

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 931**

51 Int. Cl.:

A61Q 17/00	(2006.01)
A61Q 17/04	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 8/00	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 8/25	(2006.01)
A61K 33/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2007 PCT/IS2007/000011**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2007 WO07129330**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2007 E 07736621 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2026880**

54 Título: **Uso farmacéutico y cosmético de la sílice**

30 Prioridad:

05.05.2006 IS 8442

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

07.11.2018

73 Titular/es:

**BLAA LONID HF. (100.0%)
Grindavikurbraut 9
240 Grindavik, IS**

72 Inventor/es:

**EINARSSON, SIGURBJORN;
BRYNJOLFSDOTTIR, ASA y
KRUTMANN, JEAN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 688 931 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso farmacéutico y cosmético de la sílice

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se halla en el campo de la cosmética y los ingredientes cosméticamente efectivos, y se refiere específicamente al uso de la sílice para el tratamiento cosmético y/o médico de la piel, incluyendo la mejora y potenciación de la barrera cutánea y el tratamiento antiedad.

10

ANTECEDENTES TÉCNICOS Y TÉCNICA ANTERIOR

[0002] Existe un creciente interés en productos de belleza de ingredientes naturales y en productos que previenen y mejoran los síntomas del envejecimiento, así como en productos que protegen la piel de varios factores de estrés ambiental. Se ha utilizado una multitud de componentes de varios orígenes en productos cosméticos, aunque la evidencia de los efectos beneficiosos de componentes aislados es, en algunos casos, limitada.

15

[0003] La sílice es ampliamente usada en cosmética como portador no activo, componente base o vehículo que suministra otros componentes a la piel. Específicamente, se ha descubierto que las partículas de sílice absorben el sudor y la grasa de la piel, lo que previene el reflejo de la luz por el sudor/la grasa y conserva el maquillaje más tiempo sobre la piel. El tipo de sílice de partículas esféricas mejora la suavidad y la aplicación de la base de maquillaje. La sílice ahumada se puede usar en formulaciones líquidas para proporcionar control reológico, suspensión mejorada y estabilidad de la viscosidad.

20

[0004] A modo de ejemplo reciente, la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2003/0114572 describe una composición de gel que otorga un tacto polvoroso y no graso a la piel. El polvo de sílice en esta composición funciona a modo de agente gelificante en la composición para formar una matriz de gel con un compuesto no volátil, por ejemplo, escualeno, parafina líquida, benzoatos de alcohol C12-C15 y similares.

25

[0005] WO 98/26788 sugiere el uso de la sílice, así como de otros compuestos inorgánicos (se mencionan óxido de zinc y óxido de titanio), como absorbentes de amplio espectro o reflectores de la radiación pero se menciona la desventaja de que con dichos compuestos la piel asume apariencia similar a la de una máscara, es decir, que estos compuestos y formulaciones están indicados para actuar más como una barrera externa adicional sobre la piel.

30

[0006] EP 1284277 describe partículas de óxido metálico que tienen un núcleo de óxido metálico y un recubrimiento de dióxido de silicio, que se pueden usar en agentes de protección solar. El revestimiento de dióxido de silicio está indicado para mejorar las propiedades de protección UV de los óxidos metálicos mediante la reducción de la actividad fotocatalítica de los óxidos metálicos. Por eso, esta referencia a la técnica anterior también va dirigida a una barrera externa en la piel.

35

40

[0007] US 2004151673 describe un dispensador presurizado que comprende un depósito que contiene una composición destinada a proteger la piel frente a la radiación UV, donde la composición comprende (a) un sistema fotoprotector capaz de bloquear la radiación UV (b) micropartículas generalmente esféricas de sílice porosa.

[0008] GB 2205239 también describe una invención que se refiere generalmente al bloqueo infrarrojo y, más particularmente, a una composición translúcida o transparente que, aplicada tópicamente sobre piel humana expuesta, bloquea la radiación infrarroja del sol y, por lo tanto, reduce sustancialmente los daños cutáneos resultantes de la exposición a radiación infrarroja no bloqueada, sin crear la apariencia grotesca causada por aquellos bloqueadores que contienen opacantes metálicos. Se describe una composición que contiene sílice ahumada mezclada con absorbentes ultravioletas (UV) pero no opacantes.

45

50

[0009] Pese a que no se conocen completamente los mecanismos detrás del envejecimiento de la piel, el mercado cosmético ofrece una enorme variedad de supuestos productos antiedad. La mayoría de los productos disponibles van dirigidos a los mecanismos para estimular la síntesis del colágeno y glucosaminoglucano por fibroblastos en la epidermis, reduciendo los niveles de radicales libres en la piel o aumentando la firmeza y la flexibilidad de la capa córnea.

55

[0010] La sílice es el término general empleado para el dióxido de silicio (SiO₂) que se encuentra en la naturaleza en varias formas y también se puede sintetizar mediante la precipitación de ácidos silíceos y mediante procesos basados en el lavado con ácido de minerales silíceos. La sílice es uno de los principales componentes del biovidrio, que es un vidrio de diseño especial que contiene óxidos de silicio, calcio y sodio. Una formulación común
 5 presenta proporciones del 45:25:25 % de estos componentes, siendo el resto óxido de fósforo. En agua caliente, como en el interior del cuerpo, el sodio en la superficie del biovidrio se disuelve. El material restante no es estable y se reorganiza en sílice (parte de él se disuelve) y diminutos cristales de hidroxiapatita. La capa de superficie porosa así obtenida es un sustrato favorable para la regeneración de tejido óseo. Además, muchos de estos materiales parecen simular la rotación osteoblástica y la formación ósea, como se debate en, por ejemplo, Gao et al. (Silica-based
 10 bioactive glasses modulates expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Sao-2 osteoblasts in vitro. Biomaterials 22: 1475-1483 (2001), Xynos et al. (Bioglass(R)45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering. Calcif. Tissue Int. 67: 321-329 (2000), Valerios P., (The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. Biomaterials 25:2941-2948(2004), and Knabe et al. (The effect of bioactive glass ceramics on the
 15 expression of bone-related genes and proteins in vitro. Clin. Oral Impl. Res. 16:119-127 (2005), se informa de que un material de biovidrio testado específico con un 60 % de sílice (BG60S) también potencia la producción de colágeno en osteoblastos.

[0011] Sin embargo, no se apunta a la sílice como un agente activo que afecta directamente de por sí a
 20 los procesos fisiológicos en la piel que refuerzan la función de barrera natural de la piel, inducen la proliferación de queratinocitos, inducen la síntesis del colágeno y permite un efecto fotoprotector.

