



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 741 656

51 Int. Cl.:

A61K 31/455 (2006.01) A61K 8/67 (2006.01) A61Q 9/00 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 15.11.2013 E 13193158 (6)
Fecha y número de publicación de la concesión europea: 22.05.2019 EP 2742942

(54) Título: Niacinamida para inducir la generación de péptidos antimicrobianos

(30) Prioridad:

14.12.2012 EP 12197301

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 11.02.2020

(73) Titular/es:

UNILEVER N.V. (100.0%) Weena 455 3013 AL Rotterdam, NL

(72) Inventor/es:

MAJUMDAR, AMITABHA; MATHAPATHI, MRUTHYUNJAYA SWAMY; PALANISAMY, BHARATH; SAMPATHA KUMAR, RAMYA y TIWARI, JYOTI KUMAR

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

## **Observaciones:**

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

## **DESCRIPCIÓN**

Niacinamida para inducir la generación de péptidos antimicrobianos

## 5 Campo de la invención

10

15

20

25

30

35

50

55

60

65

La invención se refiere a un nuevo uso de niacinamida para desencadenar la generación de AMP (péptidos antimicrobianos) en la piel. Esto tiene aplicación en la mejora de la inmunidad de la piel, el cuero cabelludo y la cavidad oral contra el ataque de microorganismos.

#### Antecedentes de la invención

La piel es la principal línea de defensa que protege al cuerpo humano de patógenos invasores, como virus y bacterias. Como principal órgano de defensa, el tejido de la piel siempre permanece en contacto constante con el entorno y, por tanto, tiene que enfrentarse a y resolver amenazas y desafíos de patógenos invasores. La superficie de la piel expuesta no sólo se ve desafiada por bacterias exógenas patógenas, sino que también permanece en contacto e interactúa con las bacterias comensales residentes. A pesar de todos estos desafíos de los microbios exógenos y comensales, la piel sana permanece libre de infecciones y la cantidad de la microflora residente también permanece constante. Este equilibrio en la interacción entre el tejido de la piel y los microbios se mantiene dado que la piel tiene una estrategia de defensa sofisticada y los péptidos antimicrobianos (AMP) forman una parte importante de esta

Los AMP forman una parte integral del propio sistema de defensa de la piel. Los AMP se descubrieron inicialmente en insectos y en animales y desde su descubrimiento inicial se considera a los AMP como antimicrobianos prometedores. Los AMP son de naturaleza ubicua y normalmente exhiben un amplio espectro de actividad contra bacterias invasoras, hongos, virus encapsulados y parásitos (Braff y Gallo, 2006). Los AMP son generalmente péptidos cortos y en seres humanos se ha notificado que están presentes aproximadamente 90 AMP diferentes. Los AMP tienen en general dos características físicas principales y son: a) carga catiónica y b) una proporción significativa de residuos hidrófobos. La carga catiónica de los AMP promueve la selectividad para las membranas citoplasmáticas microbianas con carga negativa mientras que la hidrofobicidad facilita las interacciones con la membrana celular de las especies microbianas.

Los presentes inventores han estado trabajando para proporcionar beneficios de higiene a los consumidores a través de la ruta de potenciar los niveles de AMP en la piel. Se desea proporcionar esto a través del uso de moléculas naturales que los consumidores perciben como más respetuosas con la piel y de ese modo menos agresivas. Para conseguir este objetivo se sometieron a ensayo diversos principios activos y después de una investigación extensa se llegó al hallazgo del uso de la niacinamida o vitamina B3 para potenciar los niveles de AMP en la piel.

La niacinamida o vitamina B3 es un principio activo de aclaramiento de la piel usado en varios productos de cuidado para la piel. También se ha notificado que la niacinamida tiene otras diversas propiedades como prevención de celulitis, tratar irritación de la piel y para mejorar la absorción de agua por la piel (notificadas en publicaciones de patente EP1063963, EP1063994, EP1063965 por nombrar unas pocas). La niacinamida también se utiliza en el tratamiento de muchos estados inflamatorios de la piel como acné vulgar, psoriasis y dermatitis atópica (-Niren,N.M.
(2006) Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review. Cutis 77: 11-16.).

El documento WO11133692 (Cedars-Sinai Medical Centre) da a conocer el importante papel de C/EBPe en la respuesta inmunitaria innata contra patógenos. Específicamente, se ha mostrado que en ausencia de C/EBPe funcional, los ratones tienen gravemente perjudicada su habilidad para eliminar una infección por *S. aureus*. Los neutrófilos están particularmente afectados, y la susceptibilidad a *S. aureus* puede rectificarse mediante tratamiento con interferón-gamma (IFN-γ). De manera importante, la actividad aumentada de C/EBPe, o bien mediante sobreexpresión inducida de C/EBPE o bien mediante la aplicación de nicotinamida o un análogo, derivado o sal de la misma, potencia drásticamente la destrucción inmunitaria de *S. aureus* y conduce a una mejora de la infección.

El documento WO12137169 (L'Oréal) da a conocer el uso de composiciones cosméticas que comprenden un lisado bacteriano completo para tratar la caspa en el cuero cabelludo. La inducción de péptidos antimicrobianos en el cuero cabelludo se desencadena mediante este tratamiento: sin embargo, el documento WO12137169 no da a conocer ni sugiere el uso de la niacinamida para este propósito.

Los presentes inventores han hallado que con la aplicación de niacinamida sobre la piel (que puede ser piel *per se* o cuero cabelludo o cavidad oral), el principio activo induce la generación de AMP que se sabe que es una etapa importante para mejorar la inmunidad de la piel contra el ataque de microorganismos. Por tanto el beneficio obtenido por un consumidor es que la piel está protegida contra gérmenes que podrían atacar en el futuro mediante la aplicación de una composición que comprende niacinamida.

## Sumario de la invención

5

10

15

20

25

30

35

40

55

La invención contempla el uso de niacinamida para la inducción de secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) cuando se aplica sobre la superficie externa del cuerpo humano.

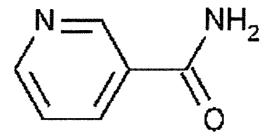
Por consiguiente, también proporciona niacinamida para inducir de manera profiláctica la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) cuando se aplica sobre una superficie externa del cuerpo humano.

## Descripción detallada de la invención

Estos y otros aspectos, características y ventajas se volverán evidentes para los expertos habituales en la técnica a partir de una lectura de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas. Para evitar dudas, cualquier característica de un aspecto de la presente invención puede utilizarse en cualquier otro aspecto de la invención. La palabra "que comprende" está destinada a significar "que incluye" pero no necesariamente "que consiste en" o "que se compone de." En otras palabras, las etapas enumeradas u opciones no necesitan ser exhaustivas. Se observa que los ejemplos dados en la descripción a continuación están destinados a aclarar la invención y no están destinados a limitar la invención a esos ejemplos *per se.* De manera similar, todos los porcentajes son porcentajes en peso/peso a menos que se indique de otro modo. Excepto en los ejemplos operativos y comparativos, o donde de otro modo se indique explícitamente, todos los números en esta descripción que indican cantidades de material o condiciones de reacción, propiedades físicas de materiales y/o uso han de entenderse como que están modificados por la palabra "aproximadamente". Los intervalos numéricos expresados en el formato "desde x hasta y" se entiende que incluyen x e y. Cuando para una característica específica se describen múltiples intervalos preferidos en el formato "desde x hasta y", se entiende que también se contemplan todos los intervalos que combinan los diferentes valores extremos.

"Piel" tal como se usa en el presente documento, pretende incluir la superficie externa de mamíferos, especialmente seres humanos e incluye piel, cuero cabelludo, pelo y cavidad oral. El uso podría ser por medio de incorporar niacinamida en un producto sin aclarado o con aclarado, e incluye cualquier producto aplicado a un cuerpo humano principalmente para aclaramiento de la piel pero también puede mejorar la apariencia, el lavado, control de olor o estética general. El uso es preferiblemente por medio de incorporación en una composición sin aclarado. La composición puede estar en forma de un líquido, una loción, una crema, una espuma, un exfoliante, un gel, pastilla de jabón o tónico, o aplicarse con un implemento o mediante una mascarilla facial, almohadilla o parche. Los ejemplos no limitativos de tales composiciones incluyen lociones y cremas para la piel sin aclarado, champús, acondicionadores, geles de ducha, pastillas de tocador, antitranspirantes, desodorantes, depilatorios, pintalabios, bases de maquillaje, rímel, bronceadores artificiales y lociones de protección solar.

La niacinamida tiene la estructura que se da a continuación



La niacinamida parar su uso en la presente invención induce la secreción de AMP de queratinocitos. Los AMP de este modo secretados contemplan mejorar la inmunidad de la superficie externa del cuerpo. La superficie externa incluye piel, cuero cabelludo o cavidad oral.

Se ha encontrado por medio de la presente invención que la niacinamida activa a los queratinocitos, que son las células principales en la epidermis de la piel para proporcionar los beneficios de la presente invención a saber, induciendo la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP). Esto provoca que la niacinamida eleve el escudo de protección contra gérmenes. Por tanto, la niacinamida proporciona protección para el cuerpo contra infecciones elevando las propias defensas corporales. En otras palabras, el principio activo prepara la superficie corporal para protección contra gérmenes. La ventaja de esto es que proporciona protección de larga duración, por ejemplo, hasta 24 horas de protección contra gérmenes.

La composición en la que se usa niacinamida según la presente invención puede comprender las características preferidas siguientes. La niacinamida está presente preferiblemente en del 0,1 al 5%, más preferiblemente del 0,5 al 5%, todavía más preferiblemente del 0,5 al 3%, y de manera óptima del 1,0 al 3,0% en peso de la composición. La composición comprende preferiblemente una base cosméticamente aceptable. La base cosméticamente aceptable es preferiblemente una crema, loción, gel o emulsión.

Pueden prepararse composiciones de cuidado personal usando diferentes vehículos y sistemas emulsionantes o no emulsionantes cosméticamente aceptables. Las bases cosméticamente aceptables preferidas comprenden del 1 al 25% de ácido graso. Un aspecto preferido adicional contempla la inclusión del 0,1 al 10% de jabón. Una base altamente adecuada es una crema. Las cremas desvanecedoras son especialmente preferidas. Las bases de crema desvanecedora generalmente comprenden del 5 al 25% p/p de ácido graso y del 0,1 al 10% p/p de jabón. La base de crema desvanecedora da una sensación mate altamente apreciada a la piel. Los ácidos grasos C<sub>12</sub> a C<sub>20</sub> son especialmente preferidos en bases de crema desvanecedora, siendo todavía más preferidos ácidos grasos C14 a C<sub>18</sub>. El ácido graso más preferido es ácido esteárico. El ácido graso también puede ser una mezcla de ácido esteárico y palmítico. El ácido graso en la composición está presente más preferiblemente en una cantidad en el intervalo del 5 al 20% p/p de la composición. Los jabones en la base de crema desvanecedora incluyen sal de metal alcalino de ácidos grasos, como sales de sodio o potasio, siendo la más preferida el estearato de potasio. El jabón en la base de crema desvanecedora está presente generalmente en una cantidad en el intervalo del 0,1 al 10%, más preferiblemente del 0,1 al 3% p/p de la composición. Cuando se formula la composición de cuidado personal como una crema desvanecedora comprende preferiblemente del 60 al 85%, más preferiblemente del 65 al 80% p/p de agua. El agua está presente generalmente en muchas composiciones preparadas según la invención y está presente generalmente en del 40 al 85% en peso de la composición.

La composición de la invención puede comprender otros ingredientes opcionales como agentes de aclaramiento de la piel, y uno o más protectores solares UV. La composición según la invención puede comprender también otros diluyentes. Los diluyentes actúan como un dispersante o portador de otros materiales presentes en la composición, de manera que facilitan su distribución cuando se aplica la composición a la piel. Los diluyentes diferentes de agua pueden incluir emolientes líquidos o sólidos, disolventes, humectantes, espesantes y polvos.

La composición puede administrarse opcionalmente como un desodorante. Por desodorante quiere decirse un producto en el medio de barra, bola (*roll-on*) o propelente que se usa para beneficio desodorante personal, por ejemplo, aplicación para el área axilar que puede o no contener principios activos antitranspirantes.

Las composiciones desodorantes pueden estar generalmente en forma de sólidos firmes, sólidos blandos, geles, cremas y líquidos y se dispensan usando aplicadores apropiados para las características físicas de la composición.

Las composiciones pueden comprender un amplio intervalo de otros componentes opcionales. El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edición, 1992, describe una amplia variedad de ingredientes farmacéuticos y cosméticos no limitativos usados de manera común en la industria de cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Los ejemplos incluyen: antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes de tamponamiento, colorantes, espesantes, polímeros, estípticos, fragancia, humectantes, agentes opacificantes, acondicionadores, agentes exfoliantes, ajustadores del pH, conservantes, extractos naturales, aceites esenciales, sensibilizadores de la piel, agentes calmantes de la piel y agentes cicatrizantes de la piel

La composición se formula en cualquier formato conocido, siendo formatos más preferidos cremas o lociones.

El uso de la niacinamida por medio de la presente invención no es terapéutico.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

## 45 Ejemplos

10

15

30

35

40

Ejemplos 1 a 6: Ejemplos para demostrar que la niacinamida induce la expresión génica de LL-37 pero no cambia la expresión de psoriasina

50 Se prepararon las siguientes muestras tal como se muestra en la tabla-1 para medir su efecto sobre la expresión de psoriasina y AMP psoriasina (LL-37) expresado.

#### Tabla-1

Ejemplo	Muestra	
1	Control para la expresión génica de LL-37	
2	LPS de control positivo (25 \g/ml) para la expresión génica de LL-37	
3	Niacinamida (1,22 mg/ml) para la expresión génica de LL-37	
4	Control para la expresión génica de psoriasina	
5	LPS de control positivo (25 \g/ml) para la expresión génica de psoriasina	
6	Niacinamida (1,22 mg/ml) para la expresión génica de psoriasina	

Se da a continuación el material usado para y el procedimiento usado para medir la expresión génica respectiva.

#### **Materiales**

20

25

Queratinocitos primarios epidérmicos neonatales humanos normales (NHEK), medios de crecimiento de queratinocitos (KGM) y suplementos para el crecimiento, antibióticos (penicilina y estreptomicina),cepa de *E. coli* (cepa ATCC 10536), lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* cepa 055:B5, 1X solución salina tamponada con fosfato, tampón de fosfato de sodio 10 mM, niacinamida, cubetas estériles (ambos extremos tienen forma de barril abierto, el área del extremo abierto es de 2,27 cm² y las varillas son de punta redondeada hechas de teflón duro (apéndice-1), ingredientes de vaselina (apéndice-2), psoriasina (S100A7) (CircuLex) y kit ELISA LL-37 (Hycult), medio agar de Macconkey, medio TSA (informe de investigación de Unilever n.º: BL 11 0086).

### Estimulación de gueratinocitos de la piel primarios humanos

Se obtuvieron queratinocitos primarios humanos preparados a partir de prepucio neonatal de (Lonza India) y se cultivaron en medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero con suplementos para el crecimiento (Invitrogen) definidos. Se cultivaron los queratinocitos en placas de cultivo de tejidos de 12 y 24 pocillos (BD Falcon) y las células tratadas a una confluencia del 60 - 70%. Se realizó la estimulación de los queratinocitos en KGM con suplemento para el crecimiento y se hizo todo experimento entre los pases 3 a 5.

## Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cuantitativa

Se cultivaron NHEK en placas de 12 pocillos (BD, Falcon) a 6 × 10⁴células por pocillo. Después de 24 h de incubación, se reemplazó el 50% de los medios con medios recién preparados. En el día 3, se trataron las células con diferentes concentraciones de niacinamida con medios recién preparados durante 16 - 18 horas. Se cosecharon las células en tampón RLT (Qiagen) y se almacenaron las muestras a -70°C hasta que se usaron para aislamiento de ARN.

Se aisló el ARN total usando un mini kit RNeasy de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Se comprobó la pureza y concentración de ARN usando un instrumento NanoDrop (Thermo scientific). Se cargaron las muestras de ARN en gel de agarosa al 1% y se observó la calidad de la extracción usando un transiluminador UV (Bangalore Genie, India). Se tomaron alícuotas de las muestras de ARN y se almacenaron a -70°C. Se usó una alícuota de ARN total (de 250 a 500 ng) para hacer ADNc usando un kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad, EE.UU.). El programa de síntesis de ADNc fue 65°C durante 5 min seguido por 25°C durante 5 minutos. Se hizo la síntesis de ADNc a 42°C durante 30 minutos, se desnaturalizó de manera final a 85°C 5 min seguido por 4°C hasta que se retiró.

Se llevó a cabo PCR en tiempo real usando el método SYBR green según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, EE.UU.) usando una máquina Chromo4 controlada de manera térmica (Bio-Rad, EE.UU.). Se usaron 5 μl de una muestra de ADNc diluida 1:10 y 1,5 pmol de cebadores específicos en cada reacción usando un programa de PCR normalizado (es decir 94°C durante 5 minutos seguido por 50 ciclos de "94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 s. 72°C durante 30 segundos) y se analizaron los resultados usando el método 2<sup>-ΔΔCT</sup>.

## ELISA de psoriasina y LL-37

Se sembraron queratinocitos primarios en placas de 12 pocillos (BD falcon). A del 60 al 70% de confluencia, se trataron las células con diferente concentración de niacinamida durante 72 h. Después de 72 horas de incubación se almacenó el sobrenadante del cultivo celular a -70°C hasta que se usó para ELISA. Se llevaron todos los reactivos de ELISA y muestras hasta temperatura ambiente previamente al ensayo. Se centrifugaron las muestras de sobrenadante del cultivo celular a 5000 rpm durante 10 minutos antes de su uso. Se usaron 100 \(\times\) I de muestra