

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 105**

21 Número de solicitud: 201830426

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.04.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.11.2018

71 Solicitantes:

MONTELOEDER S.L. (100.0%)

Miguel Servet, 16 nave 17

03203 Elche (Alicante) ES

72 Inventor/es:

HERRANZ LÓPEZ, María;

ROCHE COLLADO, Enrique;

MICOL MOLINA, Vicente;

JONES BARBERÁ, Jonathan Richard ;

CATURLA CERNUDA , Nuria y

PERAL CLEMENT , Ana

74 Agente/Representante:

MARTÍN ÁLVAREZ, Juan Enrique

54 Título: **Composición de extractos vegetales con flavonoides para paliar los múltiples efectos de la contaminación del aire sobre la piel**

57 Resumen:

La presente invención aporta una composición para su uso en el tratamiento de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel o para la prevención del envejecimiento prematuro de la piel asociada a los efectos de la contaminación del aire. Dicha composición comprende diterpenos, oleuropeína, verbascósido, quercetina e hidroxitirosol. En un modo preferente de realización la composición contiene alrededor de un 32 % en peso de extracto de romero con un contenido mínimo de 15 % en peso de diterpenos, alrededor de un 30 % en peso de extracto de hojas o fruto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeína y un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol, alrededor de un 28 % en peso de extracto de Lippia citriodora con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido y alrededor de un 10% en peso de extracto de Sophora japonica con un contenido mínimo de 40% en quercetina.

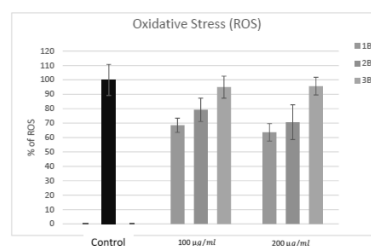


Figura 1

TÍTULO DE LA INVENCION

Composición de extractos vegetales con flavonoides para paliar los múltiples efectos de la contaminación del aire sobre la piel

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro del campo técnico de productos para el tratamiento de las afecciones de la piel humana, en particular, para paliar los múltiples efectos de la contaminación del aire de las ciudades sobre la piel. No obstante, la presente composición, a pesar de estar específicamente formulada para paliar los múltiples efectos de la contaminación ambiental urbana, también puede ser comercializada y usada con diferentes indicaciones con notables efectos paliativos, como por ejemplo, como producto para retrasar el deterioro de la piel por el envejecimiento celular

10

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La exposición crónica a la contaminación del aire de las ciudades produce simultáneamente múltiples efectos nocivos sobre la piel humana. Entre estos efectos perjudiciales se encuentran el envejecimiento prematuro de la piel, condiciones inflamatorias o alérgicas como la aparición de pieles atópicas, dermatitis, eczema, psoriasis o acné, llegando incluso a provocar cáncer de piel, entre las afecciones más graves que puede ocasionar (1).

20

25

La relación entre la contaminación ambiental con los efectos dañinos que ésta causa sobre la piel ha sido demostrada en numerosos estudios científicos durante los últimos años.

Por ejemplo, se ha comprobado científicamente que una variedad de contaminantes del aire, como el humo de tabaco, compuestos orgánicos volátiles (VOC's de sus siglas en inglés), formaldehído, tolueno, dióxido de nitrógeno y materia particulada, actúan como factores de riesgo para el desarrollo o agravamiento de la dermatitis atópica, que es un proceso inflamatorio de la piel (2, 3, 4). Una posible explicación es que estos contaminantes del aire inducen estrés oxidativo en la piel, lo que conduce a la disfunción de su barrera protectora o la desregulación de la inmunidad. Además, se ha visto como la activación del receptor de hidrocarburos AhR parece estar también implicado (5, 6, 7).

30

35

La contaminación del aire es un factor agravante en varias patologías inflamatorias de la piel, incluyendo el acné. Consecuentemente, suelen aparecer manchas oscuras en las pieles normales y acné en las pieles grasas durante períodos de contaminación ambiental muy elevada. Existe una correlación positiva entre la contaminación ambiental del aire y la aparición y evolución del acné porque en un estudio se ha establecido que, a mayor concentración de ciertos contaminantes atmosféricos, mayor es el número de consultas de pacientes por *acné vulgaris* y que a mayor concentración de ciertos contaminantes, también crece la secreción de sebo y el número de lesiones de acné (8, 9).

40

45

Además, la contaminación ambiental del aire provoca la oxidación del sebo cutáneo, lo cual intensifica los signos del acné. Además, la contaminación atmosférica combinada con polvo ambiental y rayos ultravioleta (UV) procedentes de la radiación solar resulta en la oxidación del escualeno, el componente principal del sebo.

5

La relación entre el envejecimiento prematuro cutáneo y la exposición a la contaminación ambiental del aire fue observada por primera vez en el estudio epidemiológico SAILA, realizado en mujeres caucásicas de avanzada edad, donde se encontró una correlación entre la mayor exposición a la materia particulada proveniente del tráfico y el mayor envejecimiento de la piel. En concreto, se correlacionó con la aparición de mayor cantidad y mayor profundidad de arrugas (pliegue naso-labial) así como un aumento en el número de manchas en las mejillas y la frente. De hecho, se observó una asociación entre la distancia de 100 m o menos a una carretera con tráfico con un 35% más manchas en la frente y un 15% más manchas o en las mejillas (10).

15

Pero no sólo la exposición a la materia particulada se asocia con un envejecimiento acelerado. También se ha visto una fuerte correlación entre el NO₂ y la formación de manchas en mujeres caucásicas (n = 806; SALIA). Estos resultados fueron confirmados también en mujeres chinas (n = 1,072; Taizhou longitudinal study cohort). Un aumento de 10 µg/m³ en NO₂ se asoció con un 25% más de manchas en las mujeres alemanas (p=0.003) y un 24% más en las mujeres chinas mayores de 50 años (11). Como dato adicional, muchas ciudades del Reino Unido presentan niveles tan altos de NO₂ que rebasan los límites legales, con Londres sobrepasando el límite anual en la primera semana de 2016, con unas concentraciones que alcanzan más de 200 microgramos de NO₂ por metro cúbico.

20

25

La contaminación ambiental del aire produce unos efectos a corto plazo sobre la piel, como por ejemplo, el aumento de la sequedad, el enrojecimiento e irritación y otros efectos más a largo plazo, como el envejecimiento prematuro, la degradación de colágeno además de la aparición de manchas y arrugas más profundas en la piel.

30

Los productos actuales para el tratamiento y cuidado de la piel están desarrollados para cubrir el amplio espectro de efectos que ocasiona la contaminación ambiental del aire, habiendo actualmente algunos productos que son antiarrugas, otros anti-acné, otros hidratantes, etc. La aplicación de todos estos productos para paliar los efectos de la contaminación ambiental del aire sobre la piel conlleva un gasto significativo y la aplicación paralela o combinada de varias formulaciones sobre la piel, con el riesgo de ocasionar efectos indeseados, ya que dichas combinaciones no han sido testadas previamente.

35

40

RESUMEN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención aporta una composición para su uso en el tratamiento de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel, dicha
5 composición comprendiendo diterpenos, oleuropeina, verbascósido, quercetina e hidroxitirosol.

Una composición como la descrita anteriormente es adecuada para tratar los efectos de la contaminación del aire sobre la piel porque produce una combinación de
10 efectos sobre la misma necesarios para paliar o contrarrestar todos los efectos nocivos de la contaminación del aire. Es decir, una composición como la descrita previamente tiene unos importantes y marcados efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-envejecimiento y blanqueantes sobre la piel humana. Con ello se evita tener que aplicar diversos productos simultáneamente para combatir y/o evitar
15 todas las afecciones asociadas a la contaminación ambiental, como son la inflamación, el aumento del acné, la dermatitis crónica, psoriasis, etc. El uso de una composición como la que se ha descrito anteriormente puede ser preventivo o para tratar condiciones existentes de la piel.

La composición puede comprender una proporción individual de 2.5 a 5 en peso de diterpenos, oleuropeina, verbascósido y quercetina a hidroxitirosol, aproximadamente. Preferiblemente, la proporción en peso de diterpenos a hidroxitirosol es alrededor de 3, la proporción en peso de oleuropeina a hidroxitirosol es alrededor de 3, la proporción en peso de verbascósido a hidroxitirosol es alrededor de 4.5 y la proporción en peso de quercetina a hidroxitirosol es alrededor
25 de 2.5.

Estas proporciones confieren a la composición un equilibrio adecuado entre los efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-envejecimiento y blanqueante o anti-pigmentación excesiva para que el tratamiento o la prevención de las distintas afecciones causadas por la contaminación ambiental sea efectivo o tangible con un solo producto.
30

Una composición con las características mencionadas anteriormente solo es posible obtenerla mediante la combinación de extractos de diferentes plantas. Cada extracto puede aportar uno o varios de los ingredientes activos, o una parte del total de los ingredientes activos.
35

Por ejemplo, como fuente de quercetina se pueden emplear varios extractos, como por ejemplo, extractos de cebolla, hinojo, eneldo, arándano o crisantemo, pero la fuente preferida de quercetina es un extracto de *Sophora japonica* con un contenido mínimo de 40% en peso de quercetina.
40

Un extracto de *Sophora japonica* con un contenido mínimo de 40% en peso de quercetina es un ingrediente beneficioso para esta composición porque aporta una gran concentración de quercetina en relación a su coste de producción y peso y permite obtener concentraciones satisfactorias del resto de ingredientes activos.
45

La quercetina es un flavonoide perteneciente a la familia de los flavonoles. Se encuentra principalmente en cebollas, uvas, bayas, cerezas, brócoli y frutas cítricas. La quercetina es un potente antioxidante con alta actividad para eliminar radicales libres además de tener una buena actividad antiinflamatoria. Otra propiedad interesante de la quercetina es que hay estudios donde se ha visto que reduce la capacidad de la liberación de histamina (12). Varios estudios han demostrado que ciertos agentes contaminantes como las partículas de diésel aumentan los niveles de histamina, aumentando las reacciones alérgicas de aquellos que se encuentran en lugares de alta polución.

Como fuente de diterpenos se pueden utilizar diversos extractos de plantas. Los diterpenos tienen un marcado efecto anti-inflamatorio, lo cual es muy beneficioso para una composición indicada a paliar los efectos de la contaminación ambiental sobre la piel.

Preferiblemente, la composición contiene ácido carnósico como diterpeno principal. El ácido carnósico es un diterpeno encontrado en numerosas plantas fácilmente disponibles y por tanto es un diterpeno adecuado para ser usado en esta formulación por su coste adecuado y abundancia. Entre los extractos que se pueden usar como fuente de ácido carnósico están: romero, salvia, orégano, melisa o tomillo, por ejemplo.

Preferiblemente, la composición comprende un extracto de romero con un contenido mínimo de 15% en peso de diterpenos porque aporta una gran concentración de diterpenos en relación a su coste de producción y peso y permite obtener concentraciones satisfactorias del resto de ingredientes activos.