Potenciación de la barrera de la piel

[0012] La barrera de la piel, también denominada barrera de permeabilidad epidérmica, protege frente
 25 a infecciones y envenenamiento, previene la deshidratación y es esencial para la vida terrestre. La función de barrera la confiere la capa externa de la epidermis, la capa córnea, que consiste en células muertas llenas de queratina integradas en una matriz lípida. La capa córnea se forma a partir de los queratinocitos de la capa granulosa durante la diferenciación terminal de la epidermis adulta normal. Cuando los queratinocitos se diferencian terminalmente, se
 30 aplanan y los contenidos intracelulares se degradan. Los cuerpos laminares que contienen lípidos se fusionan con la membrana plasmática y dispersan sus contenidos extracelularmente. Se forma una envoltura cornificada insoluble dura mediante la incorporación secuencial de proteínas precursoras (por ejemplo, involucrina, loricrina y pequeñas proteínas ricas en prolina (SPR)), seguida de la unión covalente de lípidos extracelulares.

[0013] Los agentes que potencian y mejoran la función de barrera natural de la piel son útiles en
 35 productos cosméticos, por ejemplo para mejorar la retención de la humedad en la piel, reducir la formación de piel seca y, en general, para mantener la piel en un estado saludable y visualmente atractivo.

Efecto antiedad por inducción de la síntesis del colágeno

[0014] La investigación médica ha demostrado que la aparición de arrugas se debe a un desequilibrio
 40 en la inducción de la expresión MMP-1 provocada por el fotoenvejecimiento que no se puede compensar mediante una inducción concomitante de la síntesis del colágeno (Scharfetter et al., UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. Arch. Dermatol. Res. 283: 506-511, 1991). Este desequilibrio se agudiza
 45 aún más por el hecho de que la radiación resulta en una expresión reducida del Colágeno 1A1 y el Colágeno 1A2 (Südel et al., Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract. Photochem. Photobiol. 81: 581-587, 2005). El factor de transcripción AP1 se activa con la estimulación UVA y provoca la inducción de MMP-1 y la represión del Colágeno 1A1 y el Colágeno 1A2 (Chung et al., An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-
 50 beta. J. Biol. Chem. 271:3272-3278, 1996). Por eso, los agentes que estimulan la síntesis del colágeno y preferentemente también inhiben la regulación al alza fotoreducida de MMP serían muy beneficiosos en productos para el cuidado de la piel cosméticamente activos para proporcionar un efecto antiedad.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] Los presentes inventores han descubierto que la sílice se puede usar como un ingrediente
 55 cosméticamente y farmacéuticamente activo. Específicamente, como se describe en esta memoria y se respalda con datos experimentales, la sílice exhibe una actividad mensurable en términos de potenciación de la función de barrera

de la piel y antiedad mediante la potenciación de la formación de colágeno.

[0016] En un aspecto, la invención proporciona sílice para su uso en el tratamiento de condiciones cutáneas seleccionadas de entre daños provocados por corticosteroides, atrofia cutánea, debilidad estructural del tejido conjuntivo, curación de heridas, dermatitis atópica, eccemas, psoriasis y rosácea.

[0017] La invención proporciona en otro aspecto un método cosmético no terapéutico para potenciar la función de barrera natural de la piel y un método cosmético no terapéutico para inducir la formación de colágeno en la piel.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] Se han testado diferentes tipos de sílice para la bioactividad subyacente en la presente invención. El material de sílice preferido según la invención es lodo de sílice natural precipitada de fuentes salinas geotermales, como las piscinas geotermales de la Laguna Azul en Islandia ("Blue Lagoon", Svartsengi) con agua proveniente de reservas subterráneas llenas de agua marina geotermal muy caliente. Cuando el agua subterránea caliente llega a la superficie de la tierra, su temperatura y presión bajan, provocando la precipitación de la sílice y formando una sustancia similar a un lodo coloidal blanco con un alto contenido en sal, denominado "lodo de sílice" en esta memoria. La salinidad del agua marina geotermal indica que está compuesta de un 65 % de agua marina y un 35 % de agua dulce. El precipitado de sílice se recoge a aproximadamente 80 °C. El agua de la laguna presenta una temperatura media de aproximadamente 37 °C, con variaciones locales y estacionales en el intervalo de aproximadamente 30-45 °C, un pH de aproximadamente 7,5 y un contenido en sal del 2,5 % en peso.

[0019] De cara a su uso según la presente invención, el lodo de sílice tal como se ha descrito anteriormente puede purificarse convenientemente mediante la eliminación de partículas gruesas, aclarado y lavado. Las sales de tipo marino, (principalmente NaCl, KCl y CaCl₂) no serán eliminadas por completo del material, por lo que el material tendrá un contenido significativo en sal, lo que, por otro lado, no se considera perjudicial y, de hecho, se cree que es ventajoso. En determinados productos cosméticos las partículas gruesas pueden ser deseadas, no obstante, en cuyo caso las partículas más finas se pueden separar para obtener una mayor proporción de material grueso (aglomerados).

[0020] Aunque el material anteriormente descrito en concreto se considera particularmente ventajoso, los presentes inventores también han llevado a cabo experimentos comparativos en paralelo que indican claramente que los sorprendentes efectos bioactivos observados no se limitan a la sílice precipitada de fuentes geotermales salinas calientes.

[0021] Se ha testado sílice coloidal disponible en el mercado y, como bien se documenta en esta memoria, dicho material exhibe una actividad significativa en todos los ensayos de actividad realizados. Por consiguiente, la invención se refiere también al uso indicado de la sílice en cualquier otra forma cosméticamente adecuada de otras fuentes, y preferentemente fuentes más convencionales, por ejemplo, también se puede usar sílice de diatomeas, tierra de diatomeas refinada (kieselguhr), sílice coloidal en forma de material similar al lodo o de suspensión, sílice precipitada como aquella producida a partir de soluciones de silicato sódico y ácido y/o por disolución de minerales de silicatos, así como varias formas de ácidos silícicos para la invención, para su uso como solución (por ejemplo soluciones supersaturadas) o para precipitar la sílice.

45

[0022] Asimismo, el lodo de sílice geotermal precipitada se puede simular con otras formas de sílice mezclando las sales características en las cantidades apropiadas con la sílice de un modo adecuado.

Descripción de la sílice

50

[0023] La sílice que es adecuada para su uso según la invención tendrá generalmente propiedades materiales típicas de la sílice precipitada, como en lo referente a la distribución de los tamaños de partícula, el área superficial específica o la porosidad. Se deberá tener en cuenta que los parámetros pueden verse afectados por el tratamiento del material silíceo a fin de obtener sílice con las propiedades materiales deseadas en función de la aplicación y la formulación previstas. Por consiguiente, en realizaciones útiles, la sílice empleada en la invención tendrá un área superficial específica BET en el intervalo de aproximadamente 10-200 m²/g, como en el intervalo de aproximadamente 10-100 m²/g incluido el intervalo de 20-100 m²/g o el intervalo de 10-50 m²/g pero sin limitarse a dichos intervalos en

55

particular, siempre que el material exhiba las propiedades biológicas deseadas como se ejemplifica en esta memoria. El tamaño de partícula de la sílice para usar en la invención puede variar y el tamaño de partícula se puede ver afectado por el tratamiento del material silíceo, por ultrasonido por ejemplo, para romper los aglomerados en partículas más pequeñas. En consecuencia, la sílice usada como se describe en esta memoria puede presentar un tamaño de partícula con un valor de d50 (μm) en el intervalo de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 75 μm , como en el intervalo de 4-50 μm , por ejemplo en el intervalo de 4-25 μm o el intervalo de aproximadamente 10-50 μm . La distribución de los tamaños de partícula puede ser amplia o reducida, como con un valor de d90 en cualquier punto del intervalo de aproximadamente 10-350 μm , donde, dependiendo de las características de textura deseadas en el producto, la sílice se puede seleccionar y/o tratar para presentar un tamaño de partícula generalmente grueso o un tamaño de partícula generalmente fino.

