

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 728 550**

51) Int. Cl.:

**C07C 233/49** (2006.01)

**C07C 233/04** (2006.01)

**A61K 31/197** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61Q 17/04** (2006.01)

**A61K 8/42** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61K 8/44** (2006.01)

**A61K 31/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/EP2015/067882**

87) Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020350**

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15757147 (2)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3177283**

54) Título: **Compuesto activo y composición relacionada para uso dermatológico en el campo farmacéutico o cosmético**

30) Prioridad:

**05.08.2014 IT MI20141435**

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

**25.10.2019**

73) Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)  
Via P. Palagi 2  
20129 Milano, IT**

72) Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;  
BENEDUSI, ANNA;  
MARZANI, BARBARA;  
BARONI, SERGIO y  
PINI, ELENA**

74) Agente/Representante:

**RUO , Alessandro**

ES 2 728 550 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

Compuesto activo y composición relacionada para uso dermatológico en el campo farmacéutico o cosmético

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un nuevo compuesto activo y a una composición para uso dermatológico farmacéutico o cosmético.

10 **Antecedentes**

[0002] La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, es la primera barrera contra el estrés físico, químico y biológico, proporcionando así la primera protección contra agentes ambientales dañinos mientras previene la deshidratación.

15 [0003] La barrera cutánea es un sistema muy complejo que consta de un gran número de componentes estrechamente relacionados entre sí. El cambio de cualquiera de estos componentes da como resultado una alteración de la función de barrera que culmina en alteraciones y enfermedades de la piel.

20 [0004] Estudios recientes han demostrado que el daño a la barrera cutánea se encuentra en el centro de la aparición de enfermedades, y aún se discute si es una causa primaria o un efecto secundario: para una hipótesis contraria, véase, por un lado, las alteraciones de la piel como factores desencadenantes de la inflamación, por otro lado, el daño en la barrera como efecto de la respuesta inflamatoria a alérgenos o irritantes.

25 [0005] La alteración de la barrera y de los mecanismos inmunológicos puede desempeñar un papel importante en la promoción y soporte de lesiones cutáneas y la inflamación. La inflamación de la piel se asocia con una afección aguda o crónica anormal. La respuesta inflamatoria de la piel implica una serie de interacciones complejas entre mediadores celulares, es decir, queratinocitos, mastocitos y macrófagos, y mediadores moleculares como las citoquinas y las quimiocinas.

30 [0006] Se sabe que una liberación descontrolada de especies reactivas de oxígeno (ERO) está involucrada en el envejecimiento y en diversas patologías de la piel. De hecho, hay muchos agentes capaces de producir una condición de estrés oxidativo en la piel, incluidos los rayos UV, la polución, contaminantes, aditivos y la exposición a conservantes de alimentos, así como los efectos secundarios de algunos medicamentos.

35 [0007] La presencia de radicales libres y la pérdida de humedad son las principales causas de las alteraciones de la piel, en particular del envejecimiento de la piel.

40 [0008] El ácido hialurónico es un componente primario de los glicosaminoglicanos, sustancias clave intercelulares responsables de la hidratación de la piel. Debido a sus propiedades físicas y químicas, de hecho, es capaz de absorber y retener grandes cantidades de agua. Con el tiempo, el contenido de ácido hialurónico en la piel tiende a disminuir con una disminución progresiva del nivel de hidratación, turgencia y plasticidad tisular.

45 [0009] Además de su función hidratante, el ácido hialurónico es una molécula esencial para la formación de la matriz de colágeno y las fibras elásticas y desempeña un papel importante en la prevención del daño celular y tisular por el estrés físico. Recientemente, también se ha destacado su participación en el proceso de sensibilización por contacto, como en la DCA, la dermatitis de contacto alérgica.

50 [0010] La inflamación de la piel mediada por el sistema inmunitario innato es una etapa crucial en la sensibilización a los alérgenos de contacto. El estudio de Philipp R. Esser et al., Contact Sensitizers Induce Skin Inflammation via ROS Production and Hyaluronic Acid Degradation, PLoS ONE, www.plosone.org de 1 de julio de 2012, volumen 7, número 7, e41340, muestra que los agentes sensibilizantes dan lugar a una degradación del ácido hialurónico, cuyos fragmentos desencadenan el proceso inflamatorio. Las ERO participan en este proceso porque la degradación del ácido hialurónico es dependiente de las ERO.

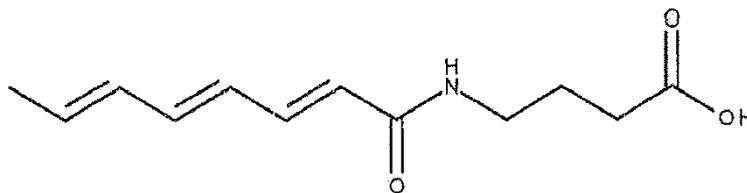
55 [0011] El objeto de la presente invención es proporcionar un medio eficaz de prevención y tratamiento de alteraciones y trastornos de la piel, tales como la sensibilización, envejecimiento, estrés oxidativo, inflamación, enfermedades de la piel en general y, en particular, de origen inflamatorio, un medio que también tiene una acción de recuperación de la barrera cutánea y, en particular, de la reactivación de la capacidad de hidratación natural de los tejidos conectivos. Según dicho objeto, se desea al menos salvaguardar, cuando no mejorar, la integridad y funcionalidad de la barrera cutánea y la homeostasis.

60

**Sumario de la invención**

65 [0012] Dichos objetos y otras ventajas que se pueden inferir a continuación en la presente descripción se logran utilizando un nuevo ingrediente activo y la composición correspondiente para uso farmacéutico o cosmético que lo

contiene, que consiste en ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de fórmula:



5 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

### Descripción de la invención

10 **[0013]** Tal como demuestran los estudios experimentales descritos a continuación en la presente descripción, dicho compuesto tiene una fuerte actividad antioxidante, antiinflamatoria e hidratante que permite un uso dermatológico efectivo con una pluralidad de efectos combinados, adecuados para la prevención y tratamiento de enfermedades de la piel, especialmente aquellas que involucran condiciones de sensibilización e inflamación, un uso adecuado para retener la homeostasis de la piel y también para el tratamiento cosmético del envejecimiento de la piel (antienvjecimiento).

15 **[0014]** Los objetos de la presente invención son, por tanto:

- el compuesto ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico
- su uso en el campo terapéutico y cosmético para la aplicación tópica en la piel para lograr una actividad antioxidante combinada contra las ERO junto con un efecto antiinflamatorio y un efecto de promoción de la producción de ácido hialurónico, para oponerse al mismo tiempo a la acción oxidante de los radicales libres y las afecciones inflamatorias, con el fin de preservar las condiciones fisiológicas de la epidermis humana y la homeostasis de la piel.
- composiciones para uso terapéutico y cosmético que incluyen ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico como ingrediente activo, o sus sales, formuladas con excipientes para uso tópico, adecuadas para administración local en la piel, en particular para las siguientes indicaciones:
  - Uso dermatológico en la prevención y tratamiento de enfermedades de la piel.
  - Uso dermatológico en la prevención y tratamiento de condiciones de sensibilización cutánea.
  - Uso en el tratamiento de la dermatitis de contacto alérgica.
  - Uso dermatológico en la prevención y tratamiento de afecciones inflamatorias cutáneas.
  - Uso dermatológico en el tratamiento de la piel para retener la homeostasis de la piel.
  - Uso dermatológico en el tratamiento de la piel para promover la producción de ácido hialurónico y, por lo tanto, las propiedades de resistencia y retención de propiedades como la hidratación, turgencia, plasticidad y viscosidad típicas del ácido hialurónico.
- Uso cosmético contra el envejecimiento cutáneo (acción antienvjecimiento).

20 **[0015]** De acuerdo con la invención, se prefiere una composición que comprende ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico, o sus sales como ingrediente activo, en una cantidad en el intervalo de 0,4 mM a 56 mM.

40 **[0016]** Los intervalos preferidos de cantidades de ingrediente activo en la composición expresadas como partes en peso, % en p/p, por ejemplo incluyen lo siguiente: 0,01-0,05; 0,125-0,375; 0,25-0,75; 0,5-1; 0,75-1,25.

### Ejemplos

45 **[0017]** Los siguientes son ejemplos de síntesis del compuesto de la invención y de una composición adecuada, en particular, para los usos especificados anteriormente.

Síntesis de 4-((2E,4E,6E) octa-2,4,6-trienamid) butanoico: C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>. PM: 223.