El ácido carnósico tiene, además de una potente actividad antioxidante, una importante actividad anti-inflamatoria, debido a que elimina interleucinas, bloquea o inhibe la liberación de óxido nitroso y el ciclo de la tirosina-quinasa. El ácido carnósico también tiene propiedades anti-adipogénicas y previene el envejecimiento prematuro de la piel mediante la inhibición de la oxidación de lípidos cutáneos o mediante mecanismos biofilácticos.

Como fuente de oleuropeina se pueden utilizar numerosos extractos, como por ejemplo extractos de hoja o fruto de olivo o extractos de árgano o de fresno. Preferiblemente, la composición comprende un extracto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeina.

Un extracto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeina es una fuente muy adecuada de oleuropeina porque los extractos de olivo son fáciles de producir a un coste adecuado y es un árbol muy abundante en la cuenca mediterránea. Además, un contenido de al menos un 16 % en peso de oleuropeina es suficiente para garantizar una adecuada bioactividad al ser combinado con otros extractos.

La oleuropeina presenta una importante actividad antioxidante ejercida mediante diversos mecanismos. Principalmente, la oleuropeina mejora la estabilidad de los radicales libres mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre el hidrógeno libre del grupo hidroxilo y sus radicales fenóxilos.

5

Asimismo, la oleuropeina presenta efectos anti-inflamatorios mediante la actividad de la lipooxigenasa, la producción de leucotrieno B₄, la inhibición de la biosíntesis de citoquinas pro-inflamatorias o la modulación de parámetros de la inflamación.

10 Como fuente de hidroxitirosol se pueden utilizar numerosos extractos, como por ejemplo extractos de hoja o fruto de olivo o extractos de árbol de fresno. Preferiblemente, la composición comprende un extracto de olivo con un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol.

15 Un extracto de olivo con un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol es una fuente muy adecuada de hidroxitirosol porque los extractos de olivo son fáciles de producir a un coste adecuado y es un árbol muy abundante en la cuenca mediterránea. Además, un contenido de al menos un 5 % en peso de hidroxitirosol es suficiente para garantizar una adecuada bioactividad al ser combinado con otros
20 extractos.

La gran actividad antioxidante del hidroxitirosol es atribuida al fragmento molecular o-dihidroxifenilo gracias a su capacidad de inhibir los efectos de los radicales libres y a su poder reductor del ion Fe³⁺. Las propiedades antioxidantes de los o-difenoles
25 están asociadas con su capacidad de formar enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el grupo hidroxilo y el radical fenoxilo; por lo tanto, el grupo catecol evita la propagación en cadena mediante la donación de un hidrógeno radical a los radicales alquilperóxidos formados en el paso de iniciación de la oxidación de los lípidos.

30 La inflamación y sus consecuencias juegan un papel crucial en las afecciones de la piel. Se ha demostrado que el hidroxitirosol inhibe la producción de las moléculas proinflamatorias leucotrienos y la actividad del araquidonato de lipooxigenasa. Recientemente se ha publicado que un extracto que contiene 20 % en peso de hidroxitirosol inhibe la hinchazón inflamatoria y la hiperalgesia y suprime la citoquina
35 proinflamatoria en un modelo de inflamación en ratas.

Como fuente de verbascósido se pueden utilizar numerosos extractos, como por ejemplo extractos de hoja o fruto de olivo, *Buddleja globosa*, *Lippia citriodora*,
40 *Plántago lanceolata*, *Cistanche tubulosa*, *Rehmannia glutinosa*, etc. Preferiblemente, la composición comprende un extracto de *Lippia Citriodora* con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido.

Un extracto de *Lippia citriodora* con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido es una fuente muy adecuada de verbascósido porque los extractos de
45 esta planta son fáciles de producir a un coste adecuado debido a que es una planta muy abundante en la cuenca mediterránea. Además, un contenido de al menos un

25 % en peso de verbascósido es suficiente para garantizar una adecuada bioactividad al ser combinado con otros extractos.

5 El verbascósido, también conocido como acetósido, presenta actividad antioxidante, anti-inflamatoria, blanqueante, fotoprotectora y actividad quelante. La actividad antioxidante ha sido demostrada en numerosos estudios. La actividad anti-inflamatoria ha sido demostrada en un estudio in-vitro sobre cultivos de queratinocitos humanos, en el que el verbascósido fue capaz de reducir, con una respuesta dependiente a la dosis, la liberación de quimioquinas pro-inflamatorias (13). El verbascósido inhibe la actividad de la tirosinasa y la producción de melanina en células de melanoma B16, según un estudio de Young *et al.* (13, 14).

15 Preferiblemente, la composición comprende alrededor de un 32 % en peso de extracto de romero con un contenido mínimo de 15 % en peso de diterpenos, alrededor de un 30 % en peso de extracto de hojas o fruto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeina y un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol, alrededor de un 28 % en peso de extracto de *Lippia citriodora* con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido y alrededor de un 10 % en peso de extracto de *Sophora japónica* con un contenido mínimo de 40% en quercetina.

20 Una composición como la descrita en el párrafo anterior muestra un equilibrio adecuado entre los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y blanqueantes sobre la piel, tal y como demuestran nuestros estudios de actividad antioxidante en queratinocitos en presencia y en ausencia de radiación UV, de actividad anti-inflamatoria en queratinocitos expuestos a radiación UV y de actividad blanqueante en melanocitos. Es muy conveniente poder tener las funciones antioxidante, anti-inflamatoria y blanqueante equilibradas en una sola composición, ya que es posible paliar los múltiples efectos de la contaminación ambiental del aire sobre la piel mediante la aplicación de un solo producto, que ha sido testado adecuadamente. En cambio, si se intenta tratar los múltiples efectos de la contaminación ambiental del aire sobre la piel mediante la aplicación de diversos productos para cada efecto, incrementa el riesgo de que se usen productos incompatibles entre sí, ya que su uso conjunto no ha sido evaluado previamente, y es posible que el tratamiento usado produzca un efecto peor que el problema inicial. Además, el hecho de usar un solo producto conlleva un menor coste para el cuidado diario de la piel.

35 La composición descrita anteriormente puede ser administrada a una dosis entre 0.1 g y 1 g diarios. Esta dosis es considerada segura según los estudios de toxicidad realizados y presentados en el ejemplo 4.

40 Preferiblemente, la dosis diaria es de 250 mg /día. Esta dosis produce efectos significativos y observables en la paliación de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel en comparación con modelos o personas no tratadas.

45 Otro segundo aspecto de la invención aporta una composición para su uso en la prevención del envejecimiento prematuro de la piel asociada a los efectos de la

contaminación del aire sobre la piel, dicha composición comprendiendo diterpenos, oleuropeina, verbascósido, quercetina e hidroxitirosol.

5 Las características de la composición del primer aspecto de la invención son igualmente aplicables a la composición del segundo aspecto de la invención.

En una realización más en particular, la administración de las composiciones de la presente invención se selecciona de entre formulaciones que la contienen destinadas para administración por vía oral, tópica, transdérmica o parenteral.

10

Preferentemente, las composiciones de la presente invención pueden ser administrada por vía oral conteniendo uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles, en forma sólida o líquida. Estas formulaciones pueden contener componentes convencionales tales como agentes de unión, cargas, lubricantes y agentes humectantes fisiológicamente aceptables. Las formulaciones pueden tomar cualquier forma apropiada, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas para chupar, disoluciones aceitosas o acuosas, suspensiones, emulsiones o en forma en polvo seco adecuada para la reconstitución con agua u otro medio líquido adecuado antes del uso, para la liberación inmediata o controlada.

20

Las formas orales líquidas para la administración también pueden contener determinados aditivos tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y agentes emulsionantes. Las composiciones líquidas no acuosas para la administración oral pueden formularse también, conteniendo por ejemplo aceites comestibles. Tales composiciones líquidas pueden encapsularse de manera conveniente en, por ejemplo, cápsulas de gelatina en una cantidad de dosificación unitaria.

25

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por vía parenteral en combinación con vehículos líquidos inyectables convencionales, tales como agua o alcoholes adecuados. Los adyuvantes farmacéuticos convencionales para inyección, tales como agentes estabilizadores, agentes solubilizantes y tampones pueden incluirse en tales formulaciones inyectables. La composición de la presente invención puede ser administrada por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa.

35

Igualmente, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por vía tópica, las formulaciones de aplicación tópica conteniendo uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles con la piel, en forma líquida, aerosol, crema, etc.

40

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45

Figura 1. Gráfico que muestra el porcentaje de oxidación de los queratinocitos humanos (HaCaT) tratados con las composiciones 1B, 2B y 3B con dos concentraciones distintas en comparación con las células sin tratar.

Figuras 2A, 2B y 2C. Gráficos que muestran el porcentaje de oxidación de queratinocitos humanos (HaCat) *in vitro* incubados con las tres formulaciones de la Tabla 1 (1B, 2B y 3B) y expuestos a radiación ultravioleta tipo B (UVB), con intensidades de 800 y 1200 J/m² en comparación con muestras no tratadas y no irradiadas.

Figura 3. Gráfico que muestra los niveles relativos de IL-8 en queratinocitos humanos (HaCat) *in vitro* en comparación con las células irradiadas y sin tratar. Los queratinocitos se trataron con 10 µg / ml de diferentes formulaciones y se expusieron a radiación UVB (300 J / m²). Los datos se expresan como la media ± DE. El tratamiento con las diferentes formulaciones se realizó durante y post irradiación y también sólo post irradiación.

Figuras 4A, 4B y 4C. Gráficos que muestran el porcentaje de melanina producido por melanocitos humanos tratados con las fórmulas de la Tabla 1 (1B, 2b y 3B) en comparación con los melanocitos sin tratar.

Figura 5. El gráfico de barras representa la acumulación de ROS en las muestras de queratinocitos humanos (HaCat) tratados con la composición 1B (ZeroPollution) a concentraciones de 0.001 % y 0.005 % en peso y sometidos durante 24 horas a una exposición con material pulverulento urbano (Urban Dust UD) a una concentración de 400 µg/ml y posteriormente irradiados con UVA durante 25 minutos. Los datos han sido normalizados con respecto al control expuesto a la misma cantidad de UD y radiación UVA.

Figura 6. Gráfico que muestra el incremento de la concentración de malondialdehído (MDA) en explantes cutáneos *ex vivo* tras ser expuestos a una mezcla de contaminantes y sin tratar con la fórmula 1B (barra control) y tratados con ella (barra ZeroPollution).

Figura 7. Gráfico que muestra la concentración de IL1-alpha en explantes cutáneos *ex vivo*. Primera columna: sin ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; segunda columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; tercera columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y con tratamiento con la composición 1B (ZeroPollution).

Figura 8. Gráfico que muestra la expresión de AhR en explantes cutáneos *ex vivo*. Primera columna: sin ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; segunda columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; y tercera columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y con tratamiento con la composición 1B (ZeroPollution).

Figura 9. Gráfico que muestra la expresión de proteína metalotioneína MT-H1 en explantes cutáneos *ex vivo*. Primera columna: sin ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; segunda columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y sin tratamiento con la composición 1B; y tercera columna: tras ser expuestos a la mezcla de contaminantes y con tratamiento con la composición 1B (ZeroPollution).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y EJEMPLOS.