Potenciación de la barrera de la piel

[0024] Como se ha descrito anteriormente, la capa externa de la epidermis, la capa córnea, se forma a partir de los queratinocitos de la capa granulosa durante la diferenciación terminal de la epidermis adulta normal y, como resultado, se forma una envoltura cornificada insoluble mediante la incorporación secuencial de proteínas precursoras entre las que se incluyen la involucrina, la loricrina y pequeñas proteínas ricas en prolina (SPR)), seguida de la unión covalente de lípidos extracelulares. Sorprendentemente se ha descubierto, como se describe en los Ejemplos de esta memoria, que la sílice puede potenciar la función de barrera natural de la piel, como claramente indican los datos experimentales en los que se demuestra que la sílice induce marcadores para la formación de barrera en queratinocitos humanos cultivados.

[0025] El lodo de sílice testado indujo significativamente la expresión de los marcadores de diferenciación involucrina, filagrina y transglutaminasa-1, especialmente en el punto temprano en el tiempo (adición posterior tras 24 h de la sustancia testada). La segunda muestra de sílice testada (metasilicato de sodio) mostró también una sustancial regulación al alza.

Inducción de la síntesis del colágeno

[0026] Se ha verificado el efecto de la sílice en la inducción de la expresión de Col1A1 y Col1A2 en fibroblastos dérmicos humanos usando RT-PCR a tiempo real. El lodo de sílice testado mostró un aumento en la expresión dependiente de la dosis de los genes de colágeno con una expresión duplicada máxima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se describe en mayor detalle en los Ejemplos más adelante.

[0027] La presente invención describe composiciones farmacéuticas y cosméticas para potenciar la función de barrera de la piel y el tratamiento antiedad mediante la inducción de la formación de nuevo colágeno. Las composiciones están preferentemente adecuadamente formuladas para su aplicación tópica, como se describe en mayor detalle en esta memoria.

[0028] En el presente contexto "aplicación tópica" se refiere a poner o esparcir directamente sobre la piel externa. El término "envejecimiento de la piel" se refiere al adelgazamiento y/o degradación general de la dermis. Esto incluye una reducción en la expresión de los genes de colágeno, una menor actividad fibroblástica y regeneración fibroblástica, así como la disminución de la barrera laminar, que se manifiesta en la incapacidad de la piel para retener la humedad. En consecuencia, el término "antiedad" se refiere a un efecto que contrarresta el envejecimiento de la piel, es decir, que actúa contra los efectos anteriores para conservar una piel suave y sana.

[0029] En una realización de la presente invención se proporciona el uso de la sílice para potenciar la función de barrera de la piel y/o el tratamiento antiedad mediante la inducción de la síntesis del colágeno, de la piel de un humano. Como se mencionaba anteriormente, la sílice útil para la invención se puede obtener ventajosamente de un entorno con agua caliente salina y se puede precipitar a partir de fuentes naturales de agua caliente salina. No obstante, la sílice adecuada también se puede obtener a partir de diatomeas y otras fuentes (sílice precipitada, ácido silícico y similares).

[0030] La sílice obtenida de un entorno geotermal salino como se describe en esta memoria u otra fuente adecuada se puede mezclar con un portador cosmético adecuado para formar una composición cosmética, que se pueda aplicar tópicamente a la piel. La composición cosmética se puede aplicar a la piel en cantidades biológicamente cosméticamente efectivas durante un periodo de tiempo suficiente para resultar en la reparación o remodelado de la dermis. Esta reparación o remodelado será típicamente aparente en forma de una mejora visible de la apariencia del exterior de la piel.

[0031] La cantidad de la composición cosmética, según la presente invención, que se debe aplicar a la piel y la duración o el número de aplicaciones se puede determinar fácilmente de forma individual utilizando la composición cosmética hasta obtener una mejora visible de la superficie exterior de la piel.

5

[0032] En el presente contexto el término "cosmético" o "composición cosmética," según la invención pretende incluir todos los tipos de productos que se aplican de cualquier manera directamente a la piel con el propósito de influir en la apariencia visual general de la piel. Las composiciones cosméticas descritas en esta memoria pueden comprender, además de un componente de sílice descrito en esta memoria, ingredientes naturales y portadores usados en productos cosméticos o farmacéuticos. Dichas composiciones pueden adoptar la forma de una crema espesa o no espesa, una suspensión lechosa o emulsión del tipo de agua en aceite o aceite en agua, una loción, un gel o gelatina, una solución coloidal acuosa o aceitosa, una pasta, un jabón, una espuma, una base anhidra incluido un polvo, una pomada, un comprimido semisoluble (para suspenderlo en un fluido, como agua) o una barra.

10

[0033] En el presente contexto, el término "crema" empleado en esta memoria pretende englobar todos los materiales cosméticos de tipo crema que incluyen, por ejemplo, cremas de manos, cremas limpiadoras, lociones lechosas, cremas frías, cremas desvanecedoras, cremas capilares, cremas de base de maquillaje, jabones de belleza, paquetes faciales y similares.

15

[0034] La cantidad de ingrediente activo contenido en las composiciones de la presente invención puede variar entre amplios límites, dependiendo de la formulación y la frecuencia de uso de dichas composiciones. Generalmente, dichas composiciones contienen entre el 0,05 % y el 99 % en peso de sílice. Sin embargo, la cantidad preferida de sílice activa está en el intervalo de aproximadamente 0,05-10 % en peso y más preferentemente en el intervalo de 0,05-5 % en peso, incluido el intervalo de aproximadamente 0,1-0,5 % en peso, como aproximadamente 0,10 % en peso, 0,15 % en peso, 0,20 % en peso o aproximadamente 0,25 % en peso. En algunos productos una concentración más alta puede resultar útil, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 0,25-5 % en peso, como en el intervalo de aproximadamente 0,25-2,5 % en peso, incluyendo aproximadamente 0,5 % en peso o 1,0 % en peso.

25

[0035] Las composiciones cosméticas usadas en el método según la invención pueden contener también vehículos convencionales o portadores, como disolventes, grasas, aceites y ceras minerales, ácidos grasos y derivados de los mismos, alcoholes y derivados de los mismos, glicoles y derivados de los mismos, glicerol y derivados del mismo, sorbitol y derivados del mismo, agentes tensoactivos de tipo aniónico, catiónico o no iónico, agentes emulsionantes, agentes conservantes, perfumes, etc.

30

[0036] La invención también se refiere a la sílice para el uso en el tratamiento terapéutico de enfermedades, desórdenes y condiciones que responden al efecto terapéutico descrito en esta memoria. Por consiguiente, estas composiciones farmacéuticas pueden usarse en el tratamiento de condiciones cutáneas como daño cutáneo debido a corticosteroides, atrofia cutánea, debilidad estructural del tejido conjuntivo, curación de heridas, dermatitis atópica, eccemas, psoriasis, rosácea y otras enfermedades de la piel.

35

[0037] El efecto cosmético antiedad (síntesis del colágeno) y para la potenciación de la función de barrera de la piel de la sílice se puede medir mediante la monitorización de varios biomarcadores como:

- inducción de involucrina, transglutaminasa-1, filagrina y loricrina en queratinocitos humanos.

45

[0038] La monitorización de los biomarcadores se puede monitorizar haciendo un seguimiento de la expresión genética de estos marcadores usando métodos como, entre otros, microarrays y RT-PCR. La monitorización de los biomarcadores se puede monitorizar aún más mediante la medición de los niveles de proteínas usando métodos como, entre otros, inmunoensayos incluidos los análisis ELISA, RIA, EIA y FACS, etc., o espectrometría de masas incluidos los métodos del microarray de proteínas y la inmunohistoquímica.

50

[0039] En otro aspecto, la invención proporciona un método para potenciar la función de barrera de la piel de la piel de un mamífero que comprende la aplicación en dicha piel de una composición cosmética con una cantidad de sílice potenciadora de la función de barrera de la piel. El método se expone como un método cosmético, es decir, un método para influir en la apariencia visual de la piel. La composición cosmética está adecuadamente seleccionada de entre cualquiera de los tipos convencionales de formulaciones cosméticas tópicas como las descritas anteriormente en esta memoria.

55

[0040] En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir un efecto de envejecimiento de la piel de un mamífero que comprende la aplicación en dicha piel de una composición cosmética con una cantidad efectiva de sílice para inducir el colágeno. Como se desprende de la descripción expuesta anteriormente, la cantidad efectiva de sílice para inducir la formación de colágeno en la piel se puede evaluar con métodos explicados en los ejemplos descritos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0041]

10 La FIG. 1 muestra los resultados del Ejemplo 2, ilustrando el efecto inductor del extracto de lodo de sílice precipitado en concentraciones variables sobre la expresión génica de queratinocitos epidérmicos humanos.

La FIG. 2 muestra los resultados del Ejemplo 2, ilustrando el efecto inductor del extracto de metasilicato de sodio en concentraciones variables sobre la expresión génica de queratinocitos epidérmicos humanos.

15

La FIG. 4 muestra los resultados del Ejemplo 3, con diferentes concentraciones de lodo de sílice y metasilicato de sodio sobre la expresión génica de la IL-6 inducida por la radiación UVA en fibroblastos.

La FIG. 5 muestra los resultados del Ejemplo 4, con diferentes concentraciones de lodo de sílice y metasilicato de sodio sobre la expresión génica del colágeno 1A1 y el colágeno 1A2 en fibroblastos.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Caracterización de la sílice usada en experimentos.

25

[0042] Muestra 1: lodo de sílice precipitada de la piscina geotermal de Svartsengi, secado sin lavar. Muestra 2: mismo material de origen, lavado con agua hasta lograr una conductancia inferior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Muestra 3: torta filtrada de sílice húmeda (mismo origen que las muestras 1 y 2).

30 **[0043]** *Área superficial específica y porosidad:* se midieron las isotermas de adsorción y desorción para nitrógeno a temperatura de nitrógeno líquido con Tristar 3000 de Micromeritics. El área superficial y la porosidad se calculan con software proporcionado con el instrumento. Las muestras se muelen y tamizan antes del análisis.

[0044] Distribución de los tamaños de partícula: el tamaño de partícula se determinó con Malvern 35 Mastersizer 2000. Las muestras se suspendieron en agua destilada y la concentración se ajustó al intervalo apropiado para el instrumento. En el análisis de los datos se asume que el índice de refracción para las partículas es de 1,45 y la adsorción de 0,1.

Resultados:

40

[0045]

Tabla 1: Características de la superficie

	Muestra 1	Muestra 2
Área superficial específica BET (m^2/g)	66,3	17,9
Área microporosa t-plot (m^2/g)	10,9	3,0
Volumen acumulativo de adsorción por BJH de poros entre 13 Å y 3000 Å de ancho (cm^3/g)	0,371	0,098
Adsorción por BJH de ancho de poro medio (Å)	230	225

45

Tabla 2: Distribución de los tamaños de partícula

	Muestra 3, sin pretratamiento	Muestra 3 Mezclada con agua en agitador mec. durante 10 min	Muestra 3 tras 2x1 min de tratamiento ultrasónico
d10 (µm)	10,0	5,7	0,84
D50 (µm)	37,3	18,9	3,97
D90 (µm)	155	42,1	10,6

[0046] Los valores de los parámetros d10, d50 y d90 indican que el 10 %, 50 % y 90 %, respectivamente, del volumen total de las partículas está formado por partículas con un diámetro inferior al valor dado.

5 **Ejemplo 2:** Inducción de la Diferenciación en Queratinocitos Epidérmicos Humanos por preparados de sílice.

[0047] Se evaluó el efecto del lodo de sílice y el metasilicato de sodio sobre los marcadores de diferenciación Involucrina, transglutaminasa-1, Filagrina y Loricrina en queratinocitos epidérmicos humanos.

10 Material y Métodos

[0048] El precipitado de lodo de sílice se obtuvo de una fuente natural (piscina geotermal de la Laguna Azul, Svartsengi, Islandia). El metasilicato de sodio se obtuvo del Prof. Dr. G. Lehmann, Bioquímica, Universidad de Regensburg. A modo de control, se usó una mezcla de ceramidas (10 µM) para inducir los marcadores de diferenciación.

[0049] Se cultivan queratinocitos epidérmicos humanos normales, NHEK, cultivados a largo plazo, preparados a partir de prepucio neonatal, en Keratinocyte SFM (Invitrogen, Heidelberg, Alemania) suplementado con extracto pituitario bovino (Invitrogen, Heidelberg, Alemania) y factor de crecimiento epidérmico recombinante (Invitrogen, Heidelberg, Alemania). Las células se propagan hasta el pase 2 o 3 a 37 °C y al 5 % de CO₂. A fin de inducir la diferenciación se siembran NHEK en placas de 6 pocillos y se dejan crecer hasta confluencia y se tratan con varias concentraciones de preparados de sílice.