50 **[0018]** Poner 164 mg (1,59 mmol) de ácido γ-aminobutírico (GABA) bajo agitación magnética en 5 ml de THF anhidro en un baño de hielo; cuando la temperatura alcance 0 °C, gotear 3 ml de una solución de NaOH 1 N y a continuación una solución que consiste en 1447 mmol de cloruro de ácido octatrienoico (obtenido a partir de 200 mg, 1447 mmol de ácido) en 3 ml de THF anhidro. Después de la adición, la mezcla se devuelve a la temperatura ambiente y se mantiene bajo una corriente de nitrógeno y se agita por agitación magnética apartada de la luz durante 12 h. Añadir 5 ml de HCl 2 N a la solución y extraer con 10 ml de AcOEt; lavar la fase orgánica con salmuera. Secar la fase orgánica en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrar y evaporar. Control en TLC: hexano/acetato de etilo 7:3. Purificación en columna cromatográfica eluyendo con hexano/acetato de etilo 7:3.

55 **[0019]** Los espectros de caracterización del compuesto de la invención se muestran en las figuras de los dibujos

adjuntos, tal como se describe a continuación.

**[0020]** En los siguientes ejemplos no limitantes de la composición, se utiliza la nomenclatura INCI convencional y las cantidades de componentes se expresan en porcentajes en peso sobre el peso de la composición, variables dentro de los intervalos designados relativos.

**Ejemplo 1**

**[0021]**

10

CREMA FACIAL

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Ciclopentasiloxano	20-40
Polímero cruzado de alquil C30-45 cetearil dimeticona	1-3
Polisilicona-11	2-3
Dimeticona	1,25-2,25
Butilenglicol	2-4
Polímero cruzado HDI/trimetilol hexil-lactona	2-4
Steareth-2	1-2
Copolímero de acriloidimetiltaurato de amonio/VP	0,5-1,5
Ácido esteárico	0,5-1,5
Glicerina	0,5-1,5
Inositol	0,5-1,5
Steareth-21	0,5-1,5
Fenoxietanol	0,7-1,1
Polimetacrilato de metilo	0,7-1,1
Carbonato de dicaprililo	0,6-0,9
Caprilil glicol	0,5-0,7
Aceite de semilla de Borago officinalis	0,25-0,75
Perfume	0,1-0,4
Diazolidinil urea	0,1-0,3
Aceite de Persea gratissima	0,02-0,06
Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico	0,01-0,05
Betaína	0,05-0,15
Sorbitil furfural	0,05-0,15
Pantenol	0,05-0,15
Goma xantana	0,05-0,15
Diacetato de glutamato tetrasódico	0,02-0,06
Pentaeritritil tetra-di-t-butil hidroxihidrocinnamato	0,025-0,075
Hialuronato de sodio	0,025-0,075
Tocotrienoles	0,01-0,03
Dimetilmetoxi cromanol	0,005-0,015
Rutina	0,005-0,015
Agua	cantidad suficiente hasta 100

**Ejemplo 2**

**[0022]**

15

SUERO DE SILICONA

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Ciclopentasiloxano	20-30
Dimeticonol	5-15
1,3-butilenglicol	2-4
Acetato de vitamina E	0,05-0,2
Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico	0,25-0,75
Perfume	0,01-0,03
Polímero de dimeticona	cantidad suficiente hasta 100

**Ejemplo 3**

**[0023]**

20

CREMA PARA EL CUERPO

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Glicerina	4-6
Estearato de sorbitán	2,5-4,5
Cocoato de sacarosa	0,2-0,6
Triglicéridos C10-18	3-5

## ES 2 728 550 T3

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Palmitato de etilhexilo	3-5
Escualano	2-4
Ciclopentasiloxano	1-3
Extracto de flor de Calendula officinalis	0,5-1,5
Hidroximetilglicinato de sodio	0,2-0,6
Almidón de tapioca	0,3-0,7
Cera de Oryza sativa	0,25-0,75
Fenoxietanol	0,25-0,75
Solución de ácido láctico al 80 %	0,2-0,6
Alantoína	0,2-0,4
Betaína	0,2-0,4
Goma xantana	0,2-0,4
Inositol	0,2-0,4
Xilitol	0,2-0,4
Perfume	0,15-0,35
Ácido glicirretínico	0,1-0,3
Cetilhidroxietilcelulosa	0,1-0,3
Beta sitosterol	0,05-0,15
Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico	0,125-0,375
EDTA disódico	0,05-0,15
Sorbitil furfural	0,05-0,15
Taurina	0,05-0,15
Agua	cantidad suficiente hasta 100

### Ejemplo 4

[0024]

5

#### CREMA FACIAL LIGERA

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Metoxicinamato de etilhexilo	2-6
Carbonato de dicaprililo	1-5
Diglicinato de azeloil de potasio	0,25-0,75
Octocrileno	1-3
Butil metoxidibenzoilmetano	0,5-2,5
Benzoato de alquilo C12-15	0,5-2,5
Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico	0,5-1
Fenoxietanol	0,5-1,5
Etilhexilglicerina	0,05-0,15
Extracto de algas	0,025-0,075
Carbómero	0,25-0,75
Hidróxido de sodio	0,4-0,8
Ciclopentasiloxano	0,25-0,75
Polímero cruzado de dimeticona/vinil dimeticona	0,01-0,05
Copolímero de acrilamida/acriloidimetiltaurato de sodio	0,1-0,3
Isohexadecano	0,1-0,3
Polisorbato 80	0,02-0,06
Perfume	0,25-0,65
Benzonato de sodio	0,2-0,4
Polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30	0,1-0,3
EDTA disódico	0,05-0,15
Sorbitil furfural	0,05-0,15
Acetato de vitamina E	0,05-0,15
Lecitina	0,02-0,06
Agua	cantidad suficiente hasta 100

### Ejemplo 5

[0025]

10

#### CREMA SOLAR

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Metoxicinamato de etilhexilo	8-12
Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato	8-12
Benzoato de alquilo C12-15	6-10
Adipato de dibutilo	5-9
Salicilato de etilhexilo	4-6

Componente (nombre INCI)	% en p/p
Octocrileno	4-6
Dióxido de titanio	2-4
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	1-3
Dietilhexil butamido triazona	1-3
Sílice	1-2
Bis-PEG/PPG-20/5 PEG/PPG-20/5 dimeticona	1-2
Metoxi PEG/PPG-25/4 dimeticona	1-2
Propilenglicol	0,8-1
Steareth-21	1-1,4
Triglicérido caprílico/cáprico	0,4-0,8
Fenoxietanol	0,4-0,8
Caprililglicol	0,25-0,75
Glicerina	0,2-0,6
Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP	0,2-0,4
Aceite de Zea mays	0,1-0,3
Ácido láctico	0,08-0,16
Ácido glicirretínico	0,05-0,15
Ácido sórbico	0,05-0,09
EDTA disódico	0,05-0,15
Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico	0,75-1,25
Hidroximetilglicinato de sodio	0,3-0,7
Acetato de tocoferilo	0,3-0,7
Dietilhexil siringilidenemalonato	0,3-0,7
Sorbitil furfural	0,02-0,06
Hidróxido de sodio	0,01-0,03
Extracto de flor de Calendula officinalis	0,01-0,03
Ácido ferúlico	0,005-0,015
Agua	cantidad suficiente hasta 100

## Dibujos

5 **[0026]** Los diagramas según Las Figuras 1 a 4 en los dibujos adjuntos muestran los resultados de los estudios experimentales que se describen a continuación.

La Figura 1 y la Figura 2 muestran una tabla para la producción de ERO mediante el ensayo DCFH-DA.

La Figura 3 muestra un gráfico de la expresión génica de TNF-alfa.

La Figura 4 muestra un gráfico de la expresión génica de HAS1.

10 Las Figuras 5 a 8 se refieren a los siguientes espectros de caracterización del compuesto de la invención:

La Figura 5 muestra el espectro IR (KBr) del ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,6,4-trienamid) butanoico.

La Figura 6 muestra su espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>).

La Figura 7 muestra su espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>).

15 La Figura 8 muestra el espectro de masas.

## Estudios experimentales

20 **[0027]** La actividad del compuesto de la invención se evaluó utilizando los siguientes estudios experimentales.

### ESTUDIO DE LOS EFECTOS EN LA PRODUCCIÓN DE ERO POR EL ENSAYO DCFH-DA

25 **[0028]** La producción de ERO (especies reactivas de oxígeno) en la línea celular de fibroblastos de ratón BALB3T3 se determinó mediante espectrofluorimetría con el ensayo de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), como lo describen Tobi y colaboradores.