5

Mecanismos moleculares de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel

10 La contaminación atmosférica, en combinación con el ozono y los rayos UV, alteran el equilibrio existente entre la producción y la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS) lo cual lleva consigo la inducción de una respuesta inflamatoria. El estrés crónico inducido por la contaminación atmosférica impacta y altera la integridad de la barrera cutánea hasta tal punto que puede generar o empeorar ciertas patologías (sensibilidad, irritabilidad, deshidratación, trastornos de pigmentación, dermatitis, acné, etc. (15).

15 El ozono actúa principalmente sobre el estrato córneo por el contrario las partículas (PM) contienen una serie de moléculas químicas tóxicas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que al contacto con la piel, pueden penetrar en la piel y dañar la piel en un nivel más profundo, actuando directamente sobre los queratinocitos y melanocitos por ejemplo mediante a la unión al AhR (receptor de
20 hidrocarburo arilo) cuya activación desencadena la expresión de genes implicados en acelerar el envejecimiento de la piel, la pigmentación y estrés oxidativo que causa la inflamación de la piel (15).

De esta manera, un compuesto capaz de inhibir la activación del receptor de
25 hidrocarburos de arilo (Ahr) que está relacionado con la inflamación de la piel (hipersensibilidad al prurito) y con la aparición de manchas y el empeoramiento de las ya existentes es una buena estrategia para conseguir obtener una composición anti-contaminación.

En este sentido, uno de los objetivos de la fórmula es que fuese capaz de inhibir la
30 activación del receptor AhR que tiene lugar como consecuencia de la contaminación del aire.

Como ya se ha mencionado, uno de los mecanismos por el cual la contaminación
35 ambiental del aire puede causar daños en la piel incluye la activación del receptor aril-hidrocarburo (AhR). Los contaminantes del aire ambiental generan radicales libres, respuestas immuno-inflamatorias cutáneas, causan la activación de mecanismos dependientes del receptor AhR y alteran la microflora cutánea.

Diversos estudios científicos han demostrado la implicación de la activación del
40 receptor AhR en varias afecciones de la piel. Un estudio sobre la implicación de la activación del receptor AhR en ratones transgénicos demostró que la activación de la transcripción de AhR provocó lesiones cutáneas inflamatorias similares a la dermatitis atópica. El análisis genético por microarray de la piel del ratón mostró una sobreexpresión de genes asociados con la inflamación. Los resultados de este estudio demuestran que la activación de AhR puede estar implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias de la piel.

AhR es un factor citosólico de transcripción activado por ligandos que se encuentra en varios tipos de células cutáneas que regulan la inflamación proliferativa celular y la melanogénesis, incluyendo queratinocitos, fibroblastos y melanocitos (16, 17). El receptor AhR no activado se encuentra en un complejo proteínico citosólico y al unirse con un ligando, el complejo se disocia, causando la traslocación del AhR al núcleo donde estimula la expresión de los genes que contienen el elemento de respuesta xenobiótico (XRE). Los genes que contienen el XRE incluyen las enzimas de detoxificación citocromo P450 (CYP) (13). La activación de AhR juega un papel mediador en los efectos bioquímicos y tóxicos de los contaminantes del aire que actúan como ligandos, tales como dioxinas, ozono e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), llegando a influenciar procesos biológicos celulares tales como el crecimiento y la diferenciación y se ha demostrado recientemente que pueden inducir la proliferación de melanocitos y por tanto el oscurecimiento de la piel de ratones (18).

El hidrocarburo policíclico aromático 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) tiene diversos efectos patológicos en humanos mediante la activación del receptor AhR. El mecanismo primario subyacente a los cambios en la expresión genética inducida por TCDD es la activación del ciclo de transcripción que implica el receptor AhR y el translocador de AhR (Arnt). AhR y Arnt son factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo, la señalización de la hipoxia y los ritmos circadianos, y pertenecen a la familia de proteínas que se encuentra en el citoplasma en un complejo inactivo con proteínas auxiliares.

Una vez unido al TCDD, el AhR se disocia de algunas de las proteínas del complejo inactivo y se traslada al núcleo donde se dimeriza con Arnt. El heterodímero AhR/Arnt activa la transcripción de genes metabolizantes xenobióticos, algunos de los cuales codifican proteínas implicadas en el control del crecimiento, citoquinas, transcripción nuclear y reguladores de la proteólisis de la matriz extracelular (19).

El ciclo del AhR es activado por el TCDD y por el ácido trans-retinoico (all-trans retinoic acid), los cuales incrementan la expresión de MMP-1 en queratinocitos humanos normales, lo que sugiere que la inducción de MMP es un mecanismo común que subyace las patologías inducidas por el TCDD (20).

Se ha demostrado que el AhR es un regulador de la melanogénesis. Diversos estudios han examinado el papel del AhR, y un ejemplo es un estudio en el cual los melanocitos de donantes humanos fueron expuestos al TCDD y posteriormente se midió in-vitro la actividad de la tirosinasa y el contenido en melanina. Tras 5 días de exposición a TCDD, los melanocitos mostraron un nivel elevado de la actividad de la tirosinasa y un incremento de tres veces en la cantidad de melanina intracelular. Un experimento similar llevado a cabo en células de melanoma humanas FM55 demostró que el TCDD incrementa significativamente el contenido de melanina, confirmando que el ciclo melanogénico fue sobrerregulado por la activación de AhR (21).

AhR también ha sido identificado como un sensor de ozono. El ozono induce la traslocación nuclear del AhR e incrementa la expresión de AhR por parte del mRNA. Además, el ozono incrementa significativamente la expresión proteica y

mRNA de isoformas de CYP1. Las enzimas de CYP1 metabolizan compuestos que son más tóxicos que los respectivos compuestos originales y activan muchos compuestos xenobióticos procancerígenos (22).

5 Con el objeto de analizar la implicación del AhR en el envejecimiento de la piel inducido por el humo del tabaco (también considerado agente contaminante), fibroblastos primarios humanos fueron expuestos a un extracto de humo de tabaco soluble en hexano. Este extracto incrementó significativamente la inducción de MMP-1 en un cultivo de fibroblastos humanos, en paralelo a una sobreexpresión del
10 citocromo P1B1. Una reducción de la cantidad de AhR suprimió la elevada transcripción del gen dependiente de AhR, CYP1A1/CYP1B1, inducida por el extracto. La inducción de MMP-1 y de CYP1B1 fue suprimida por los inhibidores del ciclo del AhR 3-metoxi-4-nitroflavona y a-naftoflavona. Estos estudios sugieren que el extracto de humo de tabaco soluble en hexano induce la sobreexpresión de MMP-1 en fibroblastos cutáneos humanos mediante la activación del ciclo del AhR. Por
15 tanto, el ciclo del AhR podría estar implicado de forma patogénica en el envejecimiento de la piel causado por factores externos (23).

Mientras la correlación entre la contaminación del aire y la predominancia y seriedad
20 de la dermatitis atópica es bien conocida, el mecanismo que subyace no lo es tanto. En la actualidad los síntomas de la dermatitis atópica se tratan con compuestos esteroideos. Sin embargo, en muchos casos, el picor persiste. Uno de los causantes sería la activación del receptor AhR en respuesta a los contaminantes del aire, tales como materia particulada derivada del tráfico. El AhR activado induce la expresión
25 del factor neurotrófico artemin en los queratinocitos, lo que induce hiper-enervación de la epidermis, resultando en una hipersensibilidad al picor.

El rascado posterior conlleva una alteración de la barrera cutánea y una penetración
30 de antígenos acrecentada, lo que implica la sensibilización y favorece la predisposición a otras enfermedades alérgicas (24).

35

40

45

50

EJEMPLO 1. Estudios del efecto anti-oxidante, anti-inflamatorio y blanqueante de composiciones de extractos con elevado contenido en flavonoides.

5

Formula 1B	mg flavonoides/ 100 mg producto
Extracto de <i>Sophora japonica</i> (10% en peso)	9,4
Extracto de <i>Lippia citriodora</i> (28% en peso)	8,4
Extracto de hojas de romero (32% en peso)	4,8
Extracto de hojas de olivo (30% en peso)	8,36
Total Flavonoides	30,96

Formula 2B	mg flavonoides/ 100 mg producto
Extracto de <i>Sophora japonica</i> (10 % en peso)	9,4
Extracto de <i>Lippia citriodora</i> (57% en peso)	16,8
Extracto de hojas de romero (32 % en peso)	4,8
Total Flavonoides	31

Formula 3B	mg flavonoides/ 100 mg producto
Extracto de <i>Sophora japonica</i> (10 % en peso)	9,4
Extracto de hojas de romero (31 % en peso)	4,8
Extracto de hojas de olivo (59% en peso)	16,776
Total Flavonoides	30,976

TABLA 1. Composición de las tres formulaciones examinadas en el ejemplo 1.

10 Se han llevado a cabo ensayos preliminares para determinar la actividad paliativa de diferentes composiciones sobre los efectos de la contaminación del aire sobre la piel, teniendo en cuenta que los procesos de oxidación e inflamación son muy importantes en la generación del daño que la polución causa en la piel.

15 Además, se han hecho estudios de la capacidad de las distintas fórmulas para inhibir la producción de melanina, dado que la contaminación del aire aumenta la pigmentación y la aparición de manchas en la piel.

20 La Tabla 1 muestra los componentes y su concentración en cada composición examinada en los estudios preliminares. En la Tabla 1 se recoge la composición de las tres fórmulas testadas y se indican los mg de flavonoides por 100 mg de producto o composición final que cada uno de los extractos aporta a la formulación.

25 El aporte total de flavonoides de cada una de las fórmulas es el mismo, en torno a 31 mg por 100 mg de composición o producto final. Todas las fórmulas contienen la

misma cantidad de extracto de *Sophora japonica* y de romero (siempre aportando el mismo contenido de flavonoides).

5 En el estudio, cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos fueron expuestos a cada una de las tres formulaciones, usando dos concentraciones distintas de cada una de ellas y se midió la oxidación basal.

10 Los datos son expresados como medias aritméticas \pm la desviación estándar (DE). Los niveles de significatividad son: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) and **** ($p < 0.0001$) en comparación con el cultivo control que no fue tratado con ninguna composición.

15 Como se puede observar en la Figura 1 tanto la formula 1B como 2B redujeron de manera significativa el porcentaje de oxidación de los queratinocitos (HaCaT) en comparación con las células sin tratar (barra negra). Por el contrario, la formula 3B no fue capaz de reducir la oxidación celular basal a ninguna de las dos concentraciones estudiadas.

20 Cuando comparamos las fórmulas entre sí no se observan diferencias significativas entre el efecto antioxidante de las fórmulas 1B y 2B pero sí con la 3B, a ambas concentraciones.

25 En otro test, cuyos resultados se muestran en las Figuras 2A, 2B y 2C, se midió la actividad antioxidante de las tres formulaciones de la Tabla 1 sobre queratinocitos humanos cultivados *in vitro* y expuestos a radiación ultravioleta tipo B (UVB), con intensidades de 800 y 1200 J/m².

30 Los datos son expresados como medias aritméticas \pm la desviación estándar. Los niveles de significatividad son: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) and **** ($p < 0.0001$) en comparación con el cultivo control que recibió la misma intensidad de radiación y que no fue tratado con ninguna composición.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de inhibición de la oxidación en comparación con su respectivo control.