[0050] El ARN total se aisló usando Kits RNeasy Total RNA (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ARN se determinó por medición fotométrica a 260/280 (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Se usó una alícuota de 100 ng de ARN para la síntesis de ADNc. Se usó el sistema de síntesis Superscript™III First-Strand para RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) para la etapa de transcripción inversa con hexámeros aleatorios. Se diseñó para cada gen una pareja de iniciadores específica con el software Primer Express™ 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) en base a la secuencia de ADNc publicada como se ha indicado. Se usaron las siguientes parejas de iniciadores:

Tabla 3: Genes y parejas de iniciadores usados para RT-PCR a tiempo real para la determinación de la expresión genética en el Ejemplo 1

Gen	Parejas de iniciadores	
ARNr 18S	5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3'	SEQ ID NO: 1
	5' -CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG' -3'	SEQ ID NO: 2
Transglutaminasa-1	5'-CCCCGCAATGAGATCTACA-3'	SEQ ID NO: 3
	5' -ATCCTCATGGTCCACGTACACA-3'	SEQ ID NO: 4
Involucrina	5'-CCCATCAGGAGCAAATGAAAC-3'	SEQ ID NO: 5
	5'-GCTCGACAGGCACCTTCTG-3'	SEQ ID NO: 6
Filagrina	5' -AAGGAATTCTGAAAAGGAATTC-3'	SEQ ID NO: 7
	5'-TTGTGGTCTATATCCAAGTGATCCAT-3'	SEQ ID NO: 8

Loricrina	5' -TCACATTGCCAGCATCTTCTCT-3'	SEQ ID NO: 9
	5'-GGCTGCTTTTTCTGATAAGACATCT-3'	SEQ ID NO: 10

5 **[0051]** Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un Opticon 1 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos) usando SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Cada muestra se analizó dos veces empleando el protocolo universal sobre 36 ciclos. En concreto, activación durante 10 minutos a 94 °C de polimerasa taq de arranque en caliente, desnaturalización durante 20 segundos a 95 °C, recocido durante 20 segundos a 55 °C, extensión durante 30 segundos a 72 °C. Se usó el método $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ para la comparación de la expresión relativa en células de control de PCR a tiempo real y células tratadas.

Resultados:

10

[0052] A modo de referencia positiva de la técnica se usó una mezcla de ceramidas que inducía los marcadores transglutaminasa-1, involucrina, filagrina y loricrina en una medida similar (no se muestra).

15 **[0053]** La FIG. 1 muestra el patrón de expresión de la transglutaminasa-1, involucrina, filagrina y loricrina, en respuesta a un lodo de sílice y metasilicato, que representan en todos los casos una mejora en la barrera de la piel. Una agregación rápida del citoesqueleto de queratina, que provoca el colapso de las células granulares en escamas anucleadas aplanadas, es una etapa clave en la formación de la capa de barrera más externa de la piel. Este citoesqueleto condensado presenta una unión cruzada con transglutaminasas durante la formación de la envoltura celular cornificada (EC). Las transglutaminasas se expresan y activan durante la diferenciación terminal de los
20 Queratinocitos. La forma limitada por membrana de la transglutaminasa-1 y forma enlaces ésteres entre residuos específicos de glutaminil de involucrina humana durante la formación de la enzima de la envoltura celular cornificada. La EC no solo evita la pérdida de agua, sino que también impide la entrada de alérgenos y agentes infecciosos. Durante la última etapa de su diferenciación terminal de los queratinocitos se forma una envoltura de unión cruzada. Esta envoltura está hecha de proteínas de membrana y citosólicas de unión cruzada por enlaces isopéptidos glutamili-
25 lisina. La involucrina, que es una proteína de queratinocito que aparece primero en el citoplasma y después desarrolla una unión cruzada a proteínas de membrana mediante transglutaminasa, es el componente más abundante es de la envoltura. La loricrina es otro de los componentes principales de la envoltura celular de unión cruzada de la epidermis de la piel, también conocida como la envoltura celular cornificada (EC). La filagrina es una proteína que se expresa en gránulos en la capa granulosa de la epidermis interfollicular está predominantemente compuesta de la proteína
30 profilagrina. Tras la diferenciación terminal de las células granulares, la profilagrina se escinde proteolíticamente en péptidos de filagrina. La filagrina agrega el citoesqueleto de la queratina y es por ello una proteína clave a la hora de facilitar la diferenciación epidérmica y de mantener la función de barrera.

35 **[0054]** La FIG. 1a-e muestra la expresión inducida de cada uno de los cuatro marcadores en respuesta al lodo de sílice. Las dos mayores concentraciones de lodo de sílice muestran un aumento pronunciado en la expresión de INV y TG-1. También se percibe un aumento en la expresión de FILA y LORI, pero a concentraciones menores. La FIG. 2 muestra el patrón de expresión de la transglutaminasa-1, involucrina, filagrina y loricrina, en respuesta al metasilicato de sodio. Se induce cada uno de los cuatro marcadores en respuesta al metasilicato, como se puede apreciar en la FIG. 2a-e, pero aquí la expresión de FILA es más fuerte que en el caso del lodo de sílice.

40

[0055] A modo de referencia del estado de la técnica se usó una mezcla de ceramidas que indujo los marcadores transglutaminasa-1, involucrina, filagrina y loricrina en una medida similar (no se muestra).

45 **[0056]** Los resultados muestran que la sílice tal como se ejemplifica con el lodo de sílice y el metasilicato de sodio no solo induce la diferenciación terminal de los queratinocitos, sino que induce la expresión de los genes más importantes para la potenciación de la barrera de la piel.

Ejemplo 3: Efecto inhibitor del fotoenvejecimiento de la sílice

50 **[0057]** La capacidad fotoprotectora de la sílice se testó en fibroblastos dérmicos humanos irradiados con rayos UVA. La inducción de MMP-1 es un marcador del envejecimiento de la piel. Ya se ha demostrado anteriormente que la regulación al alza de la citocina IL-6 inducida por la radiación UVA es un prerrequisito para la inducción de MMP-1 inducida por la radiación UVA.

55 **[0058]** Los fibroblastos dérmicos humanos, HDF, preparados a partir de prepucio neonatal se cultivan

en DMEM suplementado con un 10 % de FBS en un 5 % de CO₂ durante 4 días hasta que alcanzan la confluencia como se describe en (Vielhaber *et al.*, 2006). En todos los estudios solo se emplearán fibroblastos de pase temprano (<12) para evitar cambios en su fenotipo original durante el subcultivo.

- 5 **[0059]** Los fibroblastos se incuban con diferentes cantidades de sílice coloidal y se someten a luz UV. En resumen, el medio para la radiación UVA se sustituyó por tampón fosfato salino, se eliminaron las cubiertas y se expuso a las células a una dosis de 30 J/cm² UVA1 usando un sistema UVASUN 24,000 (Sellas GmbH, Dr. Sellmeier Gevelsberg, Alemania). La emisión UVA1 se determinó con un UVAMETER de tipo II (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Alemania) y se fijó en aproximadamente 150 mW/cm² UVA1 en un tubo a una distancia objetivo de 30 cm (Grether-Beck *et al.*, 1996; Grether-Beck *et al.*, 2003). Se ejecutan controles sin sílice en paralelo. Tras bien 6 o 24 h de radiación UV, se procede a recoger las células y se aísla el ARN total como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Se ejecuta una PC cuantitativa como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 usando parejas de iniciadores específicas como se indica en la tabla 4. Las reacciones PCR se llevaron a cabo como en el Ejemplo 2.