30 **[0029]** El DCFH-DA es un compuesto no fluorescente en su forma lipófila, capaz de difundirse a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, se desacetila por las esterasas intracelulares a 2,7-diclorofluoresceína no fluorescente (DCFH). Dado que la DCFH no puede volver a cruzar la membrana celular, se acumula en las células. La reacción con ERO intracelular da lugar a la oxidación de DCFH a 2,7-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto altamente fluorescente. La intensidad de dicha fluorescencia se puede detectar con un fluorímetro, lo que permite la estimación de la cantidad de ERO producida en las células.

35 **[0030]** Se utiliza la línea inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC2544 (Perry VP et al., 1957), se cultiva en matraces estériles (25 cm<sup>3</sup>), se incuba a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> en MEM (Medio Esencial Mínimo) añadido con el 10 % de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mm, el 1 % de aminoácidos no esenciales, en presencia de penicilina y estreptomina al 1 %.

**[0031]** La división 1:3 se realiza cada 2 días después de conseguir la monocapa lavando con 1 × PBS (tampón fosfato sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) y desprendiendo células con una solución de tripsina-EDTA a 37 °C durante 2 minutos.

**[0032]** El protocolo utilizado para este experimento representa una versión modificada del descrito por Tobi y sus colaboradores. Los queratinocitos humanos NCTC2544 se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad de 5 × 10<sup>4</sup> células/pocillo y se incubaron hasta alcanzar aproximadamente el 80 % de confluencia.

**[0033]** Las células se trataron previamente durante 16 horas con una muestra del compuesto de la invención a las siguientes concentraciones diferentes: 0,5 μM, 1 μM, 5 μM.

**[0034]** Se usó una muestra de GABA, ácido γ-aminobutírico, como compuesto de comparación a una concentración de 0,5 μM.

**[0035]** Al final de las 16 horas, las células se incubaron durante 30 minutos con una solución 0,1 mM de DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

**[0036]** Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS 1X y se indujo el estrés oxidativo mediante el tratamiento de 90 minutos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, en oscuridad, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

**[0037]** Después del tratamiento, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se lisaron con tampón de lisis CelLytic™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**[0038]** A continuación, las células se transfirieron a una placa negra de 96 pocillos y la fluorescencia de DCF se leyó espectrofluorimétricamente usando un lector de microplacas de fluorescencia Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), con longitudes de onda de excitación y 485 y 538 nm, respectivamente.

**[0039]** Los valores de emisión (RFU) obtenidos para cada muestra, relacionados con la producción de ERO intracelular, se compararon con el valor de emisión obtenido para el control negativo (Ctr = solo medio), para el control positivo (Ctr + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM) y expresado como un porcentaje de ERO producidas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de ERO producidas/Ctr} = (\text{Abs}_{538 \text{ nm}} \text{ de la muestra} / \text{Abs}_{538 \text{ nm}} \text{ del Ctr}) * 100$$

**[0040]** Todos los análisis se realizaron al menos dos veces por duplicado.

**[0041]** Los resultados se resumen en los gráficos de la Figura 1 y Figura 2: La Figura 1 destaca la actividad antioxidante del compuesto de la invención en las tres concentraciones diferentes probadas, mientras que la Figura 2 destaca la actividad antioxidante superior de la muestra del compuesto de la invención en comparación con el compuesto de comparación GABA anterior a la misma concentración de 0,5 μM.

#### ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE TNF-A EN QUERATINOCITOS

**[0042]** En dicho ensayo adicional, se utiliza una línea inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC 2544 (Perry VP et al., 1957) cultivada en frascos estériles (25 cm<sup>3</sup>), incubada a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo) suplementado con el 10 % de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, el 1 % de aminoácidos no esenciales, en presencia de penicilina y estreptomina al 1 %.

Día 1: Siembra celular

**[0043]** Cuando las células (queratinocitos humanos NCTC 2544) alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia, se separaron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 1 × 10<sup>6</sup> células/ml en placas de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> (24h).

Día 2: Exposición a las sustancias durante 24h

**[0044]** Una muestra del compuesto de la invención se disuelve en DMSO (100 %) a una concentración de 10 mM (solución madre), y a continuación se diluye en EMEM, complementado con FBS al 2,5 %, L-glutamina 2 mM, solución de NEAA al 1 % y 1 % de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomina (10.000 pg/ml).

**[0045]** Se incluyeron controles en cada placa, uno que contiene solo el medio de cultivo (control negativo = Control) y el otro el medio de cultivo + LPS (5 μg/ml) (control positivo = Control + LPS).

**[0046]** Las células se trataron con el compuesto de la invención a una concentración igual a 5 μM. Se añadió LPS a una concentración de 5 μg/ml a cada pocillo (excepto en el control negativo).

qPCR en tiempo real

**[0047]** El efecto de los compuestos objeto del estudio sobre la expresión génica de TNF- $\alpha$  se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa-qRT-PCR).

5

**[0048]** Este análisis requirió 3 etapas secuenciales:

- extracción de ARN total;
- retrotranscripción en ADNc;
- qRT-PCR.

10

Extracción del ARN total de los queratinocitos humanos NCTC 2544

**[0049]** El ARN total se extrajo de las células NCTC 2544 utilizando el reactivo Tri Reagent (Sigma Aldrich) como lo describen Chomczynski y Mackey.

15

**[0050]** El uso de Tri Reagent es un método eficiente para extraer ARN total o para la extracción simultánea de ARN, ADN y proteínas de muestras humanas. El ARN aislado se puede usar para varios ensayos, incluida la RT-PCR. Todo el procedimiento se puede completar en 1 hora y la recuperación del ARN mensajero no degradado es un 30-150 % más alta que en otros métodos.

20

**[0051]** Al final de la incubación, las células tratadas como antes se lavaron con PBS (1x) y a continuación se lisaron con Tri Reagent. Cada lisado se transfirió a un tubo Eppendorf y se homogeneizó adicionalmente con una jeringa de insulina. A continuación, se añadió cloroformo (200  $\mu$ l) a los lisados y se agitaron en un mezclador de vórtice y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

25

**[0052]** Después de la centrifugación a 12.000  $\times$  g durante 15 minutos a 4  $^{\circ}$ C, se obtuvieron 3 fases para cada lisado: una fase orgánica que contiene proteínas y elementos celulares, una fase central que contiene el ADN (visible como un anillo blanco) y una fase acuosa (incolores) que contiene el ARN. Las fases acuosas se trataron con isopropanol y las muestras se dejaron reposar durante la noche. Las muestras se centrifugaron a 12.000  $\times$  g durante 10 minutos a 4  $^{\circ}$ C. El sobrenadante se eliminó y los sedimentos se lavaron con etanol estéril al 75 % y se centrifugaron nuevamente a 7500  $\times$  g durante 5 minutos a 4  $^{\circ}$ C. Los sedimentos se resuspendieron con 20  $\mu$ l de agua DEPC (tratada con pirocarbonato de dietilo) y se pusieron en un baño termostático digital (Swbd-STUART) a 56  $^{\circ}$ C durante 15 minutos.

30

35

**[0053]** Usando un espectrofotómetro (Jenway UV/VIS MOD: 6715, BS-6715B0), se calcularon las concentraciones en  $\mu$ g/ml de ARN total extraído a una longitud de onda de 260 nm.

**[0054]** Finalmente, se evaluó la integridad del ARN (2  $\mu$ g/ml) por medio de una electroforesis realizada en gel de agarosa al 1 %.

40

- Retrotranscripción en ADNc

**[0055]** El ARN total se convirtió en ADNc (ADN complementario), utilizando una enzima capaz de sintetizar una molécula de ADN utilizando una hebra de ARN como molde; esta enzima dependiente de ARN polimerasa de ADN se llama transcriptasa inversa.

45

**[0056]** Se une al extremo 3' de una cadena individual de ARN y, al utilizar cebadores aleatorios y desoxinucleósido trifosfato (DNTPS), sintetiza la cadena de ADNc.

50

**[0057]** Para este fin, se utilizó un kit comercial "High-CapacitycDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Monza, Italia)", que contiene Tampón RT 10 $\times$ , DNTP 25 $\times$ , Cebadores aleatorios 10 $\times$ , Multi Scribe y agua DEPC.

**[0058]** El ARN extraído y cuantificado se diluyó a una concentración de 2  $\mu$ g/ml y se transcribió de forma inversa en ADNc. Se preparó una Mezcla maestra de 10  $\mu$ l (que contenía Tampón RT 10 $\times$ , DNTP 25 $\times$ , Cebadores aleatorios 10 $\times$ , Multi Scribe y agua DEPC), a la que se añadieron 10  $\mu$ l de ARN (2  $\mu$ g/ml).

