

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 306**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/49** (2006.01)

**A61K 8/60** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12425137 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2695600**

54 Título: **Composiciones cosméticas dermales que tienen actividad osmoprotectora**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.07.2017**

73 Titular/es:

**UNIFARCO S.P.A. (100.0%)  
Via Cal Longa 62  
32035 Santa Giustina (BL), IT**

72 Inventor/es:

**BARATTO, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 624 306 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

Composiciones cosméticas dermales que tienen actividad osmoprotectora

### Campo de la invención.

La presente invención se refiere a composiciones cosméticas que tienen actividad osmoprotectora.

### 5 Estado de la técnica.

El choque osmótico o estrés osmótico es un cambio repentino en la concentración de solutos alrededor de una célula, que causa un cambio rápido en el movimiento del agua a lo largo de su membrana celular. Bajo condiciones de altas concentraciones de cualquiera de sales, substratos o cualquier soluto en el sobrenadante, el agua sale de las células por ósmosis. Esto también inhibe el transporte de substratos y cofactores al interior de la célula produciendo "choque" celular. Alternativamente, a bajas concentraciones de solutos, el agua entra en la célula en grandes cantidades, causando que se hinche y o bien que estalle o que sufra apoptosis.

15 Todos los organismos tienen mecanismos para responder al choque osmótico, con sensores y redes de señales de transducción que proporcionan información a la célula sobre la osmolaridad de sus alrededores, estas señales activan respuestas para tratar condiciones extremas. Aunque los organismos unicelulares son más vulnerables al choque osmótico, ya que están directamente expuestos a su medio ambiente, las células de animales superiores tales como mamíferos todavía sufren este estrés bajo algunas condiciones.

Los osmoprotectores son moléculas orgánicas muy solubles, eléctricamente neutras a pH fisiológico, que tienen la función de proteger la célula frente a estrés osmótico. Se han propuesto posibles mecanismos en las pasadas décadas, tales como los que implican una interacción directa del osmoprotector con la proteína y los que se basan en un efecto indirecto del osmoprotector. Recientemente las teorías más fiables incluyen que los osmoprotectores actúan con dos mecanismos diferentes el antiguo de estabilizar la proteína con un patrón indirecto, basado en el llamado formación de estructura de disolvente y el último basado en el llamado efecto osmófono.

En el primer mecanismo el osmoprotector estabiliza la estructura microscópica del disolvente, mediante la creación de una red de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Además los osmoprotectores son capaces de reducir la auto difusión del coeficiente de agua, afectando por tanto no solo las propiedades estructurales sino también las propiedades dinámicas del agua. El disolvente que afecta a los resultados es menos propenso a interactuar con los restos proteicos hidrófobos, que forman el núcleo central de la proteína, responsable de impartir estabilidad a la misma.

Por tanto la conformación del plegamiento de proteína resulta estabilizado indirectamente.

30 Además se observó que los osmoprotectores en disolución no tienden a congregarse alrededor de la proteína, más bien se excluyen de la superficie de la proteína. Esta característica es el llamado "efecto osmófono".

Gracias a las propiedades anteriores la presencia de estos osmoprotectores en formulación cosmética podría tener ventajas especialmente en el tratamiento de estrés de la piel tal como sequedad de la piel.

35 La patente FR 2.940.059 describe composiciones hidratantes de la piel que comprenden al menos dos agentes osmolíticos elegidos entre taurina, inositol, betaína y trehalosa.

El solicitante ha encontrado que algunos osmoprotectores, cuando se aplican no a células individuales, si no a un grupo de células más complejo, es decir, a un tejido como piel con estrés, son incapaces de mostrar las propiedades anteriormente mencionadas.

40 Dos compuestos de este tipo son por ejemplo ectoína y trehalosa, que, cuando se aplican solo a piel con estrés son incapaces de mostrar las propiedades anteriormente mencionadas.

La necesidad es por tanto encontrar sustancias, que también cuando se aplican a piel con estrés son capaces de protegerla frente a choque osmótico.

### Compendio de la invención.

45 El solicitante inesperadamente ha encontrado que ectoína y trehalosa, que como se señaló anteriormente cuando se aplican solo a piel con estrés son inactivos, cuando se aplican en asociación sobre un tejido celular, por ejemplo piel, son capaces de contrarrestar los efectos causados por choque osmótico.

La presente invención por tanto se refiere a composiciones cosméticas y en particular composiciones cosméticas dermales que comprenden como los ingredientes activos una asociación de ectoína y trehalosa, en cantidades totales en el intervalo de 0,5 a 2% en combinación con excipientes y/o diluyentes adecuados.

### 50 Descripción de las figuras.

La figura 1 presenta la expresión del gen AQP3 en piel no estresada pero tratada usando como calibradores los controles negativos a 16 y 48 horas (CN 16 h = 1, CN 48 h = 1) según se describe en la parte experimental.

La figura 2 presenta la expresión del gen AQP3 en los controles; en condiciones estándar se ha usado control como calibrador CN = 1.

5 La figura 3 presenta la expresión del gen AQP3 en controles de estrés positivo y muestras tratadas, en las que el control RHE (epidermis humana reconstruida) a 16 y 48 horas se ha usado como el calibrador CN = 1.

La figura 4 presenta la expresión del gen AQP3 en tejidos de suero y tratados estresados, donde se usa suero estresado como el calibrador CN = 1.

10 La figura 5 presenta la expresión del gen HSP1A1 en tejidos no estresados pero tratados; CN 16h y CN 48h se han usado como calibradores.

La figura 6 presenta la expresión del gen HSP1A1 en tejidos estresados y tratados, se ha usado suero estresado como calibrador.

La figura 7 presenta la expresión del gen HSP1A1 en tejidos de suero y tratados estresados, donde el suero estresado se ha usado como el calibrador CN = 1.

15 La figura 8 presenta los coeficientes preferenciales de ectoína 1M y trehalosa 1M.

La figura 9 presenta los coeficientes preferenciales de ectoína 1M y trehalosa 1M en mezcla.

La figura 10 presenta los coeficientes preferenciales de ectoína 2M y trehalosa 2M.

#### **Descripción detallada de la invención.**

20 La composición cosmética según la presente invención contiene ectoína y trehalosa en proporciones molares en el intervalo de 1:5 a 5:1, preferentemente de 1:4 a 4:1, incluso más preferentemente de 1:3 a 3:1, según una realización preferente particular estas proporciones molares están en el intervalo de 1:2 a 2:1.

En la composición cosmética las cantidades totales de ectoína y trehalosa están en el intervalo de 0,5 a 2%, más preferentemente de 1 a 1,5% en base al peso total de la composición.

25 La actividad osmoprotectora de la asociación de ectoína y trehalosa en las dosis bajas mencionadas anteriormente es bastante sorprendente, también teniendo en cuenta que el solicitante ha demostrado que llevando a cabo una simulación de modelo, presentado en la parte experimental de la presente descripción que la actividad osmoprotectora hacia la proteína C12 mostrada por la asociación de ectoína y trehalosa se observa sólo en presencia de disoluciones muy concentradas que contienen respectivamente ectoína 1M y trehalosa 1M, en otras palabras con una concentración total de ectoína y trehalosa 2M y que los mejores resultados se obtienen en la presencia de ectoína y trehalosa a concentraciones respectivamente de 0,75M y 1,5M y 1,5M pero también 1,5 y 0,75M que suman en ambos casos un total igual a 2,25M. Por lo tanto a concentraciones de al menos dos órdenes de magnitud más altos que la concentración más alta de estos osmoprotectores en la composición cosmética de la invención.

35 La composición cosmética de la invención puede comprender al menos un ingrediente activo más seleccionado de ceramida, en particular ceramida 3, colesterol, ácidos grasos en particular ácido esteárico, vitaminas en particular vitamina A y E, péptidos, preferentemente oligopéptidos, ácido hialurónico, lisocitinas, ácido lisofosfatídico, lisado de fermento y sus mezclas.

40 Las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden formular con excipientes convencionales usados en el campo cosmético tales como: agua, glicerina, triglicérido caprílico/cáprico, dimeticona, almidón octenilsuccinato de aluminio, glicol butileno, ésteres tribehenina PEG-20, aceite de semilla de macadamia ternifolia, dipentaeritritil hexacaprilato/hexacaprato, cetil alcohol, aceite olus, ciclopentasiloxano, dimeticonol, lecitina hidrogenda, metil glucosa sesquiestearato PEG-20, polisilicona-11, butilén glicol dicaprilato/dicaprato, caprilil meticono, almidón de tapioca, trietilhexanoil, trimetilsiloxifenil dimeticona, amonio acriloldimetiltaurato/beheneth 25 metacrilato copolímero, clorfenesina, EDTA disódico, goma xantana, isoparafina C13-14, cera candelilla, caprilil glicol, 45 clorfenesina, gliceril behenato, gliceril dibehenato, aceite vegetal hidrogenado, bis-etilhexil hidroxidimetoxi benzilmalonato, laureth 7, manitol, mica, perfume, fenoxietanol, dibutil adipato, dicaprilil carbonato, bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina, metileno bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, etilhexil salicilato, etilhexil triazona, butil metoxidibenzoilmetano, octocrileno, gliceril, cocoglicéridos, dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato, acrilatos C10-30 alquil acrilato copolímero, decil glucósido, poliacrilamida, sorbato potásico, dihidroacetato sódico, hidróxido sódico, fitato sódico, lactilato estearoil sódico, ácido esteárico, EDTA tetrasódico, tribehenina, amonio acriloldimetiltaurato/beheneth 25 metacrilato copolímero, trietoxicaprililsilano, ácido cítrico, alcohol, pigmentos basados en óxidos de hierro tales como CI 77491, CI 77891.

Estas composiciones cosméticas están en particular en la forma de emulsiones agua/aceite o aceite/agua, pomada en serum, cremas gel, leches corporales, leches solares y para después del sol, crema en gel solar y para después del sol y serum solar, etc.

5 Como se señaló anteriormente las composiciones cosméticas de la invención y al contrario de las que contienen respectivamente solo ectoína y trehalosa, muestran propiedades osmoprotectoras frente a estrés osmótico de la piel según se demuestra en las siguientes pruebas experimentales presentadas a continuación sólo con propósitos ilustrativos.