Fórmula	Dosis UVB (J/m ²)	Concentración de fórmula del tratamiento (µg/mL)	
		100	200
1B	800	75.8	103.4
	1200	78.1	97.5
2B	800	55.3	63.4
	1200	52.8	69.9
3B	800	41.0	56.8
	1200	43.3	49.9

35 Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la oxidación en comparación con su respectivo control.

Todas las fórmulas testadas inhibieron de manera significativa la oxidación provocada por la radiación UV tipo B. Sin embargo, fue la fórmula 1B a una concentración de 200 µg/mL la que inhibió, casi por completo, la oxidación provocada por la radiación UV, en un porcentaje significativamente mayor que las fórmulas 2B y 3B.

En la Figura 3 se muestran los resultados del estudio de la actividad anti-inflamatoria de las tres formulaciones de la Tabla 1. En este test se midió la cantidad de IL-8, es decir interleucina 8, producida por queratinocitos humanos expuestos a radiación UVB de intensidad 300 J/m² y tratados con las composiciones de la Tabla 1 con una concentración de 10 µg/mL.

Los datos son expresados como medias aritméticas ± la desviación estándar. Los niveles de significatividad estadística son: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) and **** (p<0.0001) en comparación con el cultivo control que recibió la misma intensidad de radiación y que no fue tratado con ninguna composición.

La interleucina 8 es una citoquina que producen los queratinocitos y otras células y que está asociada a los procesos inflamatorios.

En la Figura 3 se observa que tanto la fórmula 1B como 2B redujeron de manera significativa el porcentaje de inflamación (expresión IL-8 alfa) de los queratinocitos (HaCaT) en comparación con las células sin tratar (barra negra) tanto cuando estas fueron incubadas durante y post irradiación como cuando fueron incubadas sólo post irradiación.

Por el contrario, la fórmula 3B sólo fue capaz de inhibir significativamente la producción de la citoquina IL-8 alfa cuando los queratinocitos fueron incubados con la fórmula después de la radiación.

La comparación de las fórmulas entre sí no muestra diferencias significativas entre las fórmulas 1B y 2B.

En las Figuras 4A, 4B y 4C se muestran los resultados del estudio de la actividad blanqueante de las fórmulas de la Tabla 1. Los gráficos representan el porcentaje de melanina producido por melanocitos tratados con las fórmulas de la Tabla 1 en comparación con los melanocitos sin tratar, en las mismas condiciones de cultivo.

Los datos son expresados como medias aritméticas ± la desviación estándar. Los niveles de significatividad son: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) and **** (p<0.0001) en comparación con el cultivo control de melanocitos que no fue tratado con ninguna composición.

Tanto la fórmula 2B como la 3B a las concentraciones testadas no fueron capaces de inhibir la producción de melanina de forma estadísticamente significativa, a las concentraciones testadas. Sólo la fórmula 1B presentó dicha capacidad y por tanto cumple un requisito importante a la hora de obtener una composición para su uso en el tratamiento de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel, ya que uno de los efectos descritos es el aumento de la pigmentación en personas expuestas a una contaminación crónica del aire.

Determinación del contenido en flavonoides de los extractos

5

Análisis con HPLC de los compuestos fenólicos de los extractos de Lippia citriodora y olivo

10 - Preparación estándar de la curva de calibrado
Las curvas de calibrado se preparan con distintas concentraciones de estándares de oleuropeina, hidroxitirosol y verbascósido. La pureza asignada a cada estándar es la que aparece en el certificado de análisis del estándar.

15 - Preparación de las muestras secas
Las muestras se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 5 mg / ml. La disolución resultante se filtra con una membrana de nylon de 0,45 µm.

20 - Método de HPLC
Columna: LiChrospher 100-C18 (250x4.0 mm i.d.) con un tamaño de partícula medio de 5 µm. Flujo de fase móvil: 1 ml/min. Temperatura: 30 °C. Volumen de inyección: 20 µl.

25 - Fase móvil. Disolvente A: ácido acético 2.5 % en peso.
Disolvente B: Acetonitrilo
Gradiente:

Tiempo	Disolvente A	Disolvente B
0	9	5
20	7	25
40	5	50
50	2	80
60	9	5

El cambio en absorbancia se monitoriza a 280 nm y a 330 nm.

35 La oleuropeina, el hidroxitirosol y el verbascósido se identifican por comparación de los tiempos de retención con el estándar correspondiente. La concentración se calcula por interpolación en la curva de calibrado.

Análisis con HPLC de los compuestos fenólicos del extracto de romero. Diterpenos

- Preparación del estándar del ácido carnósico CA

Se disuelve el estándar en DMSO en una proporción de 0.2 mg por ml. La disolución resultante se filtra con una membrana de nylon de 0,45 µm.

- 5 - Preparación de las muestras secas
Las muestras se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 1 mg / ml. La disolución resultante se filtra con una membrana de nylon de 0,45 µm.

- 10 - Método de HPLC
Columna: LiChrospher 100-C18 (250x4.0 mm i.d.) con un tamaño de partícula medio de 5 µm. Flujo de fase móvil: 1 ml/min. Temperatura: 30 °C. Volumen de inyección: 20 µl.

- 15 - Fase móvil. 500 ml de agua, 935 ml de acetonitrilo, 2.5 ml ácido fosfórico, 0.16 g de sal de sodio de EDTA dihidratada.

El cambio en absorbancia se monitoriza a 230 nm con un detector UV-Vis DAD.

- 20 - Cálculos. El ácido carnósico (CA) y el carnosol (COL) fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los estándares correspondientes.

% ácido carnósico: $(ArCAPb/ArCAStd) \times (Wt Std/Wt Pb) \times \text{pureza del estándar de CA}$

25 Donde:

ArCAPb: área del pico de CA en la muestra.

ArCAStd: área del pico de CA del estándar.

Wt Pb: peso de la muestra en mg.

30 Wt Std: peso de estándar de CA en mg.

% carnosol = $(ArCOLPb/ArCAStd) \times (Wt Std/Wt Pb) \times \text{pureza del estándar de CA} \times 0.90$

35 Donde:

ArCOLPb: área del pico de COL en la muestra.

ArCAStd: área del pico de CA del estándar.

Wt Pb: peso de la muestra en mg.

Wt Std: peso de estándar de CA en mg.

40

Análisis con HPLC de los compuestos fenólicos del extracto de *Sophora japonica*. Quercetina.

- Preparación del estándar de la quercetina
Se disuelve el estándar en DMSO en una proporción de 0.2 mg por ml. La disolución resultante se filtra con una membrana de nylon de 0,45 µm.

5

- Preparación de las muestras secas
Las muestras se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 1 mg / ml. La disolución resultante se filtra con una membrana de nylon de 0,45 µm.

10

- Método de HPLC
Columna: LiChrospher 100-RP18 (250x4.0 mm i.d.) con un tamaño de partícula medio de 5 µm. Flujo de fase móvil: 1.3 ml/min. Temperatura: 50 °C. Volumen de inyección: 20 µl.

15

- Fase móvil. Metanol:acetonitrilo: ácido acético: agua en proporciones 10:10:5:75. Método isocrático.

El cambio en absorbancia se monitoriza a 259 nm con un detector UV-Vis DAD.

20

La quercetina se identifica por comparación de los tiempos de retención con el estándar correspondiente. La concentración se calcula por interpolación en la curva de calibrado.

25 **EJEMPLO 2. Estudio *in vitro* de la actividad antioxidante y protectora celular de la composición 1B contra los efectos de la radiación ultravioleta y partículas pulverulentas urbanas sobre queratinocitos humanos**

30 Los organismos vivos están expuestos a los contaminantes del aire y éstos tienen unos importantes efectos sobre la piel humana. Los contaminantes del aire se presentan como sólidos, líquidos, gases y materia particulada (PM). Éstos son absorbidos directamente por la piel hasta alcanzar los tejidos subcutáneos o a través de los folículos capilares o de las células sudoríferas/sebáceas. La rápida urbanización y el gran incremento del consumo energético en todo el mundo
35 exponen a los humanos a cantidades crecientes de contaminación ambiental del aire. La piel, que constituye el mayor y más externo órgano del cuerpo, actúa como una barrera física, química e inmunológica contra estos factores ambientales.

40 Los contaminantes del aire ejercen un efecto nocivo sobre la piel mediante un aumento del estrés oxidativo que se actúa contra a las defensas antioxidantes de la piel. Se generan radicales libres y especies reactivas oxigenadas que interactúan con las membranas plasmáticas ricas en lípidos para iniciar la cascada de reacciones de peroxidación de lípidos. Las especies reactivas oxigenadas también
45 estimulan la liberación de mediadores pro-inflamatorios, lo que resulta en la acumulación de neutrófilos y otras células fagocíticas que a su vez generan más radicales libres, lo que resulta en un círculo vicioso. Además, los contaminantes del aire inducen graves alteraciones de la función normal de los lípidos, ácido

desoxirribonucleico y/o proteínas de la piel humana mediante daño oxidativo, provocando envejecimiento extrínseco de la piel, condiciones inflamatorias o alérgicas de la piel, tales como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis, acné y cáncer de piel. De la misma forma, la piel humana está expuesta repetidamente a radiación ultravioleta que influye en la función y supervivencia de muchos tipos de células y se considera el principal factor causante de la inducción del envejecimiento de la piel. La exposición aguda de la piel humana a la radiación UV causa quemaduras de sol, pigmentación alterada, inflamación, supresión de la inmunidad y daño del tejido conectivo cutáneo.

Estudios recientes han demostrado que la luz solar y la contaminación del aire pueden producir sinérgicamente estrés en la piel, acelerar el estrés oxidativo (mayor producción de especies reactivas oxigenadas ROS, peroxidación y peroxidación de escualeno), incrementar el agotamiento de vitamina E del estrato córneo de la piel, aumentar la respuesta inflamatoria e incluso aumentar el riesgo de cáncer de piel. Estudios recientes demuestran que la radiación ultravioleta de tipo A (UVA) combinada con contaminantes del aire (incluyendo el humo del tabaco) incrementa significativamente el riesgo de cáncer de piel.

También se destaca que los contaminantes del aire agravan el daño provocado por la luz y que existe una necesidad de estrategias específicas para el cuidado de la piel en zonas con mucha contaminación ambiental del aire.

En este ejemplo, cultivos de queratinocitos humanos fueron expuestos a material pulverulento urbano y radiación UVA para investigar la respuesta celular al estrés oxidativo inducido y comprobar el potencial de la composición 1B para contrarrestar el daño inducido.

Las células vivas fueron contadas en una cámara Bürker bajo microscopio. Las células HaCaT fueron cultivadas durante la noche en una placa de 96 pocillos con medio de cultivo. Tras 24 horas, se retiró el medio de cultivo y fue sustituido por un nuevo medio de cultivo suplementado con 400 µg/ml de materia pulverulenta urbana ("Urban Dust" UD) y composición 1B en cantidades de 0.005 % y 0.001 % en peso.