55

**[0059]** Las muestras se pusieron en un termociclador (Sistema de PCR en tiempo real Stratagene Mx3000P, Agilent Technologies Italy SpA, Milán, Italia) y se sometieron a retrotranscripción en las siguientes condiciones:

60

- 25  $^{\circ}$ C durante 10 minutos;
- 37  $^{\circ}$ C durante 120 minutos;
- 85  $^{\circ}$ C durante 1 minuto;
- 25  $^{\circ}$ C durante 2 minutos.

65

**[0060]** Al final de la retrotranscripción, se añadieron muestras con 30 µl de agua DEPC para obtener una concentración final de ADNc de 40 ng/µl.

- qRT-PCR

5 **[0061]** La qRT-PCR es un método de amplificación y cuantificación en tiempo real de productos amplificados mediante el control de la fluorescencia emitida durante la reacción.

10 **[0062]** Para la amplificación por RT-PCR, se utilizó el método de la sonda TaqMan® (Applied Biosystems). Se utilizaron las siguientes sondas TaqMan: Hs00174128\_m1 (TNF-α) y Hs999999\_m1 (GAPDH). Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como gen de control (gen de mantenimiento).

15 **[0063]** La sonda Taqman es un tipo de sonda que permite el desarrollo de la fluorescencia a medida que avanza la amplificación. Un indicador (fluoróforo FAM™) está unido a su extremo 5', mientras que un inactivador está unido al extremo 3'. La proximidad entre el indicador y el inactivador cancela la emisión de la señal de fluorescencia. Solo con la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq) se detecta la fluorescencia y la acumulación de los productos de amplificación se puede evaluar mediante el aumento de la fluorescencia del indicador que aumenta con cada ciclo.

20 **[0064]** Se creó una Mezcla maestra para el qRT-PCR de la siguiente manera:

- 10 µl de di "2x TaqMan Universal PCR Master Mix" (que contiene AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UNG-Amperasi®, dNTPs con dUTP, referencia pasiva Rox II, Tampón optimizado);
- 1 µl de "20x TaqMan Gene Expression Assays" (que contiene 2 cebadores y la sonda fluorescente marcada con fluoróforo FAM™);
- 5 µl de agua DEPC.

30 **[0065]** Se añadieron 4 µl de ADNc a la Mezcla maestra para el gen diana y 1 µl de ADNc para el gen de mantenimiento.

**[0066]** La amplificación se realizó en las siguientes condiciones:

- 50 °C durante 2 minutos (activación UNG-Amperasi®);
  - 95 °C durante 10 minutos (activación de la polimerasa TaqMan);
  - 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización);
  - 60 °C durante 1 minuto (emparejamiento-extensión);
- } 40 ciclos

35 **[0067]** Cada análisis se realizó por triplicado.

**[0068]** Los datos obtenidos se analizaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [133] y, por lo tanto, fue posible calcular los valores relativos de expresión del gen de interés, normalizados en comparación con el gen de mantenimiento y calibrados en la muestra de control (células no tratadas):

40 
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{objetivo-mantenimiento (control)}} - \Delta Ct_{\text{objetivo-mantenimiento (células tratadas)}}$$

**[0069]** El  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se calculó asumiendo una eficiencia de amplificación del 100 %.

45 **[0070]** Los resultados se resumen en la gráfica de la Figura 3, que muestra una expresión reducida de TNF-α para el compuesto de la invención en comparación con el control positivo, y por lo tanto una actividad antiinflamatoria.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE HAS1 (HIALURONANO SINTASA 1) SOBRE FIBROBLASTOS

50 **[0071]** HAS1 es el gen para la síntesis de ácido hialurónico, uno de los componentes fundamentales de los tejidos conectivos capaces de conferir propiedades de resistencia y retención de la hidratación, turgencia, plasticidad y viscosidad a la piel.

55 **[0072]** En esta tercera prueba, se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón Balb 3T3 Clon A31 (ATCC CCL-163TM) (Aaronson y Todaro, 1968), se cultivó en matraces estériles (25 cm<sup>3</sup>), se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> en DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) suplementado con el 10 % de suero fetal bovino (CBS), el 1 % de aminoácidos no esenciales, en presencia del 1 % de penicilina y estreptomina.

**[0073]** La división 1:3 se realiza cada 2 días después de conseguir la monocapa lavando con 1x PBS (tampón

fosfato sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y desprendiendo células con una solución de tripsina-EDTA a 37 °C durante 2 minutos.

5 **[0074]** Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80 %, se separaron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por pocillo en placas de 12 pocillos para llevar a cabo el ensayo de la expresión génica de HAS1.

**[0075]** También en este caso, se utilizó una muestra de GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, como compuesto de comparación a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ .

10 **[0076]** El compuesto de la invención y el GABA se disolvieron en DMSO (100 %) a una concentración de 10 mM (solución madre), y a continuación se diluyeron en DMEM, suplementado con CBS al 10 %, solución de NEAA al 1 % y penicilina al 1 % (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 pg/ml).

15 **[0077]** Se incluyó un control positivo, que contenía solo medio de cultivo, en cada placa. Las células se trataron durante 24 h con muestras del compuesto de la invención y GABA a una concentración igual a 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ . Cada compuesto se ensayó por duplicado.

20 **[0078]** La expresión génica de HAS1 en células BALB3T3 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa relativa (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa-qRT-PCR). Este análisis requirió 3 etapas secuenciales:

- extracción de ARN total;
- retrotranscripción en ADNc;
- qRT-PCR.

25 **[0079]** El ARN total se extrajo de células BALB3T3 utilizando el kit comercial Ribospin™ (GeneAll Biotechnology Co., LTD).

30 **[0080]** Al final de la incubación con los compuestos activos de interés, las células se lavaron con PBS (1x) y finalmente se sometieron a un procedimiento de extracción de ARN. Al final de la extracción, utilizando un espectrofotómetro (Jenway UV/VIS MOD: 6715, BS-6715B0), se calcularon las concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  de ARN total extraído a una longitud de onda de 260 nm.

35 **[0081]** Finalmente, se evaluó la integridad del ARN (2  $\mu\text{g/ml}$ ) por medio de una electroforesis realizada en gel de agarosa al 1 %.

40 **[0082]** El ARN total se convirtió en ADNc (ADN complementario), utilizando una enzima capaz de sintetizar una molécula de ADN utilizando una hebra de ARN como molde; esta enzima dependiente de ARN polimerasa de ADN se llama transcriptasa inversa.

**[0083]** Se une al extremo 3' de una cadena individual de ARN y, al utilizar cebadores aleatorios y desoxinucleósido trifosfato (DNTPS), sintetiza la cadena de ADNc.

45 **[0084]** Para este fin, se utilizó un kit comercial "High-CapacitycDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Monza, Italia)", que contiene Tampón RT 10x, DNTP 25x, Cebadores aleatorios 10x, Multi Scribe y agua DEPC.

50 **[0085]** El ARN extraído y cuantificado se diluyó a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  y se transcribió de forma inversa en ADNc. Se preparó una Mezcla maestra de 10  $\mu\text{l}$  (que contenía Tampón RT 10x, DNTP 25x, Cebadores aleatorios 10x, Multi Scribe y agua DEPC), a la que se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de ARN (2  $\mu\text{g/ml}$ ).

**[0086]** Las muestras se pusieron en un termociclador (Sistema de PCR en tiempo real Stratagene Mx3000P, Agilent Technologies Italy SpA, Milán, Italia) y se sometieron a retrotranscripción en las siguientes condiciones:

- 25 °C durante 10 minutos;
- 37 °C durante 120 minutos;
- 85 °C durante 1 minuto;
- 25 °C durante 2 minutos.

60 **[0087]** Al final de la retrotranscripción, se añadieron muestras con 30  $\mu\text{l}$  de agua DEPC para obtener una concentración final de ADNc de 40 ng/ $\mu\text{l}$ .

**[0088]** La qRT-PCR es un método de amplificación y cuantificación en tiempo real de productos amplificados mediante el control de la fluorescencia emitida durante la reacción.

65 **[0089]** Para la amplificación por RT-PCR, se utilizó el método de la sonda TaqMan® (Applied Biosystems). Se utilizaron las siguientes sondas TaqMan: Mm03048195\_m1 (HAS1) y Mm00466519ml ( $\beta$ -actina). La  $\beta$ -actina se usó

como gen de control (gen de mantenimiento).

5 **[0090]** La sonda Taqman es un tipo de sonda que permite el desarrollo de la fluorescencia a medida que avanza la amplificación. Un indicador (fluoróforo FAM™) está unido a su extremo 5', mientras que un inactivador está unido al extremo 3'. La proximidad entre el indicador y el inactivador cancela la emisión de la señal de fluorescencia. Solo con la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq) se detecta la fluorescencia y la acumulación de los productos de amplificación se puede evaluar mediante el aumento de la fluorescencia del indicador que aumenta con cada ciclo.