15 **Tabla 4:** Genes y parejas de iniciadores usados para RT-PCR a tiempo real para la determinación de la expresión genética en el Ejemplo 3

Gen	Parejas de iniciadores	
ARNr 18S	5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3'	SEQ ID NO: 1
	5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG'-3'	SEQ ID NO: 2
MMP-1	5'-GGGAGATCATCGGGACAACCTC-3'	SEQ ID NO: 11
	5'-GGGCCTGGTTGAAAAGCAT-3'	SEQ ID NO: 12
IL-6	5'-AGCCGCCCCACACAGA -3'	SEQ ID NO: 13
	5'-CCGTCGAGGATGTACCGAAT-3'	SEQ ID NO: 14

- 20 **[0060]** La FIG. 4 muestra que la Sílice precipitada de fuentes geotermales inhibe, en función de la dosis, la regulación al alza de IL-6 y MMP-1. Se han observado resultados similares con la sustancia de control de metasilicato de sodio. Esto apunta firmemente a que tanto el lodo de sílice (FIG. 4a y b) como el metasilicato de sodio (FIG. 4c y d) previenen el fotoenvejecimiento de la piel mediante la inhibición de la expresión MMP-1 inducida por la radiación UVA en fibroblastos humanos.

25 **Ejemplo 4:** Efecto potenciador de la piel del lodo de sílice y el metasilicato

- 30 **[0061]** Fibroblastos dérmicos humanos, HDF, preparados a partir de prepucio neonatal y cultivados durante 4 días hasta que alcanzan la confluencia como se describe en el Ejemplo 3. Se llevaron a cabo reacciones PCR como en el Ejemplo 2 usando parejas de iniciadores específicas como se indica en la tabla 5.

Tabla 5: Genes y parejas de iniciadores usados para RT-PCR a tiempo real para la determinación de la expresión genética en el Ejemplo 4

Gen	Parejas de iniciadores	Referencia
ARNr 18S	5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3'	SEQ ID NO: 1
	5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG'-3'	SEQ ID NO: 2
Colágeno 1A1	5'-CCTGCGTGTACCCCACTCA-3'	SEQ ID NO: 15
	5'-ACCAGACATGCCTCTTGTCTT-3'	SEQ ID NO: 16
Colágeno 1A2	5'-GATTGAGACCCTTCTTACTCCTGAA-3'	SEQ ID NO: 17
	5'-GGGTGGCTGAGTCTCAAGTCA-3'	SEQ ID NO: 18

- 35 **[0062]** La FIG. 5 muestra la capacidad del lodo de sílice para inducir la expresión de la codificación genética para las proteínas de matriz extracelular de colágeno 1A1 y colágeno 1A2, pero la expresión de colágeno

inducida previene el envejecimiento de la piel mediante la inducción de la regeneración cutánea. El metasilicato de sodio no mostró ningún aumento en la expresión de la codificación genética para los colágenos 1A1 y 1A2. Sin embargo, el lodo de sílice indujo la expresión de proteínas de colágeno 1A1 y colágeno 1A2 a una concentración de 10 µg/ml, lo que implica que el lodo de sílice fomenta aún más la regeneración cutánea a través de la síntesis de nuevo colágeno.

Ejemplo 5: Preparación de productos para el cuidado de la piel con sílice biológicamente activa para uso cosmético y farmacéutico

10 5(a) Preparación de un producto espumoso
[0063]

Tabla 6: Ingredientes

A	Agua	80 %
A	Lauril sulfato sódico	10,0 %
A	Agua marina (<i>maris aqua</i>)	2,0 %
A	Betaina de coco, glucósido de coco	3,0 %
A	Cloruro de sodio	1,0 %
A	Glicerina	0,80 %
A	Lodo de sílice	0,20 %
B	Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) etilparabeno (y) propilparabeno (y) butilparabeno (e) isobutilparabeno	1,0 %
B	Conservantes, perfume, excipientes menores	2,0 %

15

[0064] Se mezclan los ingredientes de la fase A, se mezclan los ingredientes de la fase B y, a continuación, se añade la fase B a la fase A y se mezclan.

5(b) Preparación de un producto emulsionante; se mezclan los siguientes ingredientes:

20

[0065]

Tabla 7: Ingredientes

A	Agua	77 %
A	Carbómero	0,4 %
B	Glicéridos vegetales hidrogenados	2,5 %
B	Alcohol cetearílico	2,0 %
B	Triglicéridos de ácidos grasos C6-C10	2,0 %
B	Agente(s) ajustador(es) de la viscosidad	2,5 %
B	Otro(s) agente(s) emulsionante(s)	3,5 %
C	Agua marina (<i>maris aqua</i>)	3 %
C	Glicerina	1,50 %
C	Lodo de sílice	0,20 %
C	Hidróxido sódico y otros ajustadores del pH	0,75 %

ES 2 688 931 T3

D	Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) etilparabeno (y) propilparabeno (y) butilparabeno (e) isobutilparabeno	1,0 %
D	Otros conservantes, perfume, otros excipientes menores	1,6 %
E	Octenil succinato aluminico de almidón	2,0 %

[0066] Se mezclan los ingredientes A a 70 °C, se mezclan los ingredientes B y se añaden a la fase A. Se añaden a la mezcla los ingredientes C en el orden mostrado a 45 °C, se añaden los ingredientes D a 40 °C y se añaden los ingredientes E a 35 °C.

5

5(c) Preparación de un producto en polvo; se mezclan los siguientes ingredientes:

[0067]

10 **Tabla 8:** Ingredientes

A	Talco	81,5 %
B	dimeticona	1,0 %
B	caolín	9 %
B	Almidón de oryza sativa	2,0 %
C	Talco	5,0%
C	Lodo de sílice	0,50 %
C	Conservantes, perfume, anticoagulante, otros excipientes	1,0 %

[0068] Se añaden los ingredientes B a A, se mezclan los ingredientes C y se añaden a la mezcla A+B.