Se evaluó la acumulación de especies reactivas oxigenadas (%ROS) en un replicado biológico, con ocho replicados experimentales (tanto en el tratamiento como en los controles), tras ser expuestos a materia pulverulenta urbana. Tras 24 horas de incubación, el medio de cultivo de todos los pocillos fue sustituido por una mezcla PBS y un master de detección de ROS. Posteriormente, las muestras fueron irradiadas con UVA durante 25 minutos a una intensidad de 6.9 J/cm². Los controles no irradiados fueron mantenidos en la oscuridad durante este tiempo. Tras dos horas de la adición de la mezcla de detección de ROS, se midió la concentración de ROS de las muestras mediante espectrometría, incluyendo dos pocillos control sin células, para obtener un control blanco. Las ROS intracelulares acumuladas reaccionan con un sensor fluorogénico ubicado en el citoplasma, resultando en un producto fluorométrico en cantidades proporcionales a la cantidad de ROS presente. La cuantificación fluorométrica fue medida a una excitación de 490 nm de longitud de onda y a una emisión de 525 nm de longitud de onda.

En paralelo, se realizó un análisis de viabilidad celular mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (*MTT*) para evaluar la mortalidad celular inducida por el material pulverulento urbano y la radiación UVA, con objeto de normalizar los niveles de ROS medidos a la cantidad de células vivas en cada una de las condiciones específicas. En los ensayos MTT se siguió el protocolo no. 17 del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM).

En los ensayos de viabilidad celular, los resultados muestran que el tratamiento con la composición 1B durante 24 horas presenta citotoxicidad significativa en células HaCaT a concentraciones igual o superiores a 0.01 en peso, mientras que no se observaron efectos significativos a concentraciones igual o menores de 0.0025 % en peso, en comparación con la muestra control. De acuerdo con los resultados, las concentraciones 0.001 % en peso y 0.005 % en peso fueron seleccionadas para estudios posteriores.

Los resultados de este ensayo indican que el material pulverulento urbano junto con la radiación UVA incrementaron el estrés oxidativo en 13.2 ± 0.8 veces, en comparación con la muestra control sin tratar. Las muestras que fueron tratadas con la composición 1B (ZeroPollution) a concentraciones 0.001 % y 0.005 % en peso redujeron significativamente los niveles de ROS en 25.4 ± 7.2 % y 29.3 ± 6.2 , respectivamente. Al sustraer los valores de base de estrés oxidativo a todas las muestras, los resultados indican que el tratamiento con la composición 1B a concentraciones de 0.001 % y 0.005% en peso protege las células incubadas de los efectos oxidativos de la materia pulverulenta urbana y de la radiación UVA, reduciendo el estrés oxidativo en 27.3 ± 7.8 % y $31.5 \pm 6.7\%$, respectivamente, en comparación con la muestra control expuesta a dichos factores ambientales. Este hecho se ve reflejado en la Figura 5.

El gráfico de barras de la Figura 5 representa la acumulación de ROS en las muestras de queratinocitos humanos (HaCat) tratados con la composición 1B (ZeroPollution) a concentraciones de 0.001 % y 0.005 % en peso y sometidos durante 24 horas a exposición de material pulverulento urbano (Urban Dust UD) a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ y posteriormente irradiados con UVA durante 25 minutos. Los datos han sido normalizados con respecto al control expuesto a la misma cantidad de UD y radiación UVA.

* Representa la significatividad estadística con un valor de $p < 0.05$. ** Representa la significatividad estadística con un valor de $p < 0.01$. *** Representa la significatividad estadística con un valor de $p < 0.001$. **** Representa la significatividad estadística con un valor de $p < 0.0001$.

EJEMPLO 3. Evaluación *ex vivo* de la actividad anti-contaminación del aire de la composición 1B (ZeroPollution) en explantes vivos de piel humana.

El objetivo de este estudio es la evaluación de la actividad anti-contaminación del aire de la composición 1B de la Tabla 1 sobre explantes vivos de piel humana tras haber sido tratados con una mezcla de contaminantes. Tras el tratamiento *ex vivo* de

los explantes con la composición 1B (ZeroPollution) y una disolución de metales pesados, hidrocarburos y partículas de diésel, la actividad anti-contaminación del aire fue evaluada mediante: ensayo bioquímico de malonaldehído, inmunotinción del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), inmunotinción de metalotioneína MT-1H, ensayo cuantitativo bioquímico de interleucina-1 alfa (IL-1 α)

Se obtuvieron 19 explantes de piel humana de un diámetro medio de 12 mm mediante abdominoplastia en una mujer caucasiana de 56 años. Los explantes fueron mantenidos vivos en un medio de cultivo (medio para explantes BIO-EC) en condiciones adecuadas de atmósfera, temperatura y humedad.

El día 0, los explantes fueron colocados en 2 mL de medio de cultivo con y sin el producto (composición 1B) a una concentración de 200 μ g/mL. Las muestras de control no recibieron ningún tratamiento. El medio de cultivo (con y sin el producto a testar) fue renovado con medio fresco de cultivo el primer día con 1 mL por pocillo y el segundo día con 2 mL por pocillo tras la exposición a los contaminantes.

El segundo día, los explantes fueron colocados en una placa de cultivo especial para explantes cutáneos y colocados en el sistema PolluBox®. Se vaporizaron 3 mL de disolución de contaminantes (mezcla de metales pesados, hidrocarburos y partículas diésel) durante una hora y media. PolluBox® permite vaporizar contaminantes en forma de nube para contactar solamente la superficie de la piel y así replicar las condiciones fisiológicas tan fielmente como sea posible.

Durante la exposición, las muestras de control (no expuestas a contaminación) fueron colocadas en una placa de cultivo de 12 pocillos con 900 μ l de una disolución de HBBS por pocillo. Al final de la exposición, todos los explantes fueron colocados de nuevo en el incubador en condiciones de cultivo estándar, en 2 mL de BEM fresco por pocillo.

En el día 0 (D0), los tres explantes del lote T0 fueron recogidos y cortados en dos partes. Una parte fue colocada en formalina tamponada y la otra parte fue congelada a -80 °C.

El día 3, tres explantes de cada lote fueron recogidos y tratados de la misma forma que los explantes del día 0, y 2 mL de medio de cultivo de cada lote fueron recogidos y almacenados a -80 °C para los ensayos de MDA y IL1 α .

Procesado histológico: tras la fijación durante 24 horas en formalina tamponada, las muestras fueron deshidratadas e impregnadas con parafina con el aparato procesador de tejidos Leica TP1020. Las muestras fueron fijadas con la estación de inclusión en parafina Leica EG 1160. Se efectuaron disecciones de 5 μ m de espesor con un micrótopo de tipo Minot Leica RM 2125, y las disecciones se montaron en placas histológicas de vidrio Superfrost®.

Las observaciones al microscopio se realizaron con un microscopio Leica DMLB o un Olympus BX43. Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara numérica Olympus DP72 con el software de almacenamiento CellD y los análisis de las imágenes se hicieron en de 9 a 12 imágenes por cada lote.

Ensayo bioquímico de MDA

El día 3, se midió el MDA contenido en el medio de cultivo. Se analizaron 4 explantes por lote.

El ensayo de MDA se realizó con un método mejorado del ensayo TBARs. El MDA fue detectado en medio HBSS (Solución Salina de Hank's) mediante adición de una disolución de TBARs (ácido tiobarbitúrico, ácido hidroclicórico y ácido tricloroacético) e incubado en un baño de agua a 80 °C durante 15 minutos. El MDA fue extraído mediante extracción líquido/líquido con butanol. El MDA en butanol fue medido por espectrofluorimetría a una longitud de onda de excitación de 515 nm y de emisión de 550 nm, utilizando un lector de micro-placas Tecan Infinite M200 Pro. La concentración de MDA es expresada en nmoles de MDA/ ml de medio de cultivo.

Inmunotinción de AhR

La inmunotinción de AhR fue realizada sobre disecciones parafinadas con un anticuerpo monoclonal anti-AhR (Thermo Scientific, ref. MA1-514, clon RPT1), diluido 1:50 en PBS-BSA 0,3%-Tween 20 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente con el Sistema Vectastain RTU Universal VECTOR estreptavidina/biotina y revelado con VIP (laboratorios Vector, ref. SK4600), que es un sustrato violeta de peroxidasa.

Inmunotinción de MT-1H

La inmunotinción de MT-1H se realizó sobre disecciones parafinadas con un anticuerpo monoclonal anti-MT1H (Dako, ref. M0639, clon E9), diluido 1:200 en PBS-BSA 0,3%-Tween 20 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente con el Sistema Vectastain RTU Universal VECTOR estreptavidina/biotina y revelado con VIP (laboratorios Vector, ref. SK4600), que es un sustrato violeta de peroxidasa.

Ensayo bioquímico de IL1- α

El ensayo bioquímico de IL1- α se llevó a cabo con el kit ELISA de IL1- α humano (Cayman). En concordancia con las indicaciones del suministrador del kit, el medio de cultivo y el standard de IL1- α fueron incubados durante la noche a 4 °C con un anticuerpo conjugado de acetilcolinesterasa:Fab' (AChE/Fab'), el cual se une selectivamente a IL-1 α en pocillos que contienen anticuerpo IL1- α inmovilizado. Tras el lavado de los pocillos, la reacción fue revelada con una disolución que contenía el sustrato AChE durante 40 minutos. Se midió la absorbancia 412 nm con el lector de micro-placas M200Pro Tecan y el software Magellan7.

Resultados

MDA

El malondialdehído (MDA) es un producto que se forma en la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. Los radicales libres inducidos por el estrés oxidativo (UVA, contaminantes, metales pesados, pesticidas...) degradan los lípidos

poliinsaturados y generan hidroperóxidos, lo cual resulta en la formación de radicales intermedios y aldehídos, particularmente MDA.

5 El malondialdehído es uno de varios productos finales de bajo peso molecular formados por la descomposición de ciertos productos primarios y secundarios de la peroxidación de los lípidos (25).

10 Como se puede observar en la Figura 6, en el día 3, la composición 1B reduce significativamente en un 103 %* ($p < 0.05$) el aumento de MDA producido por la mezcla de contaminantes. Esto significa que la composición 1B inhibe totalmente el estrés oxidativo producido por los contaminantes.

IL1-alpha

15 IL1-alpha participa en la respuesta inmunológica y en los procesos inflamatorios. La concentración de interleucinas liberadas en el medio de cultivo se usa para medir la respuesta inflamatoria inducida por la exposición a los contaminantes, para poder evaluar así la actividad protectora de la composición 1B.

20 Como se observa en la Figura 7, la composición 1B reduce significativamente en un 82 %* ($p < 0.05$) la cantidad de IL1-alpha liberada tras la exposición a la mezcla de contaminantes.

Expresión de AhR

25 El receptor aril-hidrocarburo (AhR) es un factor transcripcional implicado en la respuesta molecular consiguiente a la exposición a diversos compuestos, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), ozono y polifenoles de las plantas (26, 22). En circunstancias normales, AhR está unido en el citoplasma a un complejo proteico compuesto por HSP90, c-scr y otras proteínas acompañantes. En presencia de los contaminantes mencionados anteriormente, AhR se disocia del complejo proteico, es translocado al núcleo donde se dimeriza con ARNT sobre secuencias promotoras que están activadas específicamente en respuesta a xenobióticos. Los genes objetivo de AhR son citocromo P450 (CYP) 1^a1, CYP1A2 y CYP1B1. Paralelamente, los contaminantes del aire, incluyendo los hidrocarburos policíclicos aromáticos, son capaces de estimular un aumento de la actividad ligante al DNA de NF-kB, que a su vez es capaz de estimular la expresión del gen que codifica AhR
35 (27, 28).