10 **[0091]** Se creó una Mezcla maestra para el qRT-PCR de la siguiente manera:

- 10 µl de "2X Premix Ex Taq";
- 1 µl de "20x TaqMan Gene Expression Assays" (que contiene 2 cebadores y la sonda fluorescente marcada con fluoróforo FAM™);

15

- 0,4 µl de referencia pasiva Rox II;
- 5 µl de agua DEPC.

20 **[0092]** Se añadieron 4 µl de ADNc a la Mezcla maestra para el gen diana y 1 µl de ADNc para el gen de mantenimiento.

**[0093]** La amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos en las siguientes condiciones:

- 95 °C, 30 s (Activación de Amplitaq);
- 95 °C, 5 s (Desnaturalización)

25

- 60 °C, 20 s (Renaturalización-extensión);

**[0094]** Cada análisis se realizó por duplicado.

30 **[0095]** Los datos obtenidos se analizaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y, por lo tanto, fue posible calcular los valores relativos de expresión del gen de interés, normalizados en comparación con el gen de mantenimiento y calibrados en la muestra de control (células no tratadas):

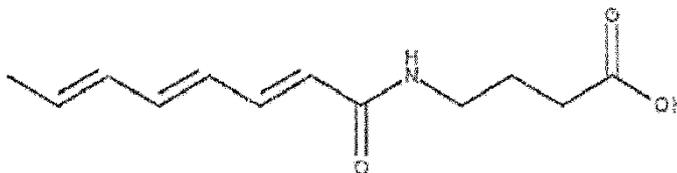
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{objetivo-mantenimiento (control)}} - \Delta Ct_{\text{objetivo-mantenimiento (células tratadas)}}$$

35 **[0096]** El  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se calculó asumiendo una eficiencia de amplificación del 100 %.

40 **[0097]** Los resultados se resumen en la gráfica de la Figura 4, que destaca un aumento en la expresión génica de HAS1 para el compuesto de la invención, mayor que el compuesto de referencia en ambas concentraciones probadas. Dado que HAS1 es el gen para la síntesis de ácido hialurónico, se entiende la utilidad del compuesto de la invención para conferir propiedades de resistencia y retención de la hidratación, turgencia, plasticidad y viscosidad típicas del ácido hialurónico.

**REIVINDICACIONES**

1. Ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de fórmula:



5

2. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso dermatológico en la prevención y tratamiento de enfermedades de la piel.

10 3. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso dermatológico en la prevención y el tratamiento de afecciones de sensibilización de la piel.

4. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la dermatitis de contacto alérgica.

15

5. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso dermatológico en la prevención y tratamiento de erupciones en la piel.

6. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso dermatológico en el tratamiento de la piel para preservar las condiciones fisiológicas de la epidermis humana y mantener la homeostasis de la piel.

20

7. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso dermatológico en el tratamiento de la piel para promover la producción de ácido hialurónico en la piel para mejorar la hidratación, la formación de la matriz de colágeno y fibras elásticas y prevenir el daño celular y tisular por estrés físico.

25

8. Uso cosmético del ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 en la prevención y tratamiento del envejecimiento de la piel.

30 9. Uso cosmético del ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 para hidratar la piel.

10. Ácido ((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico de acuerdo con la reivindicación 1 para usar como antioxidante contra la acción de los radicales libres.

35

11. Una composición para uso tópico en la piel que comprende ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico, o sus sales, como ingrediente activo, en una cantidad en el intervalo de 0,4 mM a 56 mM.

12. Una composición para uso tópico en la piel que comprende ácido 4-((2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienamid) butanoico, o sus sales, como ingrediente activo, en una cantidad expresada en partes en peso, p/p (%) en uno de los siguientes intervalos: 0,01-0,05; 0,125-0,375; 0,25-0,75; 0,5-1; 0,75-1,25.