REIVINDICACIONES

1. Sílice para su uso en el tratamiento de condiciones de la piel seleccionadas de entre el grupo que consiste en daño cutáneo debido a corticosteroides, atrofia cutánea, debilidad estructural del tejido conjuntivo, 5 curación de heridas, dermatitis atópica, eccemas, psoriasis, rosácea.
2. Sílice para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha sílice se precipita a partir de fuentes naturales de agua caliente salina.
- 10 3. Sílice para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha sílice es obtenible a partir de diatomeas.
4. Sílice para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha sílice se encuentra en una forma coloidal.
- 15 5. Sílice para su uso según la reivindicación 1, formulada de una forma seleccionada de entre el grupo que consiste en una loción, una crema, una emulsión incluida una emulsión de agua en aceite y una emulsión de aceite en agua, una solución coloidal, una pasta, un gel, una pomada, una espuma, una base anhidra, un jabón y una suspensión.
- 20 6. Un método cosmético no terapéutico para potenciar la función de barrera natural de la piel de la piel de un humano que comprende la aplicación en dicha piel de una composición cosmética que comprende sílice como el ingrediente activo.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha composición cosmética se presenta en una forma 25 seleccionada de entre el grupo que consiste en una loción, una crema, una emulsión incluida una emulsión de agua en aceite y una emulsión de aceite en agua, una solución coloidal, una pasta, un gel, una pomada, una espuma, una base anhidra, un jabón y una suspensión.
8. El método de la reivindicación 6, en el que dicha sílice se precipita a partir de fuentes naturales de agua 30 caliente salina.
9. El método de la reivindicación 6, en el que dicha sílice es obtenible a partir de diatomeas.
10. El método de la reivindicación 6, en el que dicha sílice se encuentra en una forma coloidal.
- 35 11. Un método cosmético no terapéutico para inducir la síntesis del colágeno de la piel de un humano que comprende la aplicación en dicha piel de una composición cosmética que comprende sílice como el ingrediente activo.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha composición cosmética se presenta en una forma seleccionada de entre el grupo que consiste en una loción, una crema, una emulsión incluida una emulsión de agua en aceite y una emulsión de aceite en agua, una solución coloidal, una pasta, un gel, una pomada, una espuma, una base anhidra, un jabón y una suspensión.
- 45 13. El método de la reivindicación 11, en el que dicha sílice se precipita a partir de fuentes naturales de agua caliente salina.
14. El método de la reivindicación 11, en el que dicha sílice es obtenible a partir de diatomeas.
- 50 15. El método de la reivindicación 1, en el que dicha sílice se encuentra en una forma coloidal.