Ejemplo 1.

10 Se ha usado un modelo experimental de sequedad epidérmica, inducido mediante humedad ambiente y condiciones de temperatura modificados, para valorar la eficacia de 3 productos cosméticos caracterizados por las siguientes composiciones:

Disolución 1 agua + trehalosa 1%

Disolución 2 agua + ectoína 0,5%

Disolución 3 agua + ectoína 0,5% + trehalosa 1%.

15 1 Materiales.

1.1. Sistema de prueba.

Epidermis humana reconstituida.

20 SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis (RHE) de 0,5 cm<sup>2</sup> en una epidermis completamente diferenciada formada después de 17 días de cultivo aireado de NHK a partir de biopsias de piel en un medio definido químicamente. El modelo reproduce morfología epidérmica y se ha caracterizado completamente. Se ha descrito en la literatura la función buena de barrera, reproductividad de lote y baja variabilidad en términos de permeabilidad para moléculas de investigación comparado con modelos humanos ex vivo.

Nombre y lote	Epidermis humana reconstituida (RHE) 12 022A 0211	
Fabricante	SkinEthic (F)	
Histología el día 17 Número de capas de células (>4)	5/6	Aceptado
Viabilidad de células el día 17 (>0,7)	1,521 ± 0,083	Aceptado
Día de llegada	13.03.2012	
Día de finalización	19.03.2012	

1.1.1. Medio, estado del cultivo y preparación del cultivo.

25 El tejido y medio se fabrican conforme ISO 9001. Inmediatamente después de la llegada al laboratorio, el RHE se transfirió a una placa de 6 pocillos previamente llenada con medio de mantenimiento (1 ml/placa) a temperatura ambiente y se incubó a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, saturado de humedad. La prueba empezó el día después de la llegada.

1.2. Artículos de prueba: identificación y caracterización.

30 Las 3 disoluciones de agua anteriormente mencionadas se almacenaron y dosificaron en las siguientes condiciones de trabajo:

Nombre	Disolución 1	Disolución 2	Disolución 3
Código unívoco	Sol 1	Sol 2	Sol 3
Almacenamiento	2-8°C	2-8°C	2-8°C
Concentración de uso	Puro	Puro	Puro

Nombre	Disolución 1	Disolución 2	Disolución 3
Dosis	50 µL	50 µL	50 µL

### 1.3. Control negativo y producto de referencia.

El control negativo era la solución de suero (0,9% NaCl) que se caracteriza por su acción neutra sobre los tejidos.

## 2. Métodos.

### 5 2.1. Cuantificación LDH.

La membrana celular forma una barrera funcional alrededor de la célula, y el tráfico hacia fuera y hacia dentro de la célula está muy regulado por los transportadores, receptores y vías de secreción. Cuando las células están dañadas, se vuelven "permeables" y esto forma la base para el segundo tipo de ensayo. La integridad de la membrana se determina midiendo la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular. Esta enzima normalmente está presente en el citosol, y no se puede medir extracelularmente a menos que se haya dado daño celular. Se ha usado un kit disponible comercialmente (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche) para cuantificar la liberación de LDH en el medio de cultivo mediante un ensayo colorimétrico basado en la detección de sal de formazán ( $\lambda$  492 nm con referencia a 690 nm). El cultivo sobrenadante se recoge y se incuba con la mezcla de reacción que incluye el kit (20 min, T<sup>a</sup> ambiente, con oscuridad). Un incremento en la cantidad de células muertas o plasma con membrana dañada da como resultado un incremento de la actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo. Este incremento en la cantidad de actividad de la enzima en el sobrenadante está directamente correlacionado con la cantidad de formazán formada durante un periodo de tiempo definido por lo tanto, la cantidad de color formado en el ensayo es proporcional al número de células lisadas.

20 Previamente se ha determinado una curva estándar que usa diferentes concentraciones de LDH: 125 mU/ml; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 mU/ml.

### 2.2. PCR en tiempo real.

#### 2.2.1. Extracción de ARN, retrotranscripción de ADNc y PCR en tiempo real.

Para las tres etapas, se usaron reactivos instantáneos. El método ARNacuoso es un sistema de aislado de ARN rápido, sin fenol, basado en filtro usado para extraer el ARN total de las muestras celulares. Se usó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para sintetizar ADNc de ARN. Se usó el instrumento Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR con química PCR con base fluorescente, el ensayo TaqMan, para estudiar la expresión del gen de biomarcadores significativos. La expresión del gen es el proceso mediante el que la información heredable en un gen, tal como la secuencia de ADN, se hace en un producto de gen funcional, tal como proteína o ARN. La cuantificación relativa determina el cambio en la expresión de una secuencia de ácido nucleico en una muestra de prueba relacionada con la misma secuencia en una muestra de calibrador. Se usó beta actina como un gen de control endógeno para normalizar las cantidades introducidas.

35 Cada réplica se valoró por triplicado. En la mezcla 2X TaqMan Fast Universal PCR Master Mix se añadió ensayo de gen de expresión TaqMan y ADNc (25 ng) para un volumen total de 25 µl. Las etapas del estado térmico en el ABI PRISM 7500 Fast eran: 95°C 20 seg; 40 ciclos (95°C 3 seg +60°C 30 seg).

#### 35 2.2.2. Adquisición de datos y criterios de aceptación.

Se toman datos de fluorescencia del RT-PCR generados por el termociclo ABI PRISM 7500 Fast, mediante el software interno SDS 2.0.5. y el Raw Data (resultados de estudio RQ) se imprimen y se exportan a Excel. (Estos datos contenían la siguiente información: grupo biológico, objetivo, omitido, réplicas técnicas, RQ, RQ min, RQ máx). Debido a que cada ciclo en la reacción PCR corresponde a un incremento de 2 veces en el producto PCR, una diferencia de uno en el número del límite del ciclo representa una diferencia de 2 veces en la expresión de un gen particular comparado con la muestra de calibrador y se puede considerar significativa. Se usa 95% de nivel de confianza por el software para calcular los errores.

## 3. Análisis estadístico.

No se llevó a cabo análisis estadístico específico excepto el cálculo de la desviación estándar.

## 45 4. Resultados.

### 4.1. Cuantificación de LDH.

El resultado de la liberación de LDH, expresado como % de citotoxicidad se presenta en la tabla I.

Tab. I. Liberación de LDH expresada como % de citotoxicidad.

Tabla I	% viabilidad
Control 16 h	91,55
RHE estresado 30 min + 16 h	0
Estresado + suero 30 min + 16 h	52,06
Gli 5% 30 min + 16 h	80,70
Sol 1 30 min + 16 h	76,82
Sol 2 30 min + 16 h	48,01
Sol 3 30 min + 16 h	53,15
Sol 1 estándar 30 min + 16 h	83,44
Sol 2 estándar 30 min + 16 h	92,34
Sol 3 estándar 30 min + 16 h	99,95
Gli 5% estándar 30 min + 16 h	96,08
Control 48 h	79,08
RHE estresado 30 min + 48 h	80,23
Estresado + suero 30 min + 48 h	69,27
Gli 5% 30 min + 48 h	61,11
Sol 1 30 min + 48 h	56,18
Sol 2 30 min + 48 h	62,63
Sol 3 30 min + 48 h	34,56
Sol 1 estándar 30 min + 48 h	71,46
Sol 2 estándar 30 min + 48 h	93,26
Sol 3 estándar 30 min + 48 h	90,33
Gli 5% estándar 30 min + 48 h	63,14

5 Cuanto más alto se ha cuantificado la densidad óptica en el medio de RHE estresado y usado como 100% más alto es el valor de citotoxicidad. La densidad óptica del control negativo se ha considerado como un valor más bajo del control.

En el medio de tejidos control (16h-48h) no se ha cuantificado ninguna citotoxicidad (91,55% y 79% viabilidad respectivamente).

Se encontró RHE estresado como la muestra estresada de control alto después de 16h de recuperación (100% citotoxicidad) pero recuperó la viabilidad después de 48h (80,23%).

10 RHE estresado tratado con disolución de suero mostró un comportamiento similar en corto tiempo y largo tiempo de recuperación (52,06 y 69,27%).

Todos los productos aplicados en condiciones estándar (sin estrés) y dejados durante 16h y 48h no eran citotóxicos.

Glicerina 5% resultó no ser citotóxico ni en condiciones estresadas después de 16h o 48h de recuperación ni en condiciones estándar.

El único pico significativo de citotoxicidad se encontró después de 48h de recuperación de tejidos tratados con Sol 3 (34,56% viabilidad).

Es importante señalar que se encontró una variabilidad alta entre las dos series biológicas de cada tratamiento (Apéndice II).

- 5 En el párrafo 6.1, LDH se expresó como el medio de duplicados, pero estos datos no se usaron para clasificar la eficacia de los productos.

10 TEER (resistencia eléctrica transepitelial) se ha medido sobre todos los tejidos recibidos, a nivel basal: después de 30' de inducción de estrés a -20°C el TEER cayó drásticamente desde 10.000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  a valores por debajo de 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  asociado a una modificación drástica de flujo paracelular. No se encontró diferencia en mediciones de TEER después de 16h y 48h de recuperación. Todos estos tejidos tenían un valor de alrededor de 10.000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  y estos datos se confirmaron en todo momento.

#### 4.2. Resultados de PCR en tiempo real.

En la figura 1 se analizó el gen AQP3 objetivo usando los controles negativos como las muestras de calibrador (CN 16h = 1 y CN 48h = 1).

- 15 Se ha aplicado Sol 1, Sol 2, Sol 3 y glicerina 5% sobre la superficie epidérmica de RHE estresado por frío durante tratamiento de 16h y 48h.

Glicerina 5% ha reducido significativamente la expresión de AQP3 después de tratamiento de 16h mientras que en el último tiempo de recuperación, 48 h, se ha inducido (aunque no significativamente) una sobreexpresión de AQP3 (RQ = 1,694) que se relaciona con la activación de canales de agua.