40

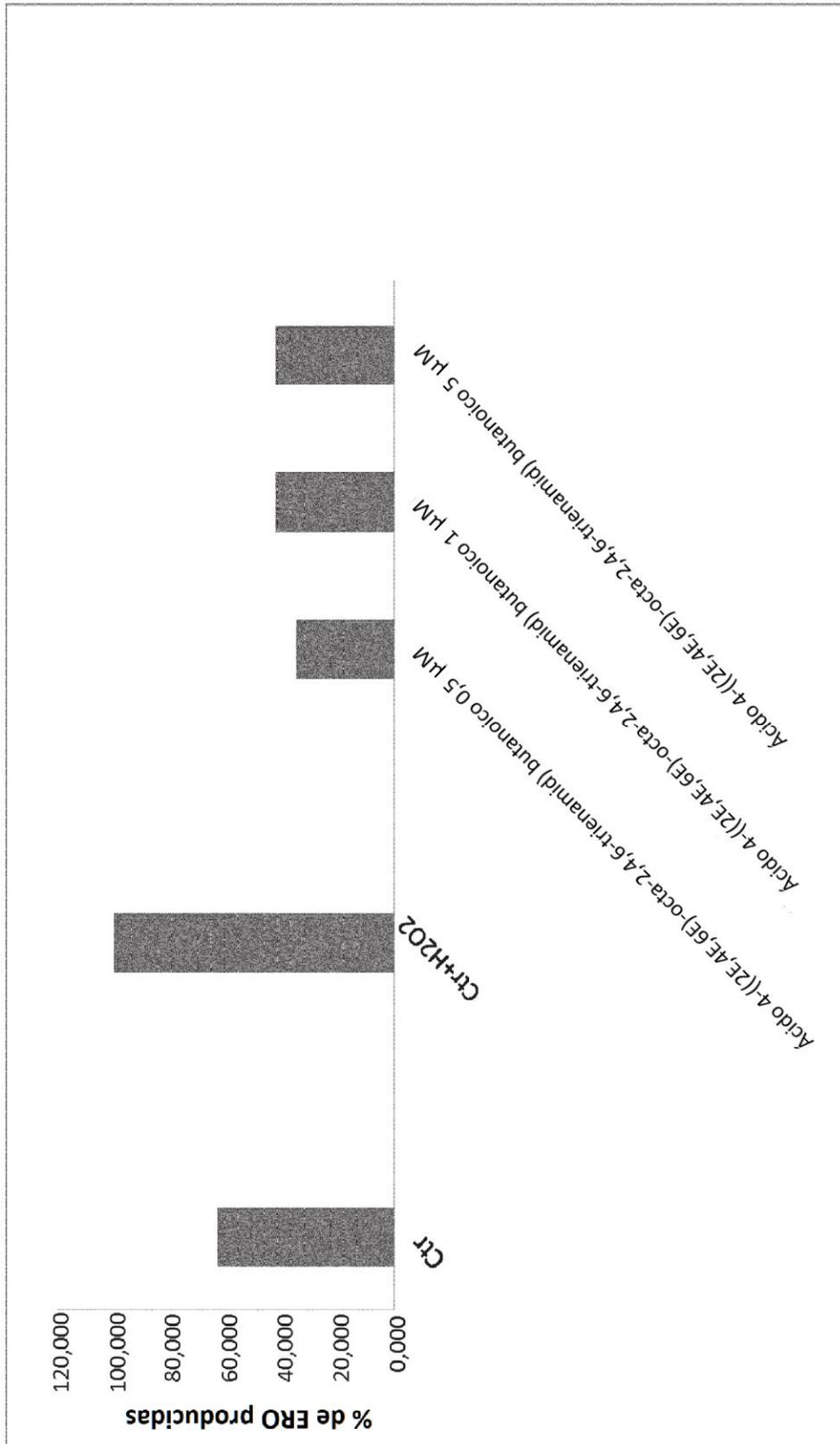


FIG. 1

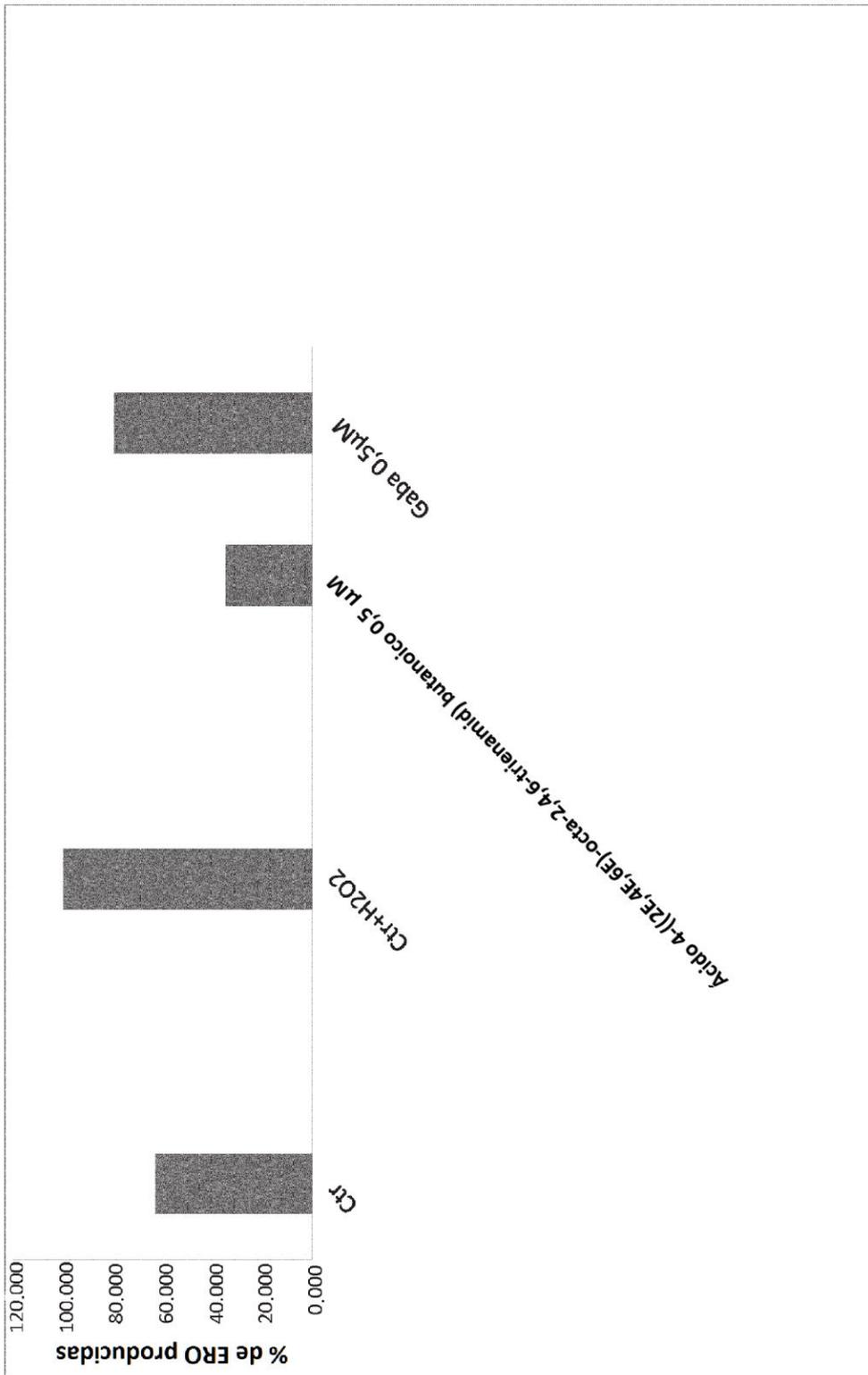


FIG. 2

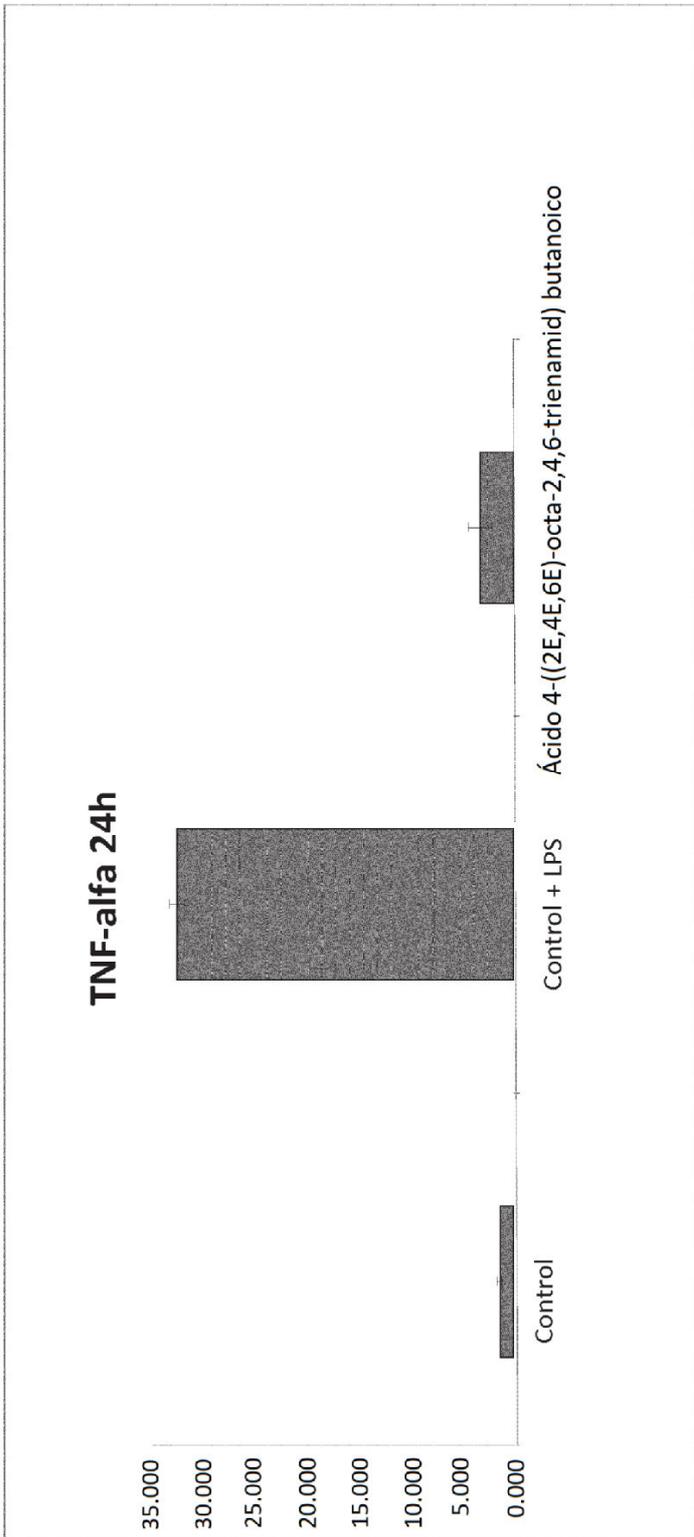


FIG. 3

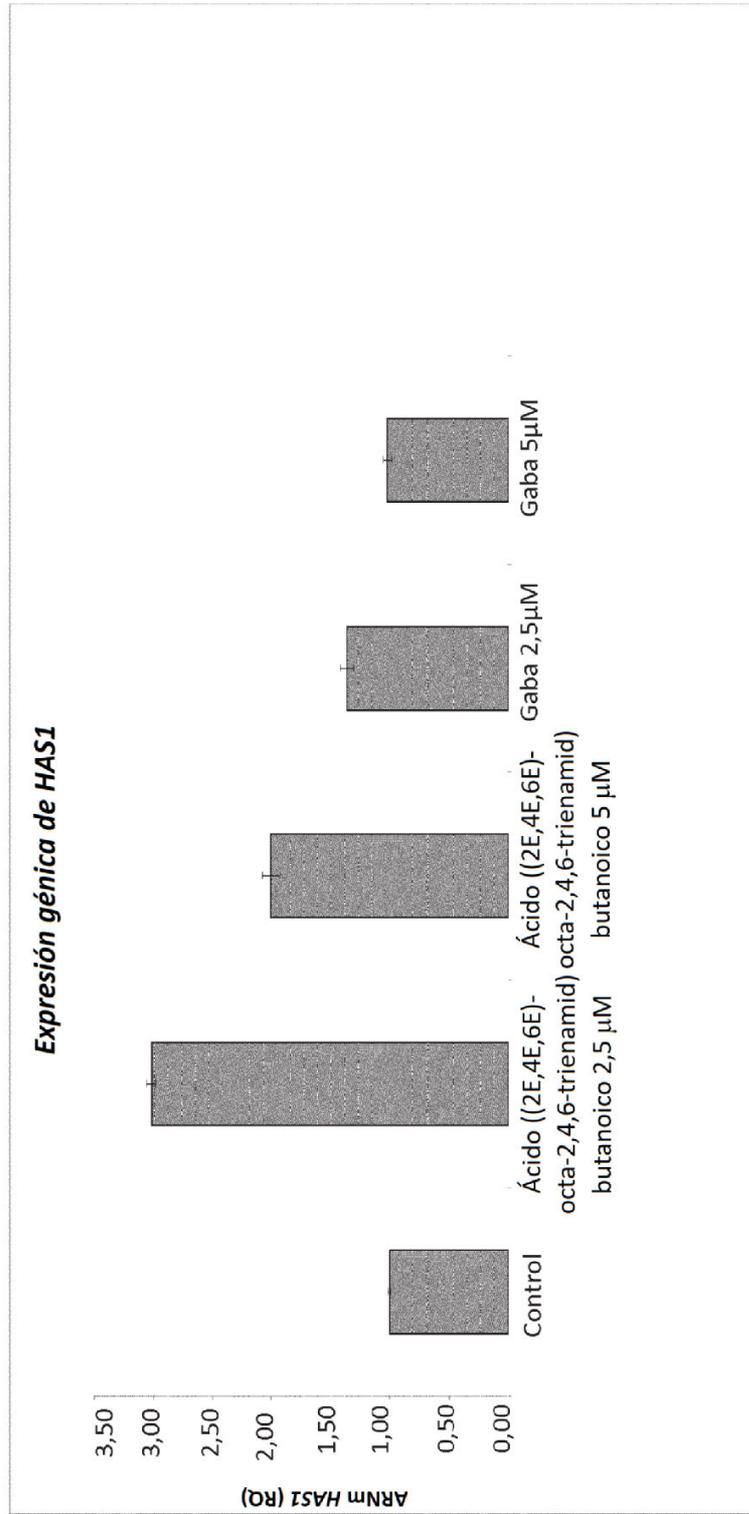


FIG. 4

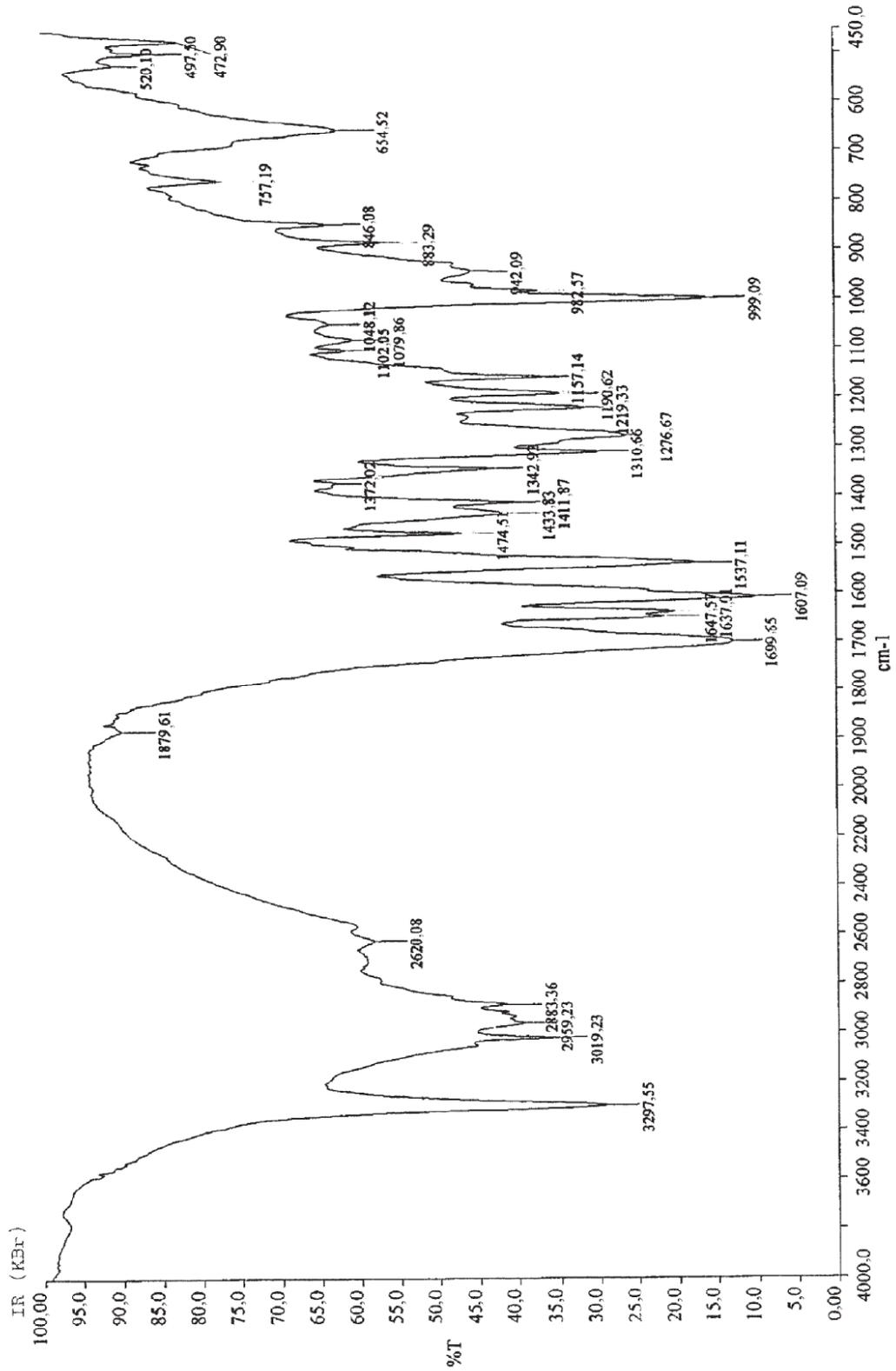


FIG. 5

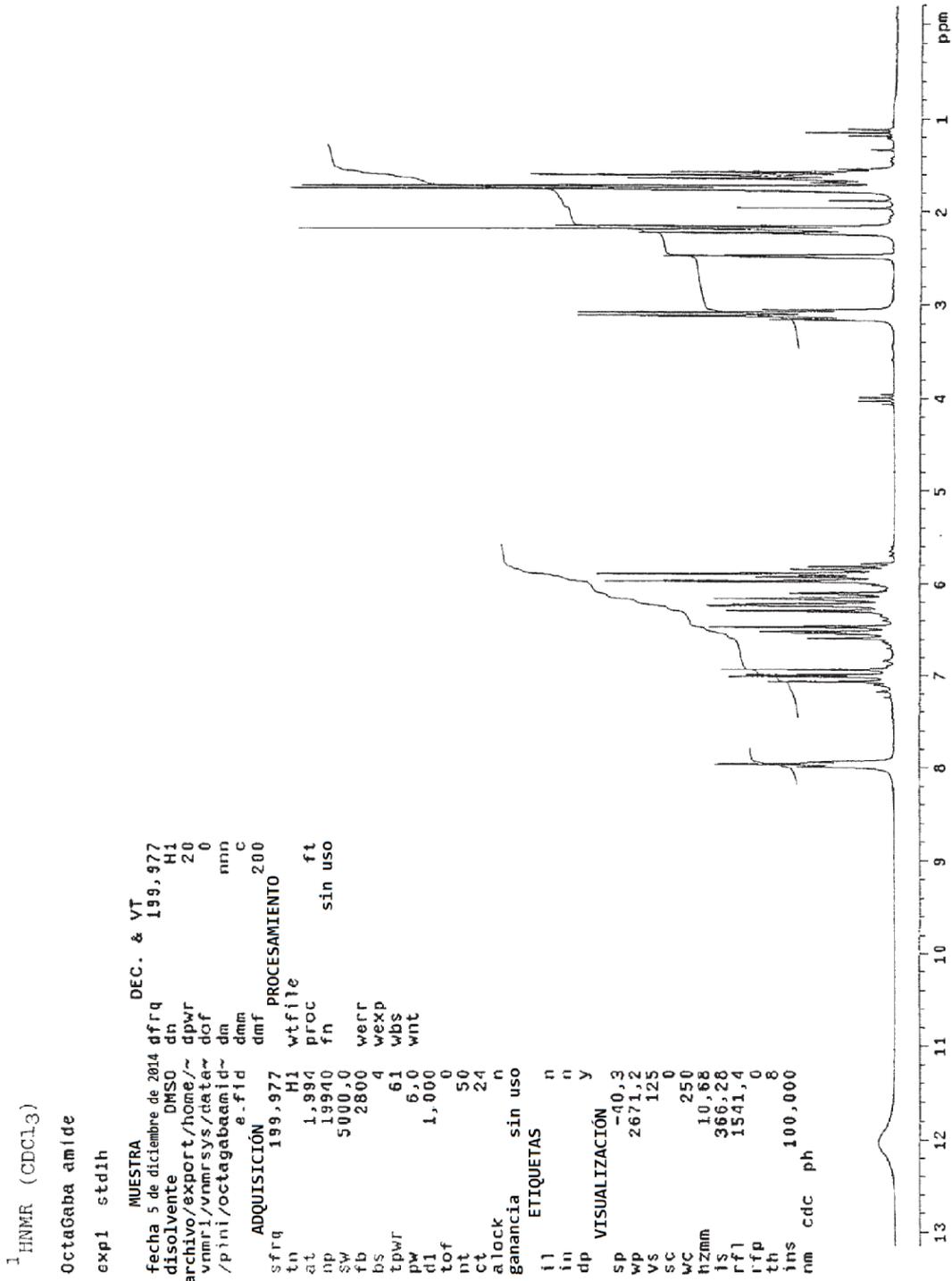


FIG. 6

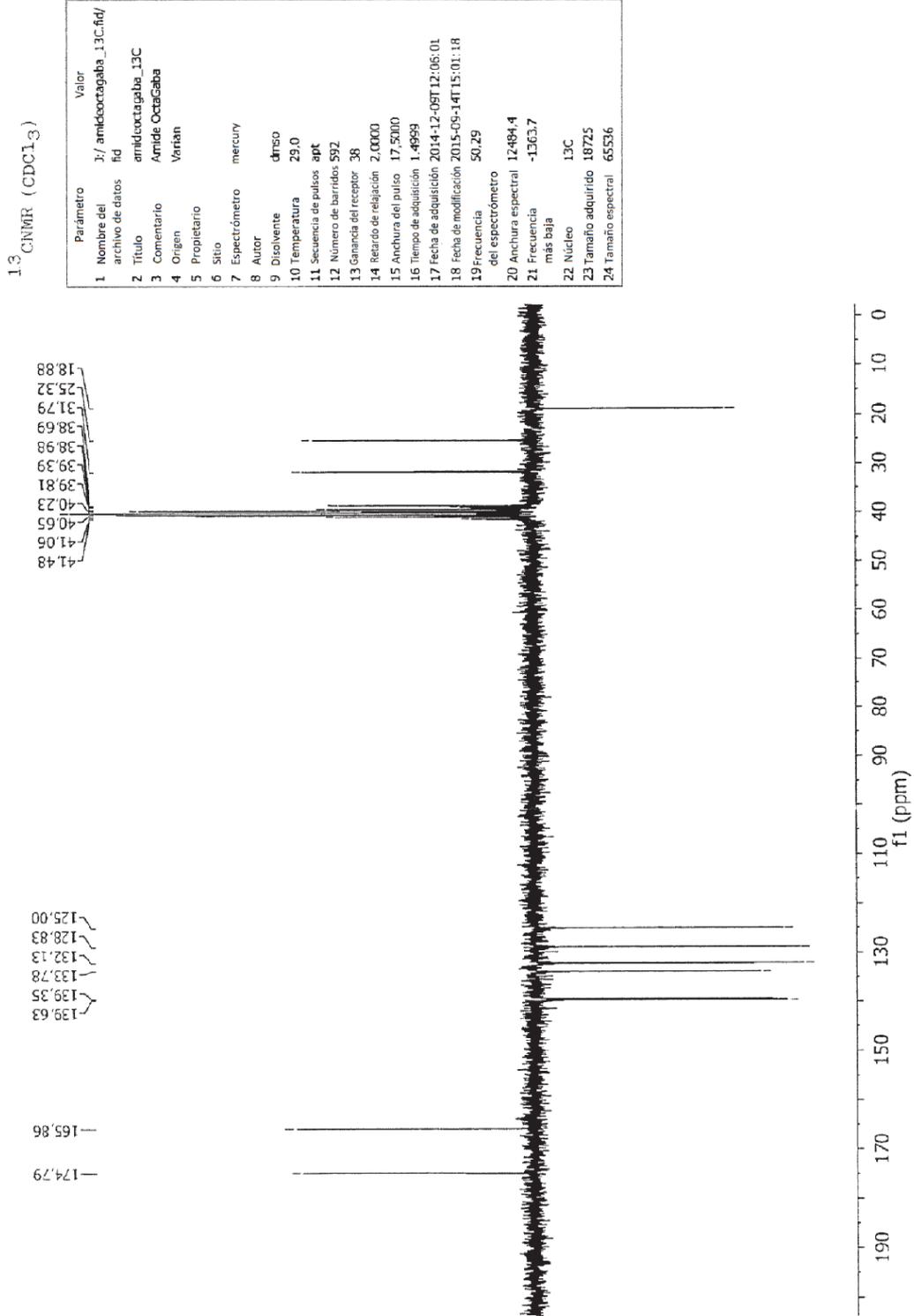


FIG. 7

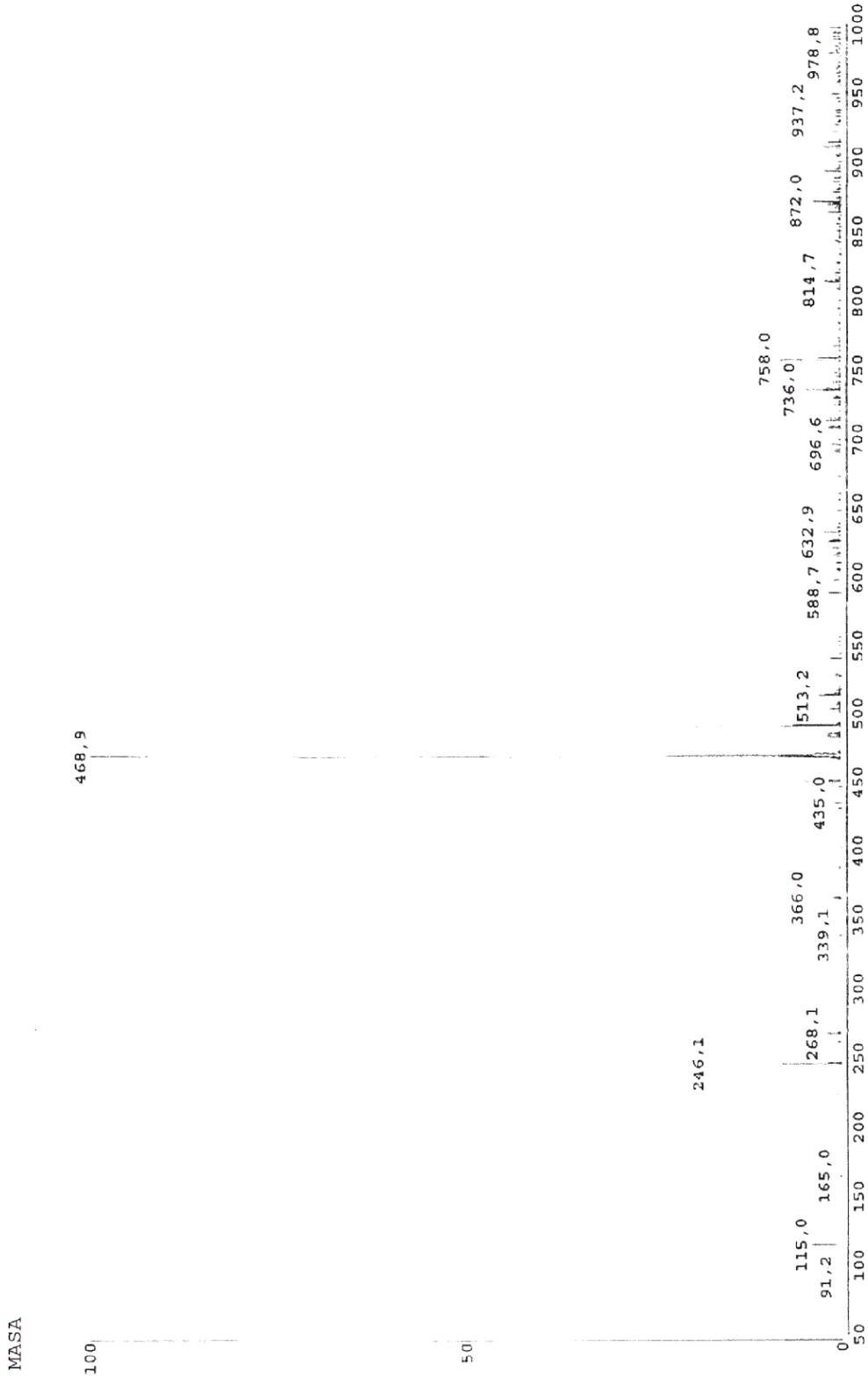


FIG. 8