El AhR es expresado por varios tipos de células, incluyendo los queratinocitos, los melanocitos, las células Langerhans y las células T (29).

40 Uno de los mecanismos por el cual la contaminación del aire produce daños en la piel es mediante la activación del receptor AhR, como se ha descrito anteriormente.

45 Como se observa en la Figura 8, el día 3 la exposición a los contaminantes induce un aumento significativo del 60 %** ($p < 0.01$) de la expresión de AhR. La aplicación de la formulación 1B produce un descenso significativo del 87%** ($p < 0.01$) en la

expresión del AhR, comparado con los explantes expuestos solamente a los contaminantes.

5

10

Expresión de MT-1H

La proteína metalotioneína (MT-1H) se usa como marcador de la exposición a metales pesados y estrés oxidativo.

15

Las metalotioneínas (MTs) son un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en los tejidos que regulan el metabolismo de los metales, la captura de los radicales libres y también participan en reacciones inmunológicas. La metalotioneína 1 (MT-1H) es una proteína única estable al calor de bajo peso molecular (6 kDa) sin aminoácidos aromáticos. Debido a su gran afinidad a unirse a y ser inducida por metales esenciales como el zinc y el cobre y otros metales nocivos como el cadmio y el mercurio, se cree que juega un papel importante en la función homeostática de metales esenciales y en la detoxificación de metales tóxicos.

20

Como se observa en la Figura 9, el marcador MT-H1 no aumentó a pesar de la presencia de contaminantes, lo que sugiere que la composición 1B muestra un efecto protector sobre la piel.

25

El día 3 de exposición, los contaminantes provocan un aumento del 63% ** ($p < 0.01$) en la expresión de MT-H1. La aplicación de la composición 1B produce una reducción significativa de 40 % ** ($p < 0.01$) en la expresión de MT-H1, comparada con los explantes expuestos únicamente a los contaminantes.

30

EJEMPLO 4. Determinación de la toxicidad oral aguda de la composición 1B (ZeroPollution).

35

El objetivo de este estudio es evaluar la toxicidad oral aguda de la composición 1B (ZeroPollution) mediante el método "Acute Toxic Class Method" (limit test, OECD guideline no. 423) aplicado a ratas hembra del tipo Sprague-Dawley. El nivel de dosis inicial fue de 2000 mg/kg de peso corporal, ya que se consideró probable que no produciría muertes. Éste método permite clasificar la composición 1B (ZeroPollution) según el Sistema Global Armonizado (GHS) para la determinación de la toxicidad de productos químicos.

40

45

Resumen del estudio. El "limit test" está basado en un procedimiento realizado paso a paso con una dosis inicial de 2000 g/kg de peso corporal, llevado a cabo con 6 animales en dos pasos (tres animales por paso). Las dosis siguientes hubieran sido 300, 50 y 5 mg/kg de peso corporal. Tras un periodo de observación de 14 días, la mortalidad debida a la composición 1B administrada en el primer paso se usa para

decidir si se continua con la siguiente dosis en un paso siguiente y para clasificar la sustancia de acuerdo con una clasificación internacional. La administración de la siguiente dosis no se realiza hasta que se ha determinado la tasa de supervivencia de los animales administrados con la dosis previa.

5

Como ninguno de los animales murió durante el periodo de observación, se puede concluir que la composición 1B (ZeroPollution) puede ser clasificada en la Categoría 5 o “Sin clasificar” del Sistema de Clasificación Global Armonizado para sustancias químicas y mezclas.

10

REFERENCIAS

15

(1) Krutmann J. et al. Environmentally induced (extrinsic) skin aging. *Hautarzt*.2016 Feb; 67(2):99-102.

20

(2) Morgenstern, V. et al. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 1331–1337 (2008).

25

(3) Song, S. et al. Acute health effects of urban fine and ultrafine particles on children with atopic dermatitis. *Environ. Res.* 111, 394–399 (2011).

30

(4) Kim, J. et al. Symptoms of atopic dermatitis are influenced by outdoor air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 495–499 (2013).

35

(5) Van Den Bogaard, E.H. et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 123, 917–927 (2013).

40

(6) Kim, H.O., Kim, J.H., Chung, B.Y., Choi, M.G. ; Park, C.W. Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp. Dermatol.* 23, 278–281 (2014).

45

(7) DiMeglio, P. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* 40, 989–1001 (2014).

(8) Jean Krutmann, Dominique Moyal, Wei Liu, Sanjiv Kandahari, Geun-Soo Lee, Noppakun Nopadon, Leihong Flora Xiang y Sophie Seité. “Pollution and acne: is there a link?” *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. May 2017

(9) Ju Q, Zouboulis CC, Xia L. Environmental pollution and acne: Chloracne. *Dermato-endocrinology*. 2009;1(3):125-128

(10) Vierkoler A et al. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging, *J. Invest. Dermatol.* 130 (12) (2010) 2719–2726.

- (11) Hüls A et al. Traffic-Related Air Pollution Contributes to Development of Facial Lentiginosities: Further Epidemiological Evidence from Caucasians and Asians. J. Invest. Dermatol. 2016 May; 136(5):1053-6.
- 5 (12) Weng, Zuyi et al. Quercetin Is More Effective than Cromolyn in Blocking Human Mast Cell Cytokine Release and Inhibits Contact Dermatitis and Photosensitivity in Humans. Ed. Christian Taube. *PLoS ONE* 7.3 (2012): e33805. *PMC*. Web. 15 Sept. 2017.
- 10 (13) Sim, H.S.S. and S.S., Acetoside inhibits α -MSH- induced melanin production in B16 melanoma cells by inactivation of adenyl cyclase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009. 61: p. 1347-1351.
- 15 (14) Young-Ok Sona, S.-A.L.e.a., Acteoside inhibits melanogenesis in B16F10 cells through ERK activation and tyrosinase down-regulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011. 63: p. 1309-1319.
- (15) Mancebo SE, Wang SQ. Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015 Dec;29(12):2326-32.
- 20 (16) Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.*
- (17) Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem.* 2010 Nov;391(11):1235-48.
- 25 (18) Krutmann J, Jux B, Luecke S, Fritsche E, Abel J, Essel C, Rannug A. Involvement of arylhydrocarbon receptor (AhR-) signaling in skin melanogenesis. *J Invest Dermatol* 2008;128:S22
- 30 (19) Morita A, Torii K, Maeda A, Yamaguchi Y. Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2009 Aug;14(1):53-5.
- 35 (20) Murphy KA, Villano CM, Dorn R, White LA. Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25284-93.
- 40 (21) Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 2010 Dec;23(6):828-33.
- 45 (22) Afaq F, Zaid MA, Pelle E, Khan N, Syed DN, Matsui MS, Maes D, Mukhtar H. Aryl hydrocarbon receptor is an ozone sensor in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009 Oct;129(10):2396-403.

(23) Ono Y, Torii K, Fritsche E, Shintani Y, Nishida E, Nakamura M, Shirakata Y, Haarmann-Stemmann T, Abel J, Krutmann J, Morita A. Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp. Dermatol.* 2013 May 22(5):349-53.

5

(24) Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura, T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, Yamamoto M. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol.* 2017 Jan;18(1):64-73

10

(25) Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(6):515-40.

15

(26) Haarmann-Stemmann T, Abel J, Fritsche E, Krutmann J. The AhR-Nrf2 pathway in keratinocytes: on the road to chemoprevention. J Invest Dermatol. 2012 Jan;132(1):7-9.

20

(27) Champion S. *et al.*, Activation of the NFκB Pathway Enhances AhR Expression in Intestinal Caco-2 Cells, *ISRN Toxicology Volume 2013 (2013).*

25

(28) Tauchi *et al.*, 2005. Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions, *Molecular and cellular biology*, Nov. 2005, p. 9360–9368.

30

(29) Furue *et al.*, 2014. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis *Arch Dermatol Res.* 306:769–779

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su uso en el tratamiento de los efectos de la contaminación del aire sobre la piel, dicha composición comprendiendo diterpenos, oleuropeina, verbascósido, quercetina e hidroxitirosol.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1 que comprender una proporción individual de aproximadamente 2.5 a 5 en peso de diterpenos, oleuropeina, verbascósido y quercetina a hidroxitirosol, respectivamente.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2 en la que la proporción en peso de diterpenos a hidroxitirosol es alrededor de 3, la proporción en peso de oleuropeina a hidroxitirosol es alrededor de 3, la proporción en peso de verbascósido a hidroxitirosol es alrededor de 4.5 y la proporción en peso de quercetina a hidroxitirosol es alrededor de 2.5.
- 20 4. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende un extracto de *Sophora japonica* con un contenido mínimo de 40% en peso de quercetina.
- 25 5. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende ácido carnósico como diterpeno principal.
- 30 6. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende un extracto de romero con un contenido mínimo de 15% en peso de diterpenos.
- 35 7. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende un extracto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeina.
- 40 8. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende un extracto de olivo con un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol.
- 45 9. Composición según cualquier reivindicación anterior que comprende un extracto de *Lippia citriodora* con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido.
10. Composición según la reivindicación 9 cuando depende de las reivindicaciones 4, 6, 7 y 8 que comprende alrededor de un 32 % en peso de extracto de romero con un contenido mínimo de 15 % en peso de diterpenos, alrededor de un 30 % en peso de extracto de hojas o fruto de olivo con un contenido mínimo de 16 % en peso de oleuropeina y un contenido mínimo de 5 % en peso de hidroxitirosol, alrededor de un 28 % en peso de extracto de *Lippia citriodora* con un contenido mínimo de 25 % en peso de verbascósido y alrededor de un 10 % en peso de extracto de *Sophora japonica* con un contenido mínimo de 40% en quercetina.

11. Composición según las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la prevención del envejecimiento prematuro de la piel asociada a los efectos de la contaminación del aire.
- 5 12. Dosis de entre 0.1 a 1000 miligramos de la composición según las reivindicaciones 10 ó 11 cuando depende de la reivindicación 10.
13. Dosis de 250 miligramos de la composición de la composición según las reivindicaciones 10 ó 11 cuando depende de la reivindicación 10.
- 10 14. Formulación para administración por vía parenteral, transdermal, oral o tópica que contiene la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15 15. Formulación según la reivindicación 14 presentada en una dosis de entre 0.1 a 1000 miligramos de la composición según las reivindicaciones 10 ó 11 cuando depende de la reivindicación 10.
- 20 16. Formulación según la reivindicación 14 presentada en una dosis de 250 miligramos de la composición según las reivindicaciones 10 ó 11 cuando dependen de la reivindicación 10.