- 20 Las 3 disoluciones (Sol 1, Sol 2 y Sol 3) han reducido significativamente la expresión de AQP3 después de incubación durante 16h o 48h en condiciones estándar.

Estos resultados sugieren que en ausencia de estrés las 3 disoluciones han determinado un bloque de flujo de agua que da como resultado una vía conservadora fuerte de contenido de agua.

- 25 La figura 2 presenta la expresión del gen AQP3 en controles; se ha usado control en condiciones estándar como calibrador CN = 1.

Después de 30 minutos de inducción fría; el RHE estresado redujo la expresión del gen AQP3 (RQ = 0,697) (figura 2).

- 30 El estrés por frío llevado a cabo durante 30' de inducción a -20°C se corresponde con un bloque de flujo de agua: el tratamiento se ha hecho en este momento y siguió recuperación de 16h y 48h permitiendo monitorizar la dinámica de la respuesta genómica y estudiar el mecanismo de acción del producto: la figura 3 describe la respuesta fisiológica de RHE al tratamiento con disolución de suero y glicerol comparado con la respuesta fisiológica de RHE al mismo tratamiento con las disoluciones 1, 2, 3.

Después de recuperación de 16h y 48h, el RHE estresado incrementó los niveles del gen AQP3 (RQ = 6,090 y 12,635 respectivamente) como se esperaba se estableció un mecanismo de defensa para restaurar el flujo de agua.

- 35 Sol 1, aplicado después de 30' de inducción de estrés, indujo una sobreexpresión de AQP3 después de 48h de recuperación (RQ = 3,745).

Sol 3 incrementó cerca de los valores significativos la expresión de AQP3 después de la incubación de 48h de recuperación (RQ = 1,954).

Después de 48h de recuperación, tanto Sol 2 como glicerina 5% redujeron la expresión de AQP3.

- 40 Ya que la disolución de suero de RHE estresado resultó tener influencia sobre la expresión de AQP-3 (RQ = 2, regulación por incremento significativo) y también porque representaba el placebo en este diseño experimental que se aplicaba mejor que el simple RHE estresado, el estrés positivo se usó como el calibrador y se ajustó = 1 para una mejor definición de la eficacia de los productos (figura 4).

- 45 La Sol 1 y valores más altos de Sol 3 han inducido una sobreexpresión significativa de AQP3 después de 48 h de recuperación (RQ = 3,745) en comparación con el suero RHE estresado usado como calibrador. La Sol 2, igual que glicerol 5%, redujo la expresión de AQP3.

La alta desviación estándar refleja la diferencia en liberación LDH de las dos réplicas biológicas.

Es interesante interpretar los resultados no sólo en términos de expresión AQP3 sino también en términos de cinética de mecanismo del producto en el modelo de estrés frío:

- 5 • El glicerol de referencia era inactivo al restaurar el flujo de agua fisiológica e hidratación después del estrés, por tanto determina un mecanismo de humectación activo a nivel molecular, que confirma su principal mecanismo de acción como molécula higroscópica. El glicerol en RHE no estresado ha determinado una sobreexpresión de AQP3 en la recuperación a largo plazo (fig 1) que sugiere de nuevo una influencia directa sobre el agua intracelular.
  - 10 • Las 3 disoluciones actúan primero, al principio del tiempo de recuperación (16h) mediante una vía conservadora de flujo de agua donde la expresión del gen AQP-3 se ha bloqueado permitiendo a las células mantener el contenido de agua fisiológica según se ha observado cuando se aplicaron los activos en condiciones no estresadas: se ha confirmado la eficacia protectora observada del mecanismo espesante de clúster de agua.
  - 15 • La cinética de un mecanismo de hidratación activo a nivel molecular se muestra claramente mediante los resultados de 48h donde la sobreexpresión de AQP-3 finalmente determina la abertura del canal de agua y realza la entrada de agua y la eficacia humectante. Este mecanismo se ha confirmado para Sol 1 y 3 y no para Sol 2.
- 15 En la figura 5 se analizó el gen HSP1A1 objetivo usando el control negativo como muestras de calibrador (CN 16h = 1 y CN 48h = 1).
- De nuevo es interesante discutir no sólo los niveles de expresión si no también la dinámica de la repuesta genómica:
- Las 3 disoluciones (Sol 1, Sol 2 y Sol 3) y glicerina 5% redujeron significativamente la expresión de HSP1A1 después de incubar durante 16h en condiciones estándar.
- 20 En el último periodo de recuperación, tratamiento de 48h, se ha cuantificado una sobreexpresión de HSP 72 sólo para Sol 2 y glicerina 5%: Sol 1 y Sol 3 no modularon significativamente el gen cuando se aplicaron en RHE no estresado.
- En la figura 6 se analizó el gen HSP1A1 objetivo usando el control positivo estresado como muestras de calibrador (CN 16h = 1 y CN 48h = 1).
- 25 Después de 16 h y 48 h de recuperación en el RHE estresado los niveles del gen HSP 72 (RQ = 2,821 y 3,954 respectivamente) incrementaron.
- Ya que el tratamiento con disolución de suero resultó tener influencia sobre la expresión de HSP 72 (regulación por disminución) y también debido a que está mejor representado el placebo en este diseño experimental aplicado en comparación con RHE estresado, el estrés positivo se usó como calibrador y se ajustó a =1 para una mejor comprensión de la eficacia de Sol 1, 2 y 3 (fig 6).
- 30 Sol 1, Sol 2, Sol 3 y glicerina 5% redujeron la expresión de HSP 72 después de 16h de recuperación: según se observó para AQP3 donde se estableció una vía conservadora de agua y también se observó en este momento un mecanismo adaptativo para HSP 72.
- Después de 48h de recuperación, solo Sol 3 incrementó significativamente la expresión de HSP 72.
- 35 En la figura 7 se analizó el gen HSP1A1 objetivo usando la disolución de suero (CN 16h = 1 y CN 48h = 1).
- Se cuantificó una regulación por disminución de HSP 72 después de 16h de recuperación en RHEs tratados con Sol 1, Sol 2, Sol 3 y glicerina 5%, por el contrario se observó una cinética diferente para Sol 3 que en el último periodo de recuperación incrementó la expresión de HSP 72.
5. Discusión.
- 40 Para entender el mecanismo de acción sobre espesante de agua y protección de clúster del agua epidérmica comparado con sus componentes (ectoína y trehalosa) y con glicerol como producto higroscópico de referencia, se ha propuesto un modelo modificado de secado in vitro basado en un estrés corto pero intenso seguido de periodos precoces y tardíos de recuperación modelados para seguir la dinámica de la respuesta genómica conducida por la eficacia del activo.
- 45 Los 3 productos llamados Sol 1, Sol 2, Sol 3 también se han aplicado en condiciones estándar para extrapolar su influencia directa en condiciones no estresadas.
- El estrés osmótico se indujo por condiciones de frío (-20°C) durante 30 minutos: TEER se redujo intensamente y el daño a nivel de membrana se confirmó por la liberación de LDH.
- 50 El modelo de estrés por frío descrito fue seguido de una respuesta de defensa fisiológica (recuperación de 16h y 48h) permitiendo monitorizar la dinámica de la respuesta genómica (AQP3 y HSP1A1) y estudiar mecanismos del producto de acción.



Los principales resultados se resumen aquí:

Estrés por frío: RHE estresado durante 30 minutos a -20°C.

- Redujo expresión del gen AQP3 (RQ = 0,697) (fig 2)
- No se observó modulación de la expresión del gen HSP1A1 (figura 6)

5 Periodos de recuperación: respuesta de defensa fisiológica del tejido RHE estresado colocado en condiciones estándar durante recuperación de 16h y 48h

- Recuperación 16h: incrementó la expresión del gen AQP3 incrementó la expresión del gen HSP1A1
- Recuperación 48h: incrementó la expresión del gen AQP3 incrementó la expresión del gen HSP1A1

10 Suero RHE estresado, tratado con disolución de suero, colocado en condiciones estándar durante recuperación de 16h y 48h

- Recuperación 16h: incrementó la expresión del gen AQP3 (menos que con RHE solo), regulación por disminución de la expresión del gen HSP1A1
- Recuperación 48h: incrementó la expresión del gen AQP3 (menos que con RHE solo) sin modulación significativa de la expresión del gen HSP1A1.

15 Se usó RHE estresado y tratado con suero como control de calibrador de inducción de estrés por frío, debido a que representa mejor un tejido estresado en el que la disolución de suero tiene el papel de placebo para las 3 disoluciones.

Modelo racional de estrés por frío.

20 El estrés por frío induce a un atrapamiento de agua en los tejidos, que forma clústeres de agua inactiva, que se pueden modificar, activados por la eficacia del producto.

En base a los resultados del control negativo y positivo y placebo (RHEs tratados con suero) y para definir la actividad osmoprotectora, un producto aplicado después de la inducción de estrés por frío y dejado en condiciones estándar durante 16h y 48h, debería cumplir los siguientes requisitos:

- Incrementar la expresión del gen AQP3
- Regulación por aumento de la expresión del gen HSP 72 (efecto citoprotector y antiinflamatorio)

AQP-3.

Las AQPs son proteínas que facilitan el transporte de agua a través de las membranas celulares.

30 AQP-3 en particular tiene un papel en el transporte y distribución de agua epidérmica y glicerol y la regulación de diferenciación de queratinocito, ambos son procesos críticos para mantener la hidratación de la piel, función barrera y salud global de la piel.

La ausencia de AQP3 en piel de mamíferos da como resultado sequedad de la piel, reduce la hidratación del estrato córneo, reduce la elasticidad de la piel, y retrasa la recuperación de la barrera.

35 El equilibrio osmótico defectuoso que se daría en la epidermis y que explicaría la sequedad de la piel afecta mucho la expresión de los canales de agua AQP-3. El incremento del gen AQP-3 permite a las células mantener el contenido de agua fisiológica correspondiente a una eficacia protectora.

Sol 1, Sol 2 Sol 3 aplicados sobre la superficie epidérmica de RHE durante tratamiento de 16h y 48h redujo significativamente la expresión de AQP3 en condiciones estándar que sugiere un bloque de canales de agua y flujo de agua conservador.

40 Sol 1 y Sol 3, aplicados después de la inducción de estrés indujo una sobreexpresión de AQP3 después de 48h de recuperación mostrando una vía protectora conservadora de clúster de agua en la aplicación temprana y un efecto humectante en el periodo tardío de recuperación.

Sol 2, igual que glicerina 5%, no modularon significativamente la expresión de AQP3.

45 El mecanismo higroscópico del glicerol se ha confirmado indirectamente mediante estos resultados: moléculas higroscópicas no tienen un mecanismo activo sobre la hidratación epidérmica; en condiciones ambientales de estrés absorben agua de los tejidos dando como resultado un mecanismo de deshidratación.

La familia HSP70 humana consiste en al menos 12 miembros (Tavaria et al 1996):

- HSP70 (Hsc70 o HSP73) expresadas constitutivamente.
  - HSP70 (HSP70 o HSP72) inducibles por estrés con el papel fundamental de proteger las células frente al estrés celular.
- 5
- HSP70 (HSP75) mitocondrial.
  - HSP70 (Grp78) del retículo endoplásmico.

10 Las proteínas de choque térmico (HSP) originariamente se describieron por sus papeles como chaperonas inducidas mediante choque de temperatura así como varios otros tipos de estrés que incluye medioambiental (radiación UV, choque térmico, metales pesados y aminoácidos), patológico (bacteriano, infecciones parásitas o fiebre, inflamación, malignidad o autoinmunidad) o estreses fisiológicos (factores de crecimiento, diferenciación celular, estimulación hormonal o desarrollo de tejidos), esto indujo a un incremento marcado de síntesis de HSP intracelular (iHSP) conocido como la respuesta a estrés (Park HS et al 2002).

Recientemente se ha descrito un rol adicional a HSP como señales de daño producidas y liberadas cuando las células están bajo estrés y como activadores del sistema inmune.

15 La regulación por aumento de HSP70 intracelular (iHSP72) tiene un efecto citoprotector y además induce los mecanismos anti apoptóticos, modula la progresión del ciclo celular y tiene una acción antiinflamatoria.

Las 3 disoluciones (Sol 1, Sol 2 y Sol 3) y glicerina 5% reduce la expresión de HSP72 después de la incubación durante 16h en condiciones estándar como se esperó debido a que no hubo necesidad de proteger las células.

20 Sin embargo, Sol 2 y glicerina 5% incrementó significativamente la expresión de HSP72 después de tratamiento de 48h, mostrando un efecto citoprotector directo.

Sol 1, Sol 2, Sol 3 y glicerina 5% aplicados después de la inducción de estrés, redujo significativamente la expresión de HSP72 tanto después de 16h como de 48h de recuperación que ofrece una protección pobre a la célula.

Sol 3 incrementó significativamente la expresión de HSP1A1 después de incubación de 48h mostrando citoprotección y respuesta antiinflamatoria.

25 Los resultados presentados en la siguiente tabla resumen los resultados informados para cada disolución 1-3 de los experimentos llevados a cabo y descritos anteriormente.

Efecto osmoprotector: evaluación de eficacia.

Recuperación 16h/48h	AQP3 (RQ)	HSP72 (RQ)	“Eficacia osmótica”
Sol 1	0,311/2,281	0,174/0,349	No
Sol 2	0,382/0,434	0,356/0,488	No
Sol 3	0,573/10,968	0,337/4,550	Si
Glicerina 5%	0,437/0,409	0,139/0,437	No

30 Solo la Sol 3 tiene una eficacia de hidratación osmoprotectora duradera (48 h después del estrés) sobre el estrés frío epidérmico inducido y una vía conservativa temprana de clúster de agua.

El producto permite la liberación de agua a partir de agua en clúster durante el tejido estresado por frío (-20°C) gracias a la sobreexpresión de AQP3 y una vía conservativa citoprotectora de estructura de proteína en base a la sobreexpresión de HSP-72 en el momento de 48h.

Ejemplo 2. Prueba ciega aleatoria.

35 Informamos en la presente memoria de una prueba clínica llevada a cabo sobre 20 mujeres voluntarias caracterizadas por tener la piel de la cara seca y sensible, tratadas en una parte de la cara durante 3 semanas con un gel, definido como “gel activo” caracterizado por la siguiente composición:

Gel activo

Agua 96,400

Poliacrilato de sodio 1,500

Trehalosa 1,000

Ácido cítrico 0,400

Ectoína 0,500

5 Dehidroacetato de sodio 0,200

Y la otra parte de la cara con la composición definida:

Gel placebo

Agua 97,900

Poliacrilato de sodio 1,500

10 Ácido cítrico 0,400

Dehidroacetato de sodio 0,200

Durante un total de 3 semanas.

2.1. Objetivo de la prueba.

El propósito de la prueba es evaluar el efecto sobre el flujo de microcirculación cutáneo y la densidad cutánea.

15 2.2. Criterios de admisión y reclutamiento.

La prueba se llevó a cabo sobre 20 mujeres voluntarias que tenían la piel del rostro seca y sensible con una media de edad: 49,7 años. La selección se llevó a cabo según los siguientes criterios.

- Raza caucásica;
- Mujeres entre 30-60 años de edad con buena salud y que tiene la piel del rostro seca;
- 20 • Sujetos capaces de seguir las directrices de la prueba y presentarse en todos los controles durante la duración completa de la prueba.
- Sujetos que tienen la información del proceso completa y que firman un consentimiento escrito.
- Sujetos que aceptan no exponerse al sol o a lámparas de rayos UV durante la duración completa de la prueba.

25 Y criterios de exclusión:

- Mujeres embarazadas o dando lactancia
- Sujetos con episodios cutáneos previos de hipersensibilidad a productos cosméticos o que son sensibles a cualquier componente del producto a probar.
- 30 • Sujetos en proceso de tratamiento sistémico o tópico con cualquier medicamento que pueda interferir con los resultados de la prueba.
- Sujetos con patologías sistémicas o desarreglos cutáneos (tales como eczema, psoriasis, acné grave, color de piel no homogéneo, etc), que puede interferir con los resultados de la prueba o incrementar el riesgo para las voluntarias.
- Sujetos con tratamiento antiarrugas (tópico o sistémico);
- 35 • Sujetos bajo otras pruebas clínicas o que han participado en pruebas clínicas 30 días antes de la presente prueba.

2.3 Abandono.

Se consideran las siguientes razones de interrupción de la prueba:

- Libre elección del sujeto;
- 40 • Razones médicas no relacionadas con el tratamiento (comienzo de enfermedad, operaciones quirúrgicas)

- Razones médicas relacionadas con el tratamiento (reacciones irritantes o alérgicas)

#### 2.4 Restricciones.

Durante las pruebas a las voluntarias se les pide que usen para la limpieza diaria el detergente habitual.

- 5 Durante toda la duración de las pruebas a los sujetos no se les permite aplicarse diferentes productos sobre la zona sometida la prueba y deben evitar exposición a rayos UV en el mismo área.

#### 2.5. Instrumentos.

Se han usado los siguientes instrumentos para llevar a cabo la prueba:

Caudalímetro Periflux PF4001, Perimed.

Este instrumento mide la velocidad y el volumen del flujo capilar de la superficie hemática de la piel.

- 10 Escáner de ultrasonido Dermascan C®.

Este instrumento es un escáner ecógrafo de alta resolución con emisión de ultrasonidos HF (20 MHz, que permite estudiar la piel hasta 15 mm de profundidad con una resolución axial de 60  $\mu\text{m}$  y resolución lateral de 200  $\mu\text{m}$ ).

Este instrumento mide la densidad dérmica y sus principales componentes. La piel joven muestra una densidad más alta si se compara con la piel madura.

- 15 La eficacia de una densificación da como resultado un incremento significativo en la densidad de la piel, denotando una mejora en la estructura dérmica.

#### 2.6. Método.

Las mediciones de los instrumentos se llevaron a cabo dentro de una habitación con temperatura y humedad controladas ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ;  $50\pm 10\%$  h.r.).

- 20 Se pidió a las voluntarias que no limpiaran su rostro 3 horas antes de llevar a cabo las mediciones con los instrumentos, y no aplicar producto sobre el rostro 12 horas antes de llevar a cabo dichas mediciones.

Al inicio del ensayo las mediciones con los instrumentos se llevaron a cabo de flujo sanguíneo de microcirculación cutánea y densidad cutánea.

- 25 Se llevó a cabo un segundo grupo de mediciones con instrumentos 2 horas después de la aplicación del gel activo y el gel placebo (dosis  $2 \text{ mg/cm}^2$ ) en cada mitad del rostro de las voluntarias. El sitio de aplicación (derecha o izquierda) se hizo aleatoriamente entre las voluntarias.

Los productos (gel activo y gel placebo) de aquí en adelante se les da a las voluntarias que los aplican con las mismas modalidades operativas descritas anteriormente dos veces al día durante 3 semanas.

Al final del periodo de uso, las voluntarias se sometieron a las mediciones finales con los instrumentos.

- 30 Para cada serie de mediciones se calcularon los valores medios, la desviación estándar y la varianza.

Sobre la base de los resultados de las pruebas normales (test de Kolgomonov-Smirnov, test de Lilliefors y test de Shapiro-Wilk) los datos instrumentales (T0, T2h y T3 semanas) se compararon estadísticamente por medio del análisis de varianza y test de Bonferroni para datos dependientes.

Los datos se consideraron estadísticamente diferentes para un valor de probabilidad  $\leq 0,05$ .

- 35 Una voluntaria interrumpió la prueba por razones relacionadas con el producto debido a la apariencia de efectos secundarios tales como sequedad en la piel y descamación.

Por lo tanto los resultados se refieren a 19 voluntarias.

#### 2.6. Resultados.

##### 2.6.1. Flujo sanguíneo de microcirculación cutánea.

- 40 Los resultados de esta prueba se presentan en la siguiente tabla.

Tabla: media, desviación estándar, variación. % variación y pruebas estadísticas.

	T0 desviación estándar media	T2h desviación estándar media	T3sem desviación estándar media	Variación T2h-T0 (% variación) test de Bonferroni	Variación T3sem-T0 (%variación) test de Bonferroni
Gel activo	62,37 26,83	52,14 21,49	52,35 13,36	-10,23 (-16,4) p<0,05	-10,02 (-16,1%) p<0,05
Gel placebo	62,41 26,76	56,99 21,14	63,06 21,08	-5,42 (-8,7) p>0,05	+0,65 (+1) p>0,05

5 El tratamiento con gel activo dio como resultado una disminución estadísticamente significativa en los valores basales de flujo sanguíneo de microcirculación cutánea tanto después de 2 horas desde la aplicación como después de 3 semanas de tratamientos. No se observaron variaciones estadísticamente significativas siguiendo el tratamiento con placebo.

Además según resulta de la tabla aquí debajo presentada, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el gel activo y el gel placebo.

	Test de Bonferroni T2h-T0	Test de Bonferroni T3sem-T0
Gel activo vs gel placebo	p>0,05	p>0,05

### 2.6.2. Densidad/ecogenicidad cutánea.

10 Los resultados de esta prueba se presentan en la siguiente tabla.

Tabla: media, desviación estándar, variación. % variación y pruebas estadísticas.

	T0 desviación estándar media	T2h desviación estándar media	T3sem desviación estándar media	Variación T2h-T0 (% variación) test de Bonferroni	Variación T3sem-T0 (%variación) test de Bonferroni
Gel activo	22,74 4,72	22,95 5,40	27,24 3,46	+0,21 p>0,05	+4,50 p<0,05
Gel placebo	24,34 6,11	24,74 6,27	26,27 5,18	+0,40 p>0,05	+1,93 p>0,05

2 horas después de la aplicación de ambos productos no se observó variación significativa en los valores basales de densidad cutánea.

15 La aplicación repetida del gel activo indujo un incremento estadísticamente significativo de densidad cutánea para el gel activo, mientras que la variación para el gel placebo no fue estadísticamente significativa.

### 2.7. Conclusiones.

20 La aplicación del gel activo dio como resultado una reducción estadísticamente significativa del flujo sanguíneo de microcirculación cutánea basal hacia el parámetro de normalización tanto después de 2h como después de 3 semanas de tratamiento.

La actividad del gel activo además se confirmó mediante el hecho de que no se observó diferencia estadísticamente significativa con placebo.

Después de 3 semanas de aplicación el gel activo llevó a un incremento estadísticamente significativo en densidad cutánea, dando como resultado una acción de densificación del gel activo.

Ejemplo 3. Pruebas de simulación.

5 El solicitante también llevó a cabo simulación de dinámicas moleculares usando como modelo la proteína C12 en disolución de ectoína y/o trehalosa para estudiar la distribución de estos compuestos alrededor de la proteína y evaluar un posible efecto osmótico.

Método para llevar a cabo simulaciones dinámicas.

10 La estructura inicial de la proteína C12 se obtuvo mediante la base de datos PDB (CODE 1YPC). En todos los casos la proteína se insertó en una caja cúbica virtual de 80 Å de lado, se añadió la cantidad necesaria de osmoprotector para alcanzar la concentración deseada. Los osmoprotectores se insertan en posiciones casuales dentro de la celda de solvatación, por lo tanto el sistema se solvató con agua descrito mediante el modelo TIP4P. Después, estando la proteína cargada positivamente, la electroneutralidad del sistema se garantizó mediante la adición de dos aniones cloruro.

15 Las simulaciones se llevaron a cabo usando el software GROMACS 4.5.3. El sistema preparado según se ha descrito anteriormente se sometió a 10.000 etapas de optimización de geometría usando alternativamente los métodos de máxima pendiente (SD) y gradiente conjugado (CG), en particular 1 etapa SD para 10 etapas CG. El sistema después se equilibró para 100 etapas a volumen y temperatura constantes, seguido de otras 100 etapas a presión y temperatura constantes. Durante la fase de equilibrio los C $\alpha$  átomos de la proteína se fijaron a su posición inicial seguido de una fase productiva que duró 20 ns bajo presión y temperatura constantes, en la que se eliminaron los enlaces armónicos sobre C $\alpha$ .

25 La temperatura se mantuvo en el valor de referencia 36,85°C (310°K) recalculando la velocidad de las partículas que forman el sistema, mientras que se mantiene la presión en un valor medio de 1 bar emparejando el sistema por isotropía a un baño bórico usando el algoritmo de Berendsen. Las distancias de enlaces entre todos los átomos se mantuvieron en su valor de equilibrio usando algoritmo de LINKS, permitiendo por tanto usar una etapa de integración de 2 fs fs = femtosegundo. Todas las simulaciones se llevaron a cabo usando condiciones límite periódicas, las interacciones electrostáticas se determinaron por medio del método de malla de partícula de Ewald, mientras en lo que se refiere a las interacciones de Van der Waals, se aplicó un corte de 14Å.

Se usó el campo de fuerza AMBER03 para describir la proteína, mientras que se usó el campo de fuerza GAFF para describir osmoprotectores. Los análisis de simulación se llevaron a cabo con módulos GROMACS.

30 Para evaluar el efecto osmótico, se calcularon los coeficientes preferenciales de los compuestos individuales (ectoína y trehalosa) con respecto a la proteína. Un coeficiente preferencial positivo indica una reunión del compuesto (ectoína o trehalosa) con respecto a la disolución en bruto, un coeficiente negativo significa su enrarecimiento.

35 En la figura 8 se presentan los coeficientes preferenciales de ectoína en disolución 1M y trehalosa en disolución 1M, como una función de la distancia desde la superficie de la proteína. Es evidente si se excluye el suelo más bajo de 1 Å que para ambos compuestos que muestran los parámetros positivo anteriormente mencionados no se puede observar efecto osmótico a la concentración anteriormente mencionada ya que, tanto el coeficiente preferencial de ectoína como los de trehalosa son positivos e incrementan con la distancia desde la superficie de la proteína.

40 Como se presenta en la figura 9 una disolución de ectoína y trehalosa cada una a concentración 1M da los siguientes resultados: es osmófono hasta el suelo de 2,5-3,0 Å. Por el contrario ectoína y trehalosa por separado muestran efecto osmófono cuando tienen concentraciones 2M según se hace evidente en la figura 10 donde trehalosa resulta ser siempre osmófono, y ectoína resulta osmófono hasta 2,5 Å.

Por lo tanto es evidente que la característica osmófono está presente cuando la concentración total de ectoína y trehalosa bien solos o su concentración total, cuando están mezclados es = 2M.

45 Por el contrario el solicitante con la prueba experimental in vitro descrita anteriormente sorprendentemente encontró que la mezcla de trehalosa y ectoína es activa a concentración total que es al menos 2 magnitudes más bajas que la concentración más baja indicada anteriormente (2M), a la que según la simulación anteriormente descrita la asociación de estos osmoprotectores muestran efecto osmófono, mediante la aplicación de modelos de simulación.

50 A continuación se presentan con propósitos ilustrativos algunos ejemplos de la composición cosmética de la invención.

Serum 1.

ES 2 624 306 T3

Agua	54,358 ÷ 62,039
Glicerina	6,129 ÷ 6,995
Triglicérido caprílico/cáprico	3,680 ÷ 4,200
Dimeticona	3,680 ÷ 4,200
Almidón octenilsuccinato de aluminio	2,760 ÷ 3,150
Glicol butileno	2,760 ÷ 3,150
Esteres tribehenina PEG-20	2,760 ÷ 3,150
Aceite de semilla de macadamia ternifolia	1,840 ÷ 2,100
Dipentaeritritil hexacaprilato/hexacaprato	1,380 ÷ 1,575
Cetil alcohol	1,104 ÷ 1,260
Aceite olus	1,104 ÷ 1,260
Ciclopentasiloxano	0,920 ÷ 1,050
Dimeticonol	0,920 ÷ 1,050
Lecitina hidrogenda	0,920 ÷ 1,050
Metil glucosa sesquiestearato PEG-20	0,920 ÷ 1,050
Trehalosa	0,920 ÷ 1,050
Amonio acriloidimetiltaurato/beheneth 25 metacrilato copolímero	0,552 ÷ 0,630
Gliceril dibehenato	0,552 ÷ 0,630
Ectoína	0,465 ÷ 0,530
Bis-etilhexil hidroxidimetoxi benzilmalonato	0,460 ÷ 0,525
Caprilil glicol	0,460 ÷ 0,525
Fenoxietanol	0,382 ÷ 0,436
Poliacrilamida	0,331 ÷ 0,378
Tribehenina	0,331 ÷ 0,378
Fermento thermus termófilo	0,276 ÷ 0,315
Gliceril behenato	0,221 ÷ 0,252
Aceite vegetal hidrogenado	0,207 ÷ 0,236
Lactilato estearoil sódico	0,184 ÷ 0,210
Perfume	0,175 ÷ 0,200
Isoparafina C13-14	0,166 ÷ 0,189
Ceramida 3	0,119 ÷ 0,135
Lecitina	0,117 ÷ 0,133
Clorfenesina	0,092 ÷ 0,105

ES 2 624 306 T3

Dehidroacetato sódico	0,092 ÷ 0,105
Hialuronato sódico	0,092 ÷ 0,105
Fitato sódico	0,092 ÷ 0,105
EDTA tetrasódico	0,083 ÷ 0,095
Cera candelilla	0,069 ÷ 0,079
Mica	0,064 ÷ 0,074
Alcohol desnat.	0,046 ÷ 0,053
Ácido cítrico	0,046 ÷ 0,053
Laureth 7	0,041 ÷ 0,047
Colesterol	0,027 ÷ 0,030
Ácido esteárico	0,027 ÷ 0,030
CI 77491	0,021 ÷ 0,024
Ácido lisofosfátido	0,018 ÷ 0,021
Manitol	0,012 ÷ 0,014
Hidróxido sódico	0,009 ÷ 0,011
CI 77891	0,005 ÷ 0,005
Ciclotetrapéptido 24 aminociclohexano carboxilato	0,005 ÷ 0,005
Lisolecitina	0,003 ÷ 0,003
Sorbato potásico	0,003 ÷ 0,003
Trietoxi caprililsilano	0,002 ÷ 0,002

Emulsión 1.

Agua	54,358 ÷ 62,039
Glicerina	6,129 ÷ 6,995
Triglicérido caprílico/cáprico	3,680 ÷ 4,200
Dimeticona	3,680 ÷ 4,200
Almidón octenilsuccinato de aluminio	2,760 ÷ 3,150
Glicol butileno	2,760 ÷ 3,150
Esteres tribehenina PEG-20	2,760 ÷ 3,150
Aceite de semilla de macadamia ternifolia	1,840 ÷ 2,100
Dipentaeritritil hexacaprilato/hexacaprato	1,380 ÷ 1,575
Cetil alcohol	1,104 ÷ 1,260
Aceite olus	1,104 ÷ 1,260



ES 2 624 306 T3

Ciclopentasiloxano	0,920 ÷ 1,050
Dimeticonol	0,920 ÷ 1,050
Lecitina hidrogenda	0,920 ÷ 1,050
Metil glucosa sesquiestearato PEG-20	0,920 ÷ 1,050
Trehalosa	0,920 ÷ 1,050
Amonio acriloidimetiltaurato/beheneth 25 metacrilato copolímero	0,552 ÷ 0,630
Gliceril dibehenato	0,552 ÷ 0,630
Ectoína	0,465 ÷ 0,530
Bis-etilhexil hidroxidimetoxi benzilmalonato	0,460 ÷ 0,525
Caprilil glicol	0,460 ÷ 0,525
Fenoxietanol	0,382 ÷ 0,436
Poliacrilamida	0,331 ÷ 0,378
Tribehenina	0,331 ÷ 0,378
Fermento thermus termófilo	0,276 ÷ 0,315
Gliceril behenato	0,221 ÷ 0,252
Aceite vegetal hidrogenado	0,207 ÷ 0,236
Lactilato estearoil sódico	0,184 ÷ 0,210
Perfume	0,175 ÷ 0,200
Isoparafina C13-14	0,166 ÷ 0,189
Ceramida 3	0,119 ÷ 0,135
Lecitina	0,117 ÷ 0,133
Clorfenesina	0,092 ÷ 0,105
Dehidroacetato sódico	0,092 ÷ 0,105
Hialuronato sódico	0,092 ÷ 0,105
Fitato sódico	0,092 ÷ 0,105
EDTA tresetasódico	0,083 ÷ 0,095
Cera candelilla	0,069 ÷ 0,079
Mica	0,064 ÷ 0,074
Alcohol desnat.	0,046 ÷ 0,053
Ácido cítrico	0,046 ÷ 0,053
Laureth 7	0,041 ÷ 0,047
Colesterol	0,027 ÷ 0,030
Ácido esteárico	0,027 ÷ 0,030

ES 2 624 306 T3

CI 77491	0,021 ÷ 0,024
Ácido lisofosfátidico	0,018 ÷ 0,021

Emulsión 2.

Agua	64,119 ÷ 73,180
Glicerina	7,044 ÷ 8,040
Triglicérido caprílico/cáprico	2,760 ÷ 3,150
Dimeticona	2,760 ÷ 3,150
Aceite de semilla de macadamia ternifolia	1,840 ÷ 2,100
Gliceril estearato	0,920 ÷ 1,050
Licitina hidrogenada	0,920 ÷ 1,050
Estearato PEG-100	0,920 ÷ 1,050
Dicaprilato propanediol	0,920 ÷ 1,050
Almidón de tapioca	0,920 ÷ 1,050
Trehalosa	0,920 ÷ 1,150
Aceite olus	0,736 ÷ 0,840
Ciclopentasiloxano	0,690 ÷ 0,788
Dimeticonol	0,690 ÷ 0,788
Amonio acriloldimetiltaurato/beheneth 25 metacrilato copolímero	0,644 ÷ 0,735
Ectoína	0,465 ÷ 0,530
Manteca de butyrospermum parkii	0,460 ÷ 0,525
Caprilil glicol	0,460 ÷ 0,525
Hidroxidimetoxi benzil malonato	0,460 ÷ 0,525
Lactilato estearoil sódico	0,460 ÷ 0,525
Fenoxietanol	0,382 ÷ 0,436
Poliacrilamida	0,294 ÷ 0,336
Fermento thermus termófilo	0,276 ÷ 0,315
Gliceril dibehenato	0,230 ÷ 0,263
Perfume	0,175 ÷ 0,200
Isoparafina C13-14	0,147 ÷ 0,168
Aceite vegetal hidrogenado	0,138 ÷ 0,158
Tribehenina	0,138 ÷ 0,158
Lecitina	0,177 ÷ 0,133

ES 2 624 306 T3

Ceramida 3	0,105 ÷ 0,120
Clorfenesina	0,092 ÷ 0,105
EDTA disódico	0,092 ÷ 0,105
Gliceril behenato	0,092 ÷ 0,105
Dihidroacetato sódico	0,092 ÷ 0,105
Hialuronato sódico	0,092 ÷ 0,105
Fitato sódico	0,092 ÷ 0,105
Ácido cítrico	0,074 ÷ 0,084
Mica	0,052 ÷ 0,059
Alcohol desnat.	0,046 ÷ 0,053
Cera candelilla	0,046 ÷ 0,053
Laureth 7	0,037 ÷ 0,042
Ácido lisofosfatídico	0,018 ÷ 0,021
CI 77491	0,017 ÷ 0,019
Colesterol	0,013 ÷ 0,015
Ácido esteárico	0,013 ÷ 0,015
Manitol	0,006 ÷ 0,007
Ciclopéptido 5	0,005 ÷ 0,005
CI 77891	0,004 ÷ 0,004
Lisolecitina	0,003 ÷ 0,003
Sorbato potásico	0,003 ÷ 0,003

Emulsión solar.

Agua	56,408 ÷ 64,379
Butilen glicol dicaprilato/dicaprato	4,600 ÷ 5,250
Etilhexil salicilato	4,140 ÷ 4,725
Butil metoxi dibenzoil metano	3,680 ÷ 4,200
Etilhexil triazona	3,680 ÷ 4,200
Alquil benzoato C12-15	2,760 ÷ 3,150
Dibutil adipato	2,760 ÷ 3,150
Glicerina	2,746 ÷ 3,134
Bis-etilhexil oxifenol metoxifenil triazona	2,300 ÷ 2,625
Almidón octenilsuccinato de aluminio	1,840 ÷ 2,100

ES 2 624 306 T3

Acrioldimetil taurato amínico /VP copolímero	0,920 ÷ 1,050
Octocrileno	0,920 ÷ 1,050
Cetil fosfato potásico	0,920 ÷ 1,050
Triacontanil PVP	0,920 ÷ 1,050
Trehalosa	0,920 ÷ 1,050
Fenoxietanol	0,461 ÷ 0,526
Alantoína	0,460 ÷ 0,525
Caprilil glicol	0,460 ÷ 0,525
Aceite olus	0,460 ÷ 0,525
Dipoli hidroxi estearato PEG-20	0,460 ÷ 0,525
Ectoína	0,465 ÷ 0,530
Tocoferil acetato	0,460 ÷ 0,525
Dehidroacetato sódico	0,184 ÷ 0,210
Bisabolol	0,092 ÷ 0,105
EDTA disódico	0,092 ÷ 0,105
Propilén glicol	0,056 ÷ 0,064
Ácido cítrico	0,046 ÷ 0,053
Carboximetil betaglucano sódico	0,046 ÷ 0,053
Zumo de hoja de aloe barbadensis	0,041 ÷ 0,047
Hialuronato sódico	0,018 ÷ 0,021
Perfume	0,018 ÷ 0,021
BHA	0,009 ÷ 0,011
Extracto de caléndula officinalis	0,009 ÷ 0,011
Sorbitol	0,009 ÷ 0,011
Tocoferol	0,009 ÷ 0,010
Trietil citrato	0,009 ÷ 0,010
Maltodextrina	0,005 ÷ 0,005

Bibliografía.

Lang KS, Lang PA, Bauer C et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death". Cell. Physiol. Biochem. 15 (5): 195-202.

- 5 Kültz D, Burg M (1 November 1998). "Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades". J. Exp. Biol. 201 (Pt 22): 3015-21.

Kültz D (2007). "Osmotic stress sensing and signaling in animals". FEBS journal 274 (22): 5781-5781.

"Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response". J. Cell. Physiol. 206 (1): 9-15.

- Hélène Ollivier, Karine Pichavant-Rafini, Eneour Puill-Stephan, Patrick Calvès, Liliane Nonnotte and Guy Nonnotte (2006). "Effects of hypo-osmotic stress on ATP release in isolated turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes". *Biol. Cell* 98 (7): 427-437.
- 5 Olivero P, Stutz in A. (2004). "Calcium modulates osmosensitive taurine efflux in HeLa cells". *Neurochem Res.* 29 (1): 169-76.
- Lang F (October 2007). "Mechanisms and significance of cell volume regulation". *J Am Coll Nutr* 26 (5 Suppl): 613S-623S. Sussich F, S kopec C, Brady J, Cesàro A (August 2001). "Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal?". *Carbohydr. Res.* 334 (3): 165-76.
- 10 Crowe JH, Carpenter J F, Crowe LM (1998). "The role of vitrification in anhydrobiosis". *Annu. Rev. Physiol.* 60: 73-103.
- Hara-Chikuma M, Verkman AS. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2008 Sep; 128 (9): 2145-51.
- Boury-Jamot M, Daraspe J, Bonté F, Perrier E, Schnebert S, Dumas M, Verbavatz JM. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis.
- 15 *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (190): 205-17.
- Sougrat R, Morand M, Gondran C, Barré P, Gobi n R, Bonté F, Dumas M, Verbavatz JM. Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis.
- J Invest Dermatol.* 2002 Apr; 118 (4): 678-85.
- 20 Hee-Sae Park et al. Heat Shock Protein Hsp72 Is a Negative Regulator of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2002 November; 22 (22): 7721-7730.
- Alexander Asea. Mechanism of HSP72 release. *J. Biosci.* 2007, 32 579-584.
- GE Pierard EEMCO GUIDANCE FOR THE MEASUREMENT OF SKIN MICROCIRCULATION" *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.*; 15 (6) : 442-456 (Nov. -Dec. 2002).
- 25 J. Sondergaard, J. Serup and G. Tikjob "ULTRASONIC AND B-SCANNING IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL DERMATOLOGY" *Acta Dermatovener (Stockh) Supp I.* 120 76-82.
- J. Serup "TEN YEARS' EXPERIENCE WITH HIGH FREQUENCY ULTRASOUND EXAMINATION OF THE SKIN: DEVELOPMENT AND REFINEMENT OF THE TECHNIQUE AND EQUIPMENT" *Ultrasound in dermatology* (1992) 41-54.
- Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic products COLI PA Guide lines, May 2008.
- 30 S. Seidenari "DIAGNOSTICA NON INVASIVA IN DERMATOLOGIA" ed. EDRA (1998).
- J. Serup, G.B.E Jemec: "HANDBOOK OF NON-INVASIVE METHODS AND THE SKIN" CRC Press. Inc., (1995).

**REIVINDICACIONES**

1. Composiciones cosméticas que comprenden como los ingredientes activos una asociación de ectoína y trehalosa en cantidades totales que están de 0,5 a 2% en base al peso total de la composición en combinación con excipientes y/o diluyentes adecuados.
- 5 2. La composición cosmética según la reivindicación 1 para aplicaciones dérmicas.
3. Las composiciones cosméticas según las reivindicaciones 1 o 2 que contienen ectoína y trehalosa en proporciones molares que van de 1:5 a 5:1.
4. Las composiciones cosméticas según la reivindicación 3 en las que dicha proporción molar va de 1:4 a 4:1.
5. Las composiciones cosméticas según la reivindicación 4 en las que dicha proporción molar va de 1:3 a 3:1.
- 10 6. Las composiciones cosméticas según la reivindicación 5 en las que dicha proporción molar va de 1:2 a 2:1.
7. Las composiciones cosméticas según la reivindicación 6, en las que dichas cantidades totales están de 1 a 1,5% en base al peso total de la composición.
8. Las composiciones cosméticas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 además comprende al menos un ingrediente activo seleccionado de ceramida, colesterol, ácidos grasos, vitaminas, péptidos, ácido hialurónico, lisolecitinas, ácido lisofosfatídico, fermentos lisados y sus mezclas.
- 15 9. Las composiciones cosméticas según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la forma de emulsiones agua/aceite o aceite/agua, pomada en serum, cremas gel, leches corporales, leches solares y para después del sol, crema en gel solar y para después del sol y serum solar.

Figura 1

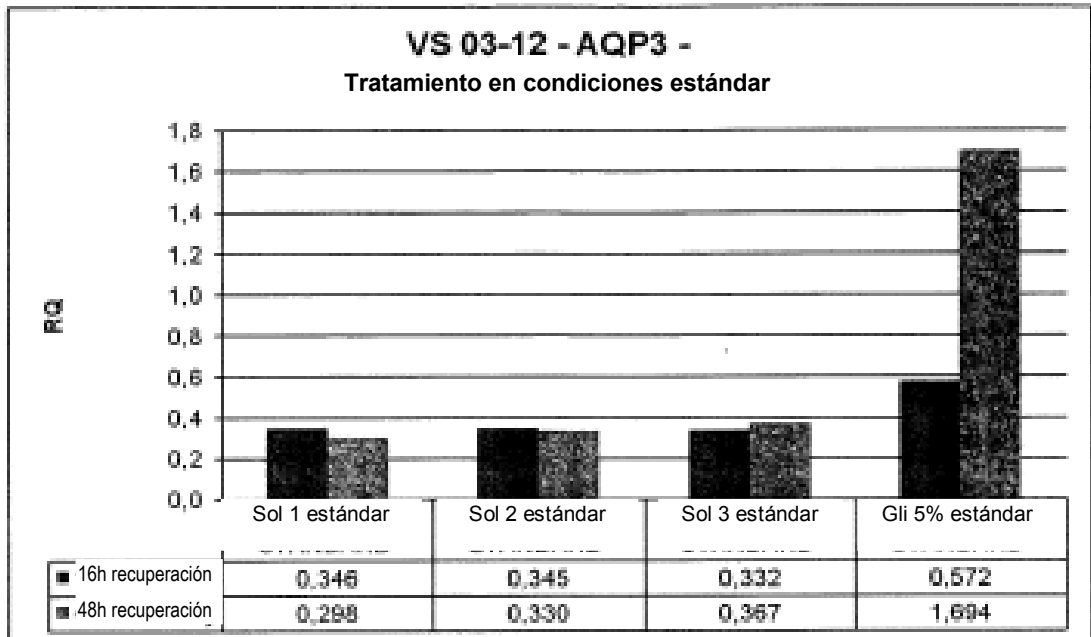


Figura 2

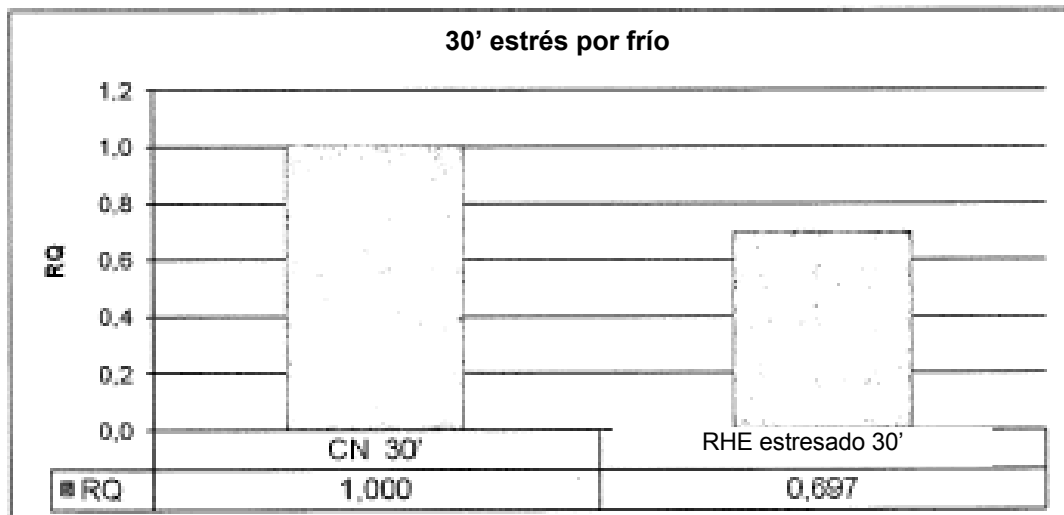


Figura 3

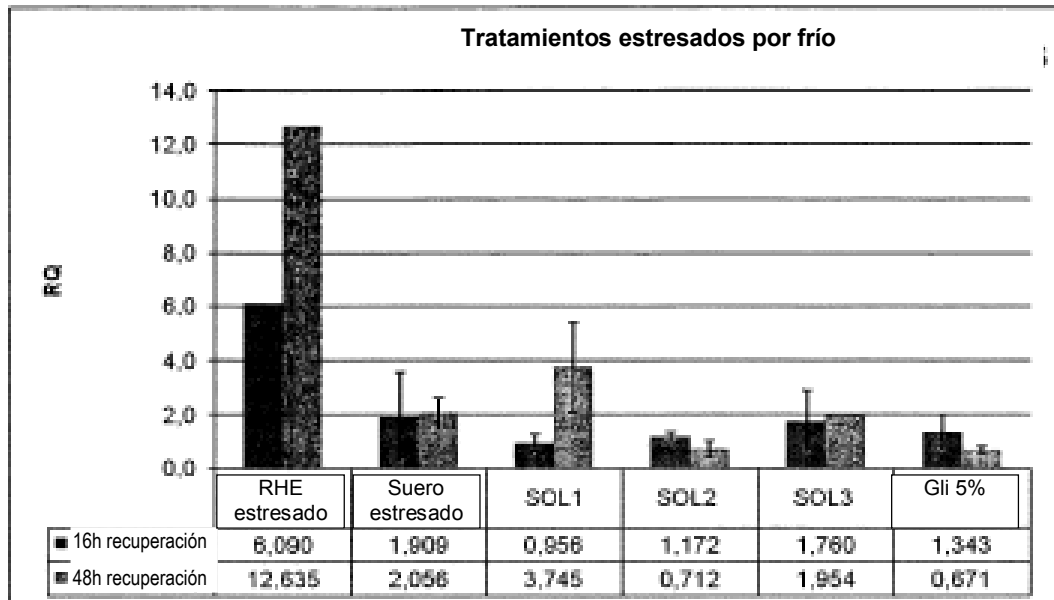


Figura 4

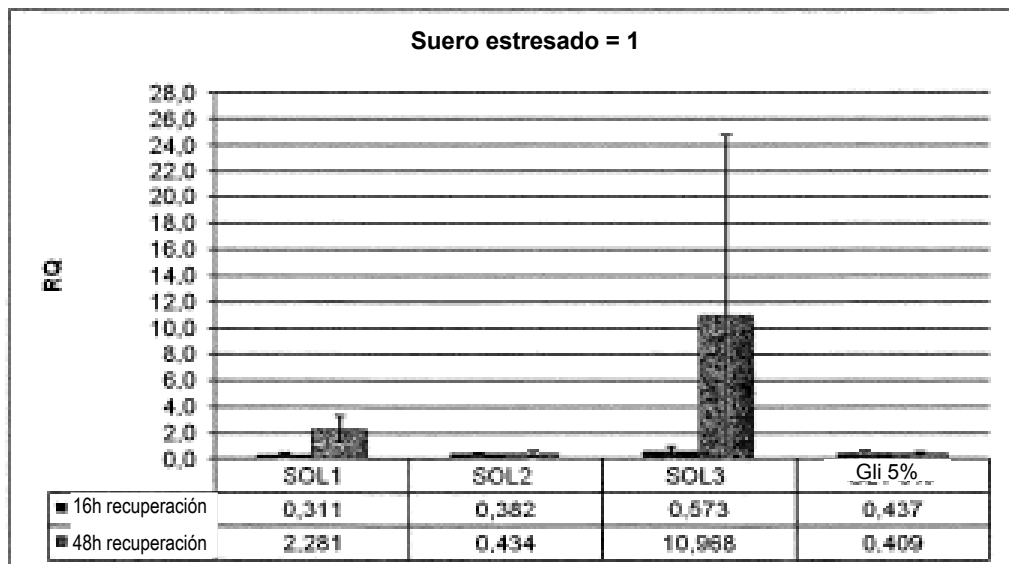




Figura 5

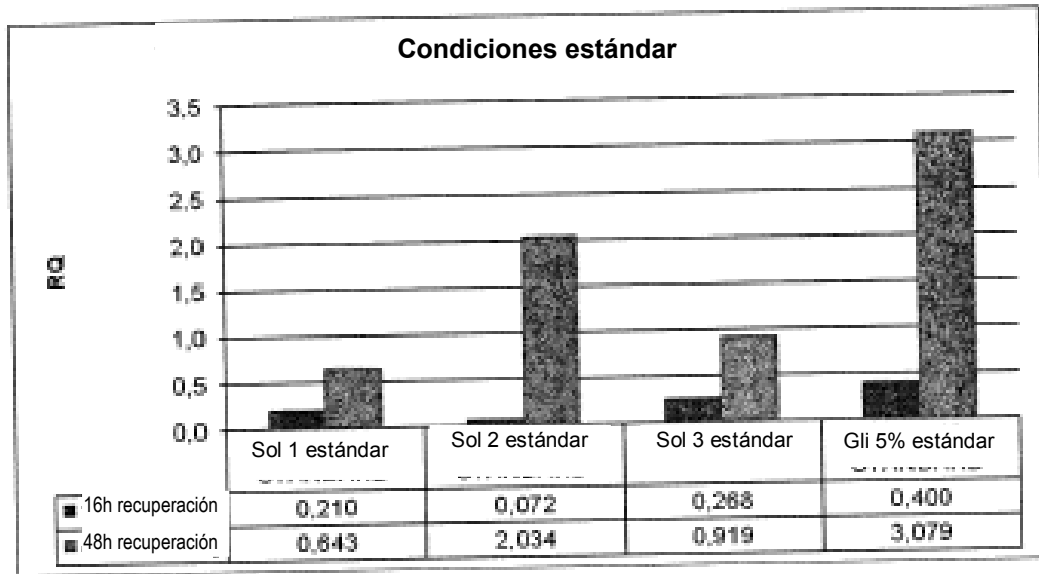


Figura 6

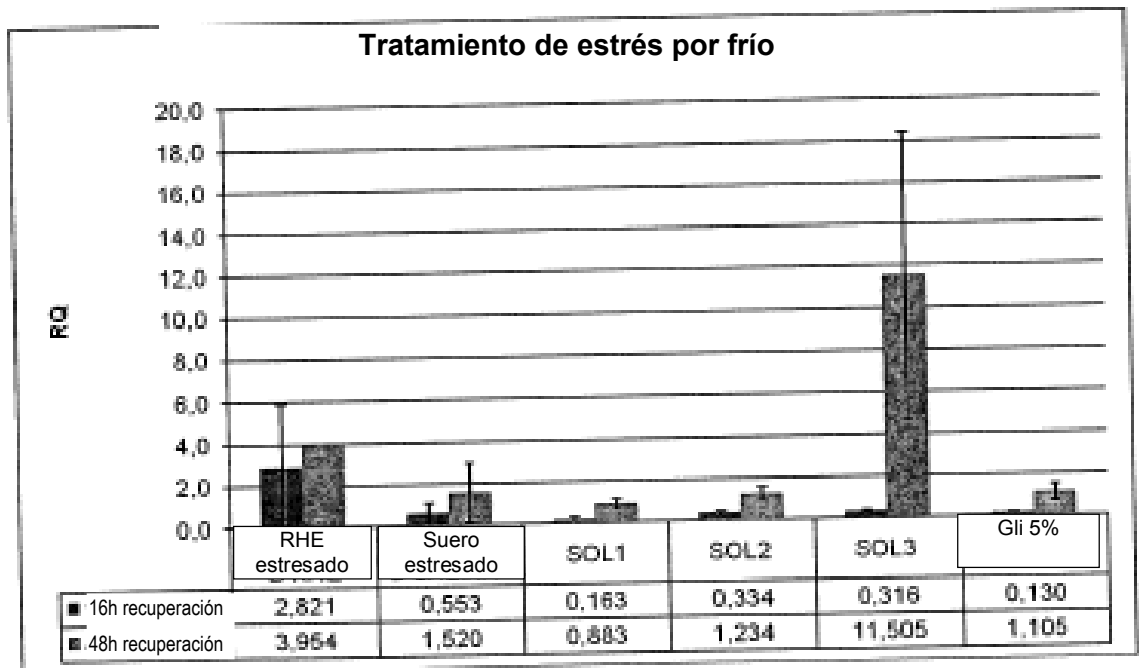


Figura 7

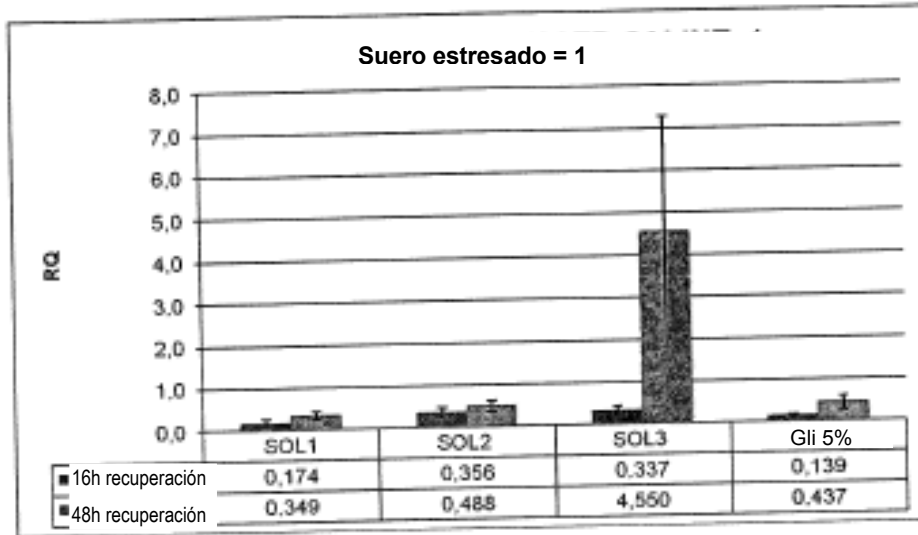


Figura 8

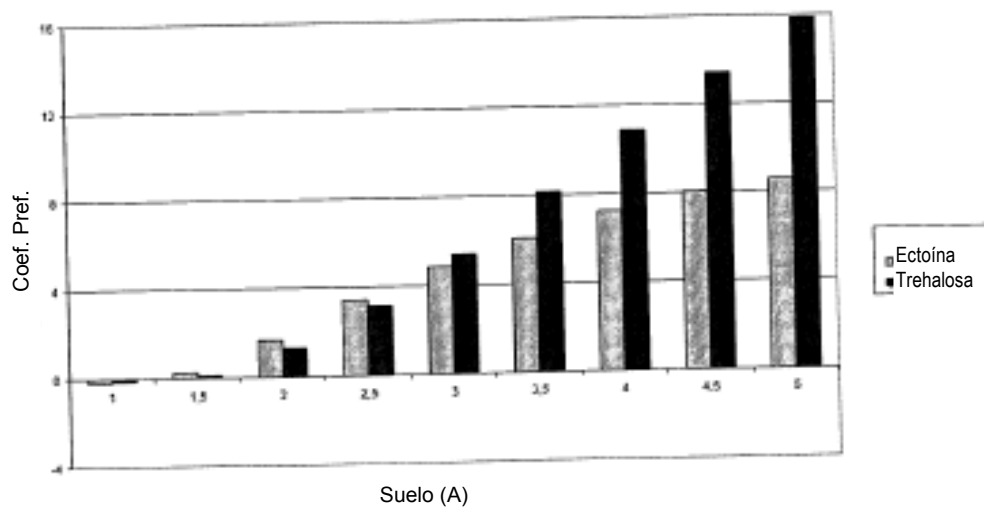


Figura 9

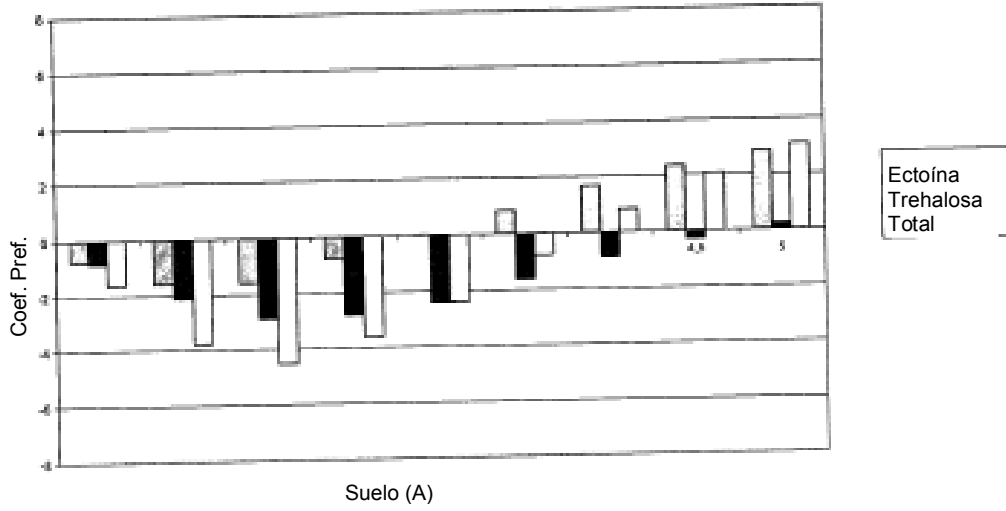


Figura 10