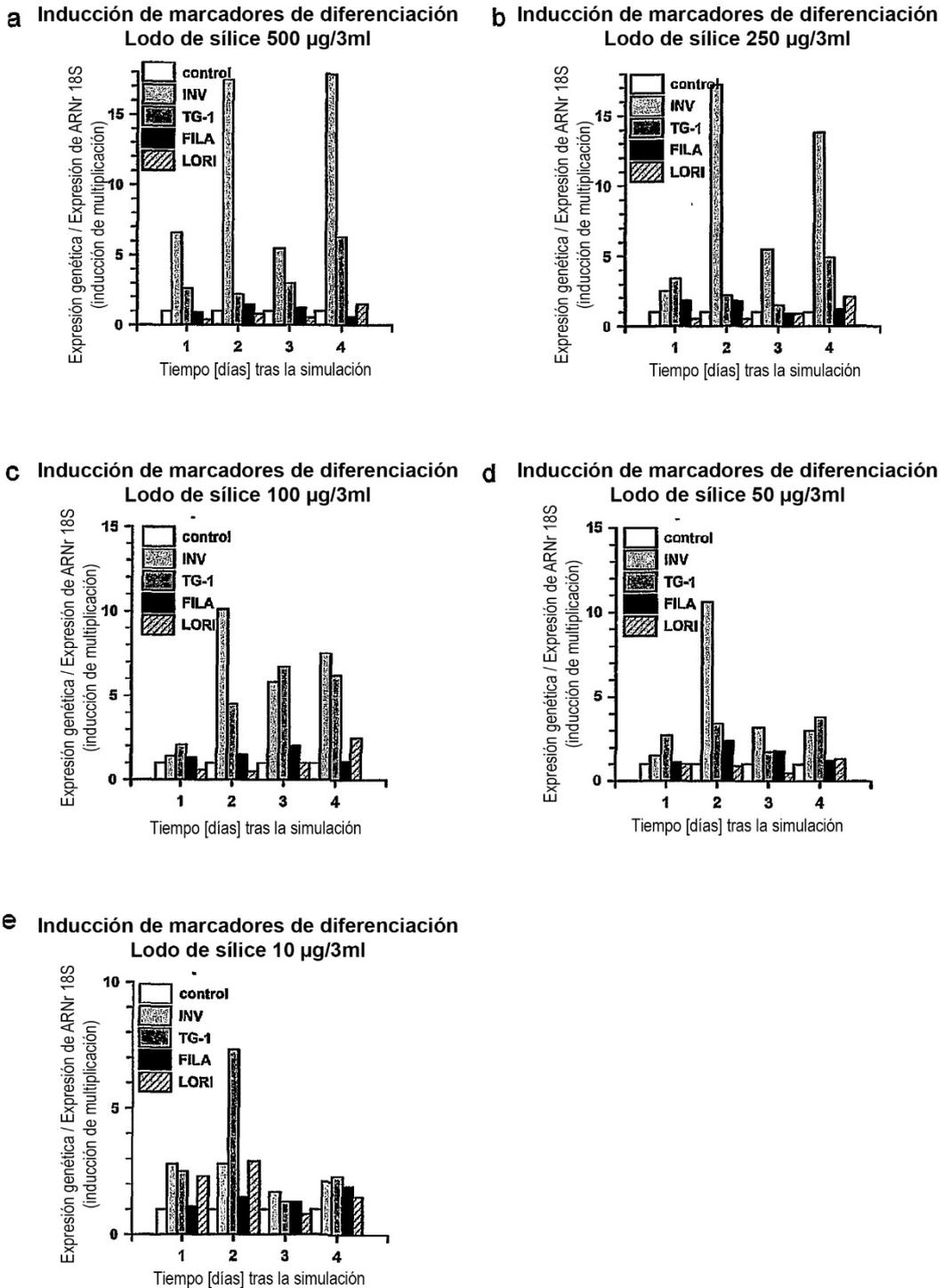


Figura 1

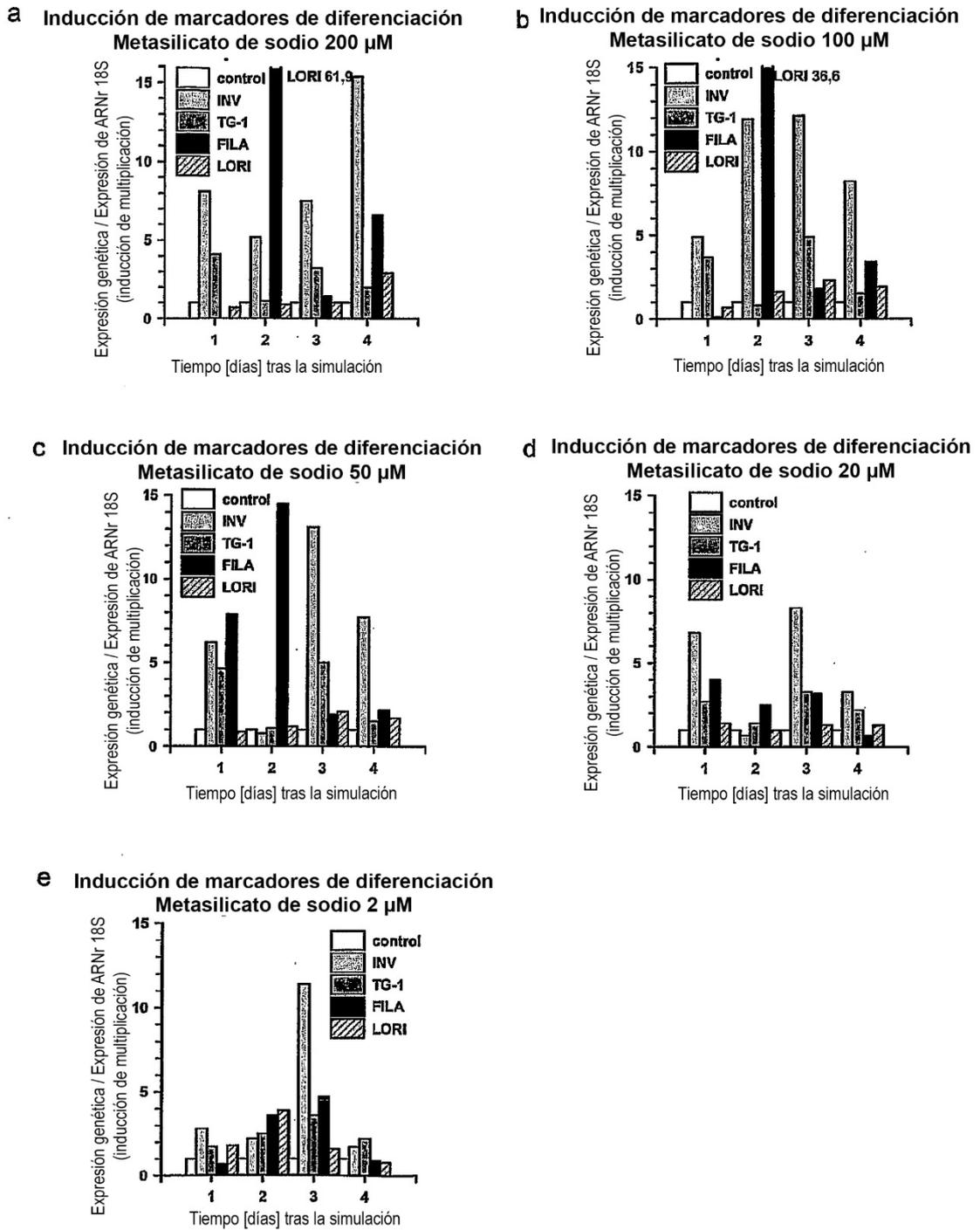
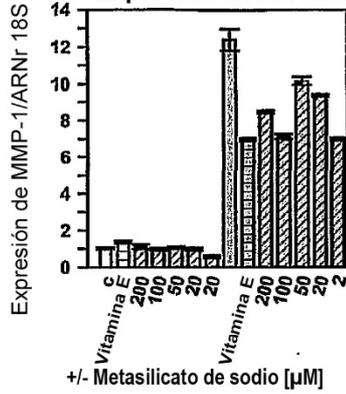


Figura 2

a Efecto inhibitor del metasilicato de sodio en MMP-1 inducida por radiación UVA

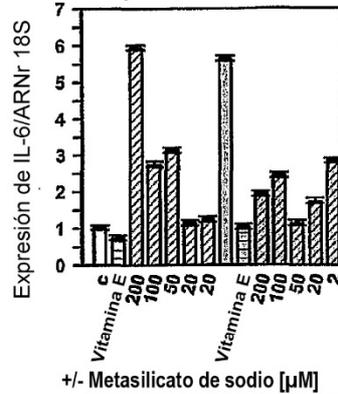
Expresión en fibroblastos



24 h tras exposición a radiación UVA

c Efecto inhibitor del metasilicato de sodio en IL-6 inducida por radiación UVA

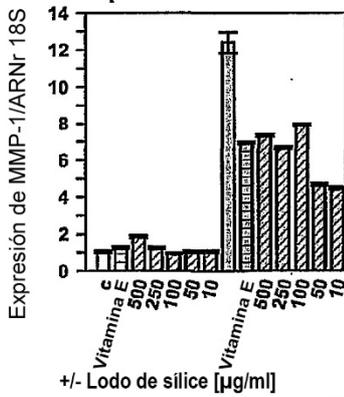
Expresión en fibroblastos



6 h tras exposición a radiación UVA

b Efecto inhibitor del lodo de sílice en MMP-1 inducida por radiación UVA

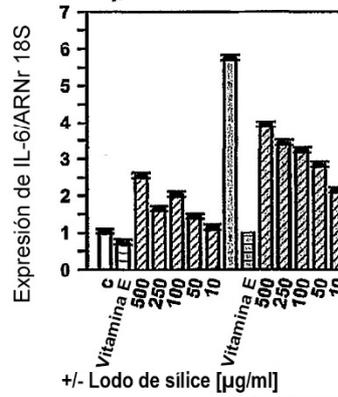
Expresión en fibroblastos



24 h tras exposición a radiación UVA

d Efecto inhibitor del lodo de sílice en IL-6 inducida por radiación UVA

Expresión en fibroblastos



6 h tras exposición a radiación UVA

Figura 3

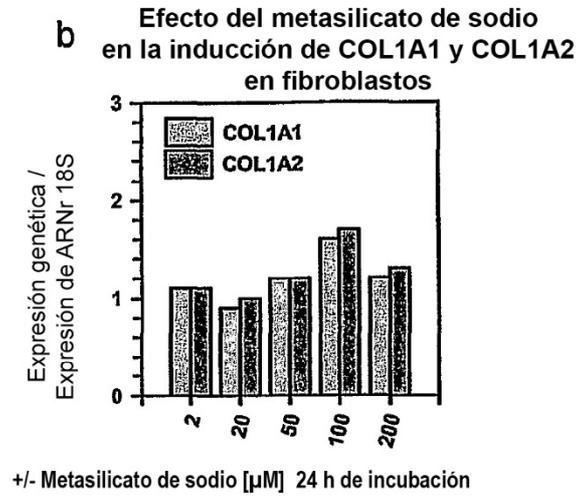
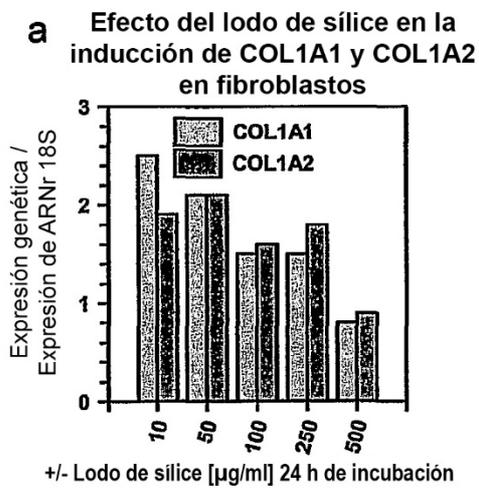


Figura 4