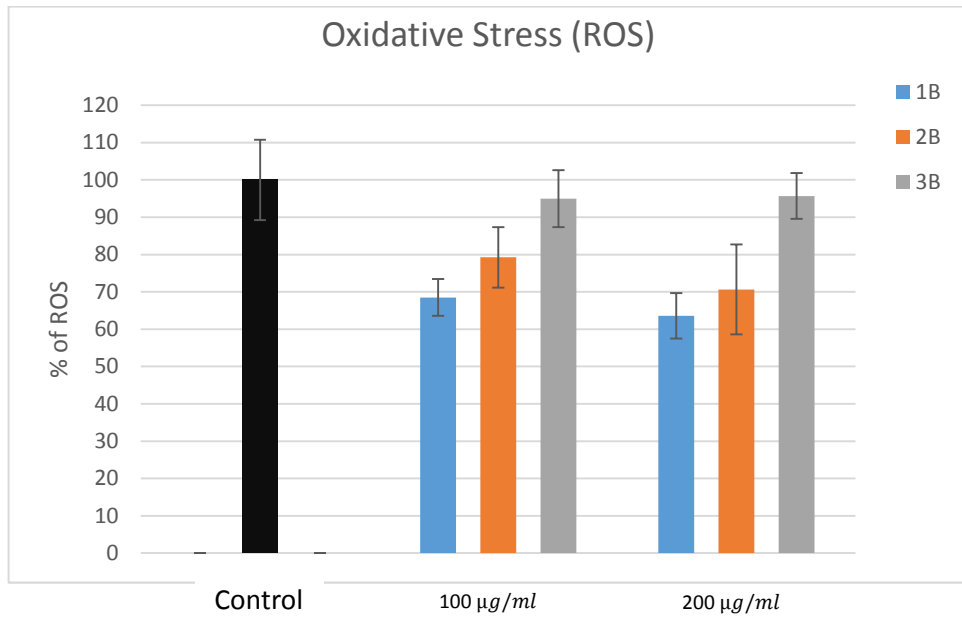


Figura 1

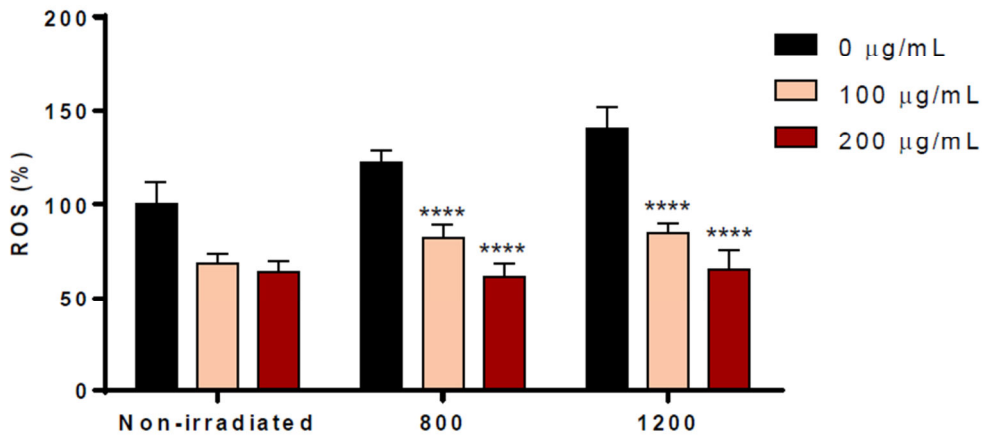


Figura 2A

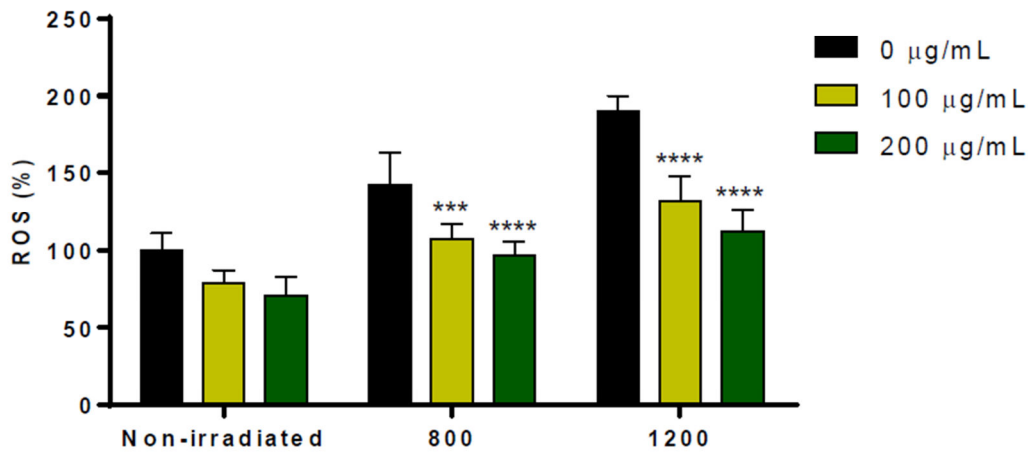


Figura 2B

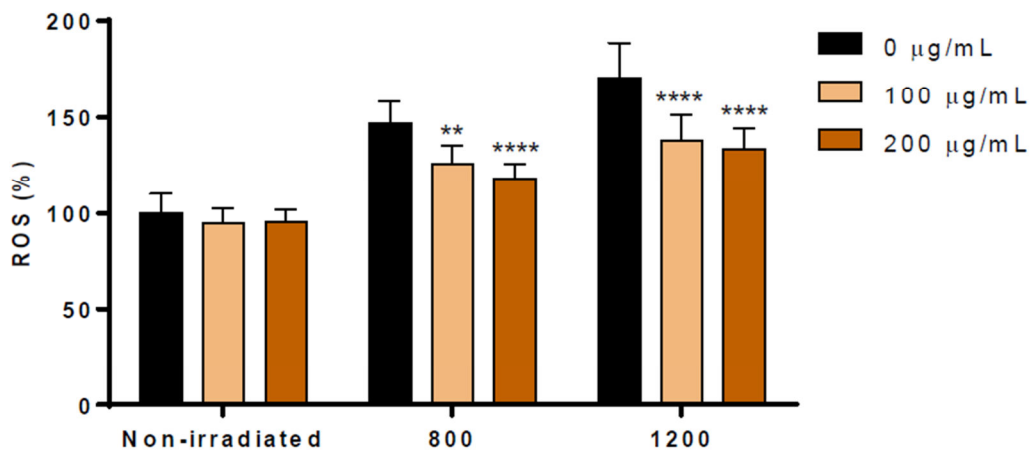


Figura 2C

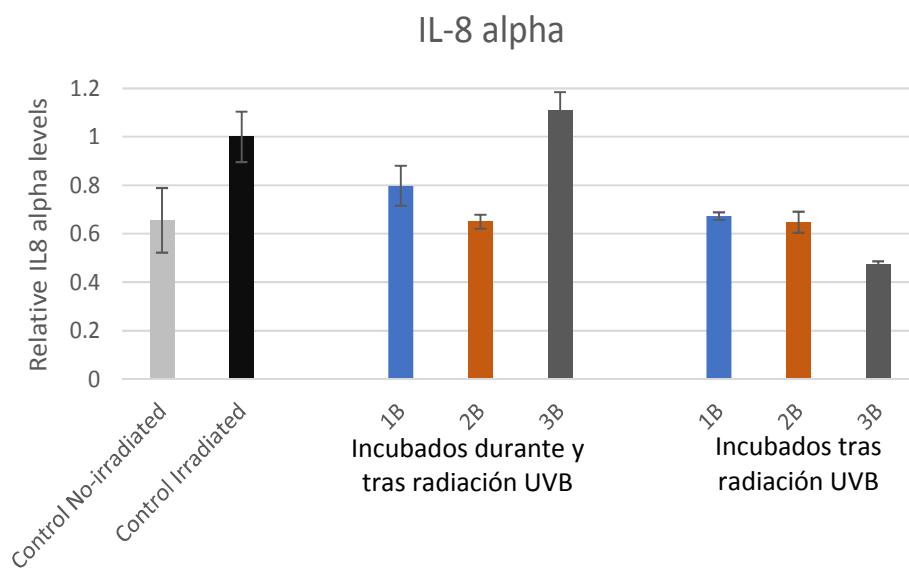


Figura 3

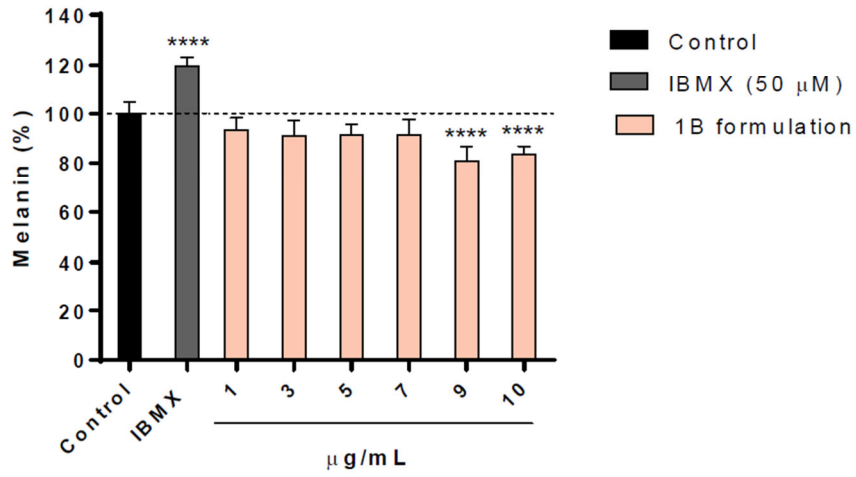


Figura 4A

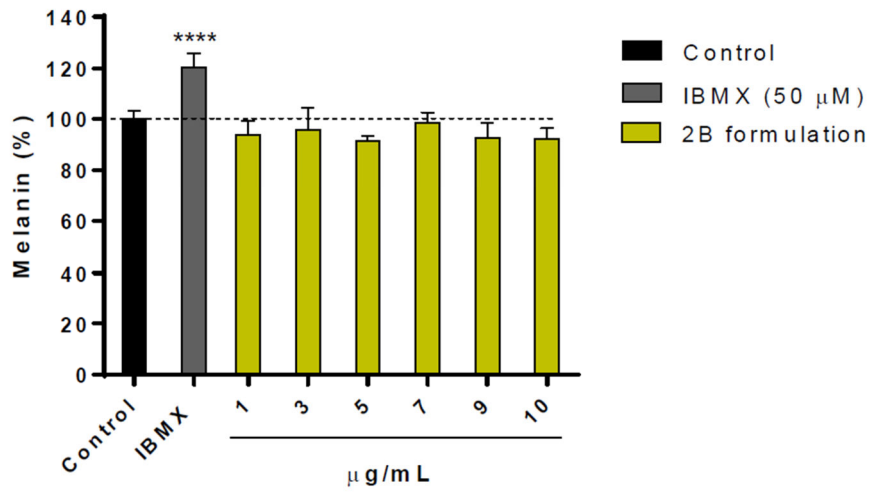


Figura 4B

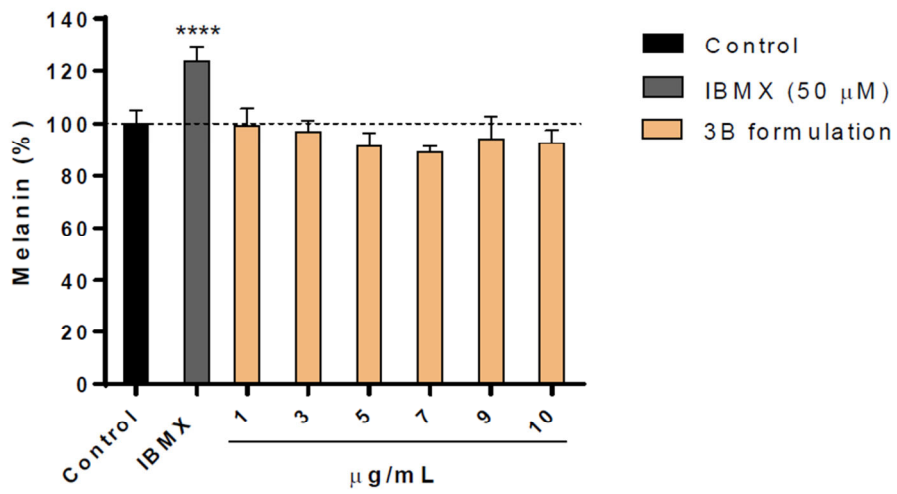


Figura 4C

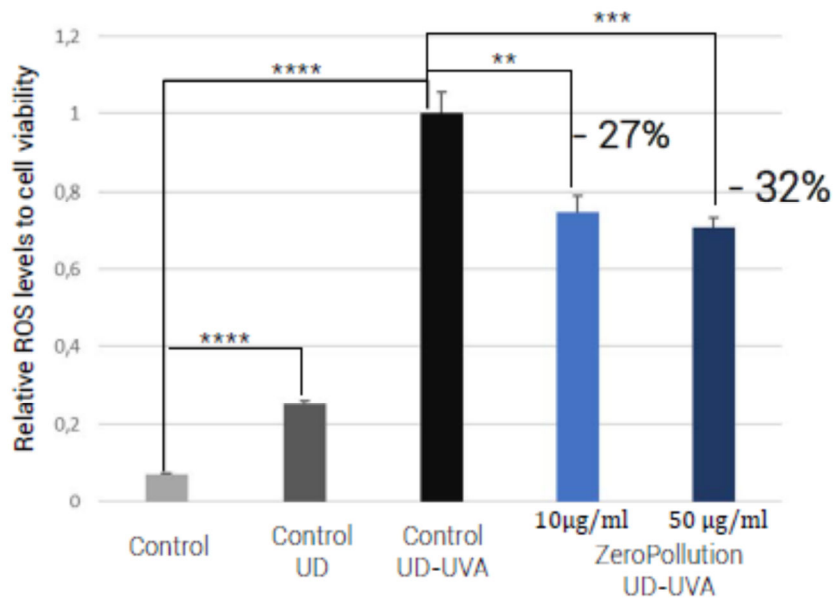


Figura 5

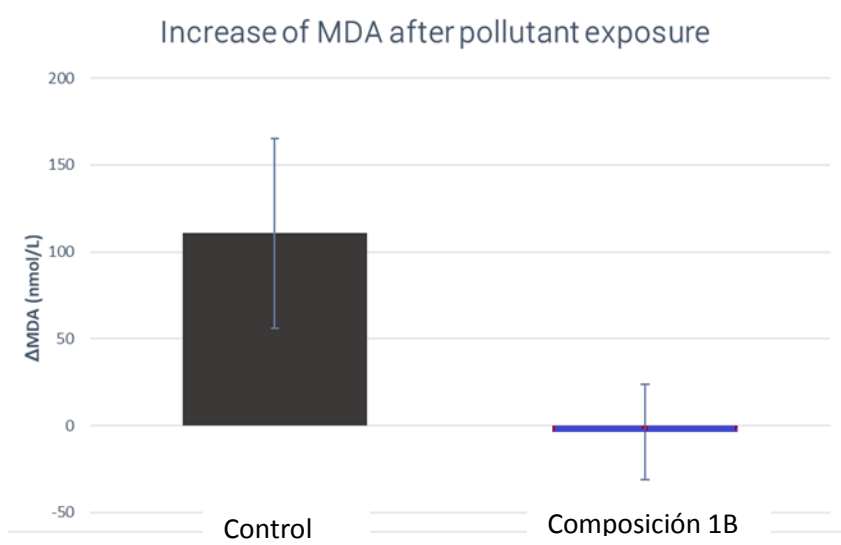


Figura 6

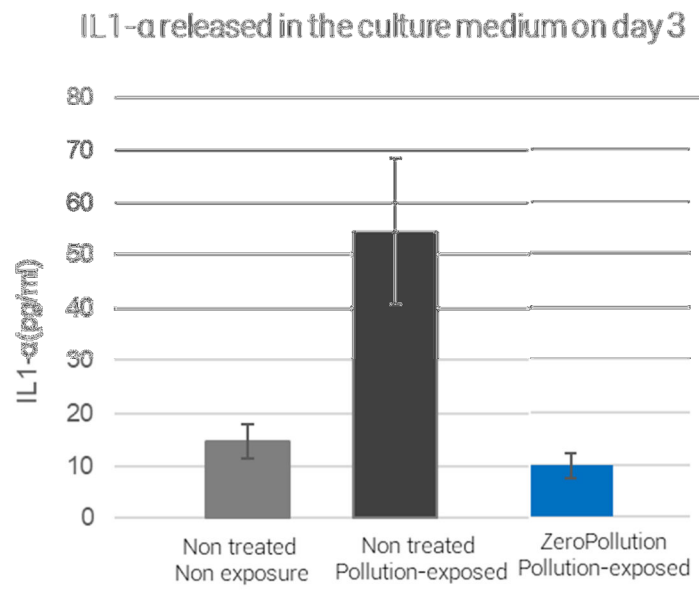


Figura 7

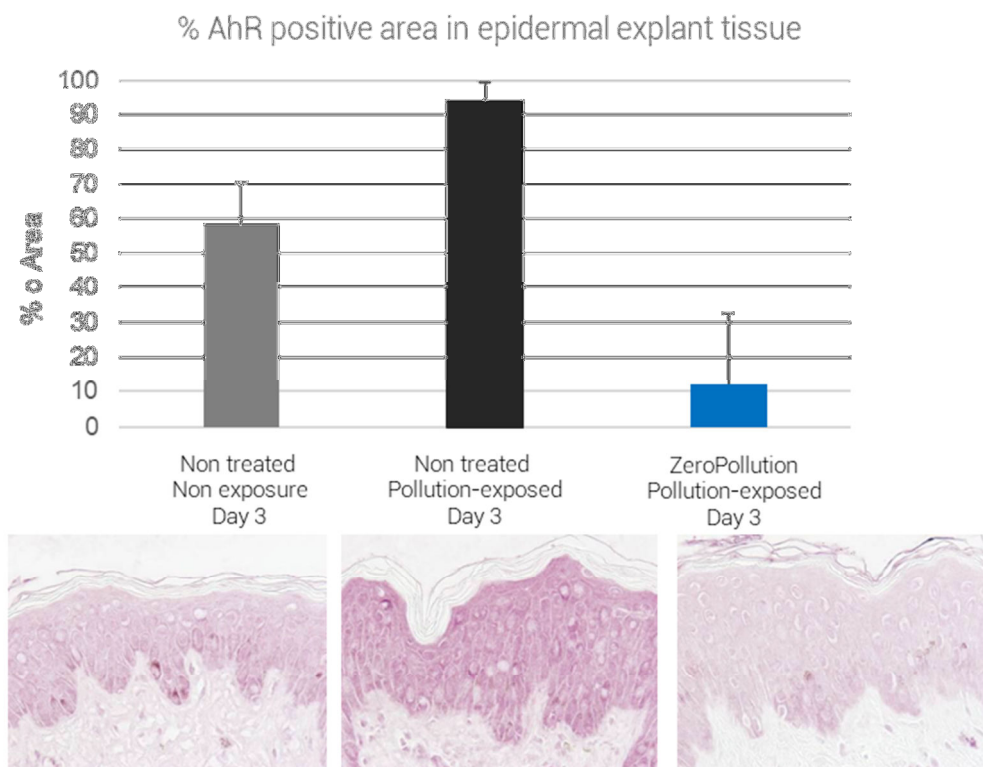


Figura 8

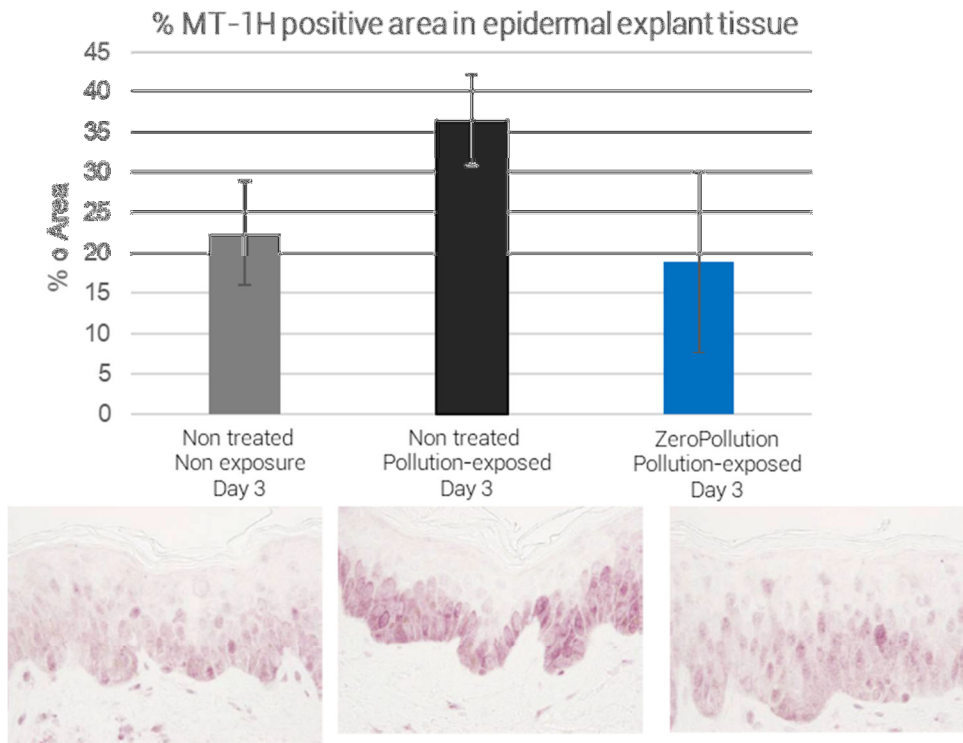


Figura 9



- ②¹ N.º solicitud: 201830426
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 30.04.2018
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004069218 A1 (ROCHER YVES BIOLOG VEGETALE et al.) 19/08/2004, reivindicaciones, página 6	1-16
A	WO 2006041526 A1 (ACCESS BUSINESS GROUP INT LLC et al.) 20/04/2006, reivindicaciones, párrafo [0040]	1-16
A	FR 2864785 A1 (OREAL) 08/07/2005, reivindicaciones	1-16
A	WO 2013091684 A1 (ORIFLAME RES AND DEV LTD et al.) 27/06/2013, reivindicaciones	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 25.10.2018	Examinador I. Rueda Molíns	Página 1/2
---	--------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K8/97 (2017.01)

A61Q17/00 (2006.01)

A61Q19/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET