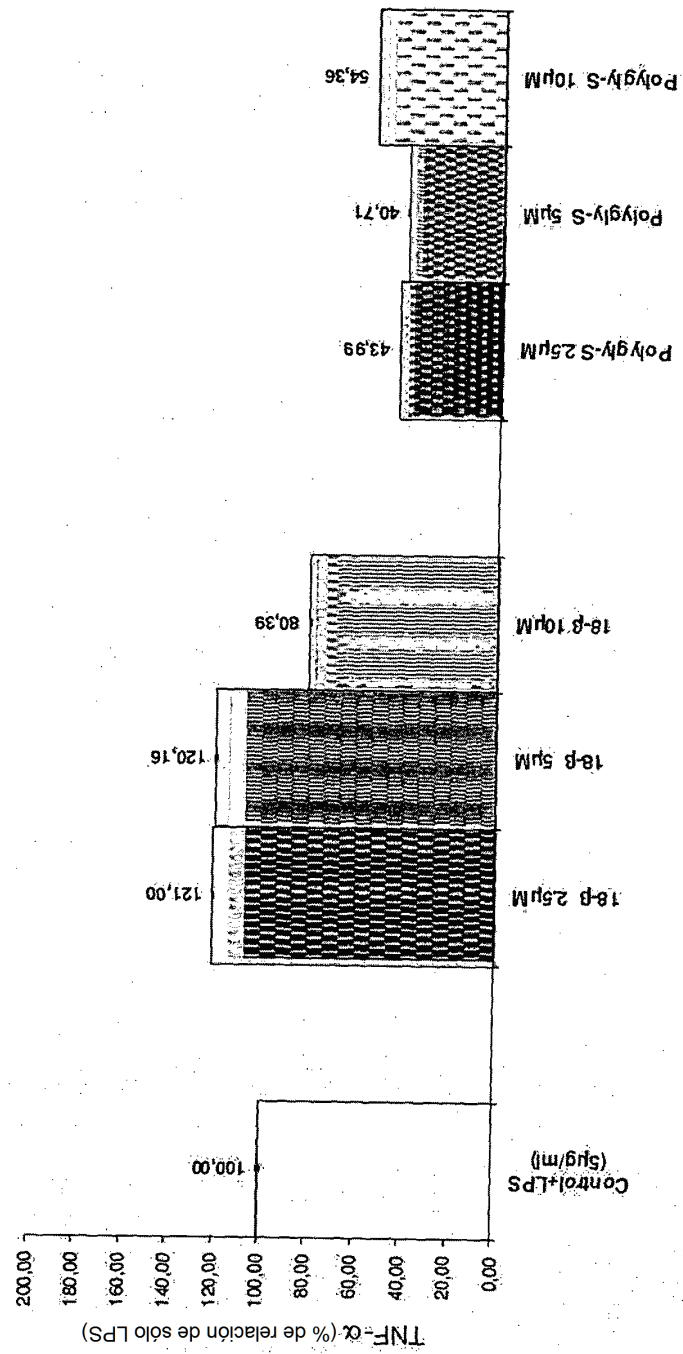


Figura 4

Figura 5

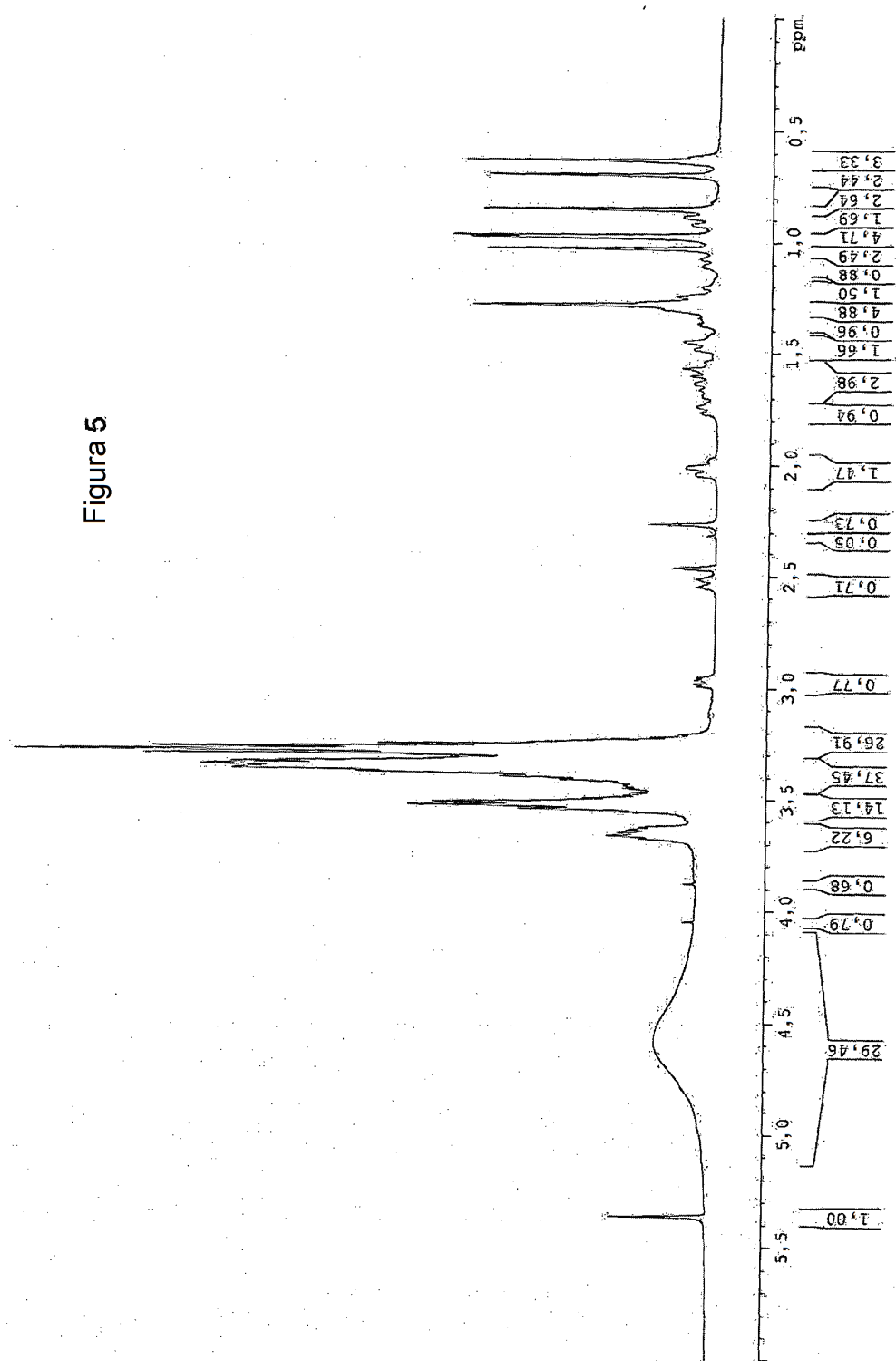


Figura 6

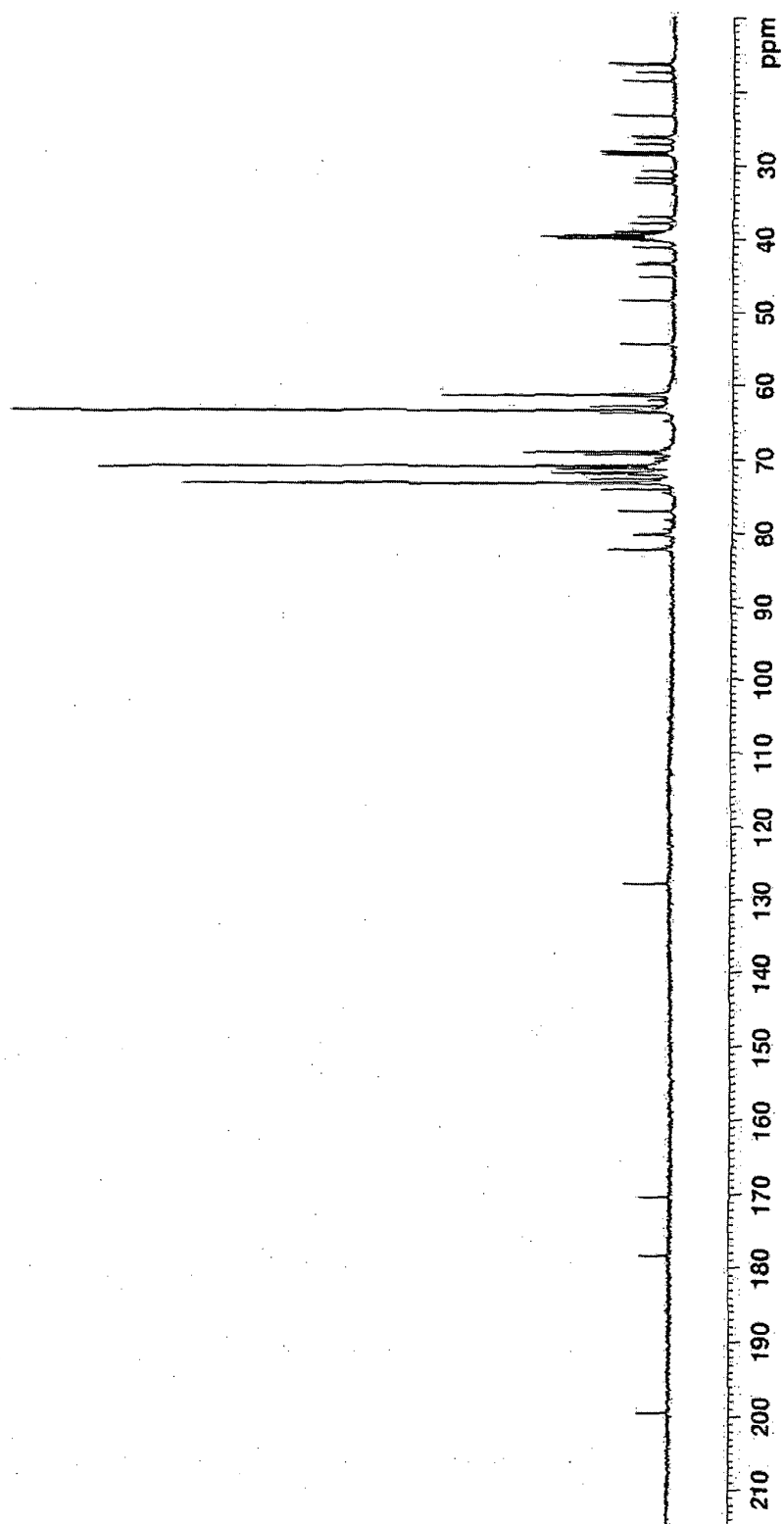


Figura 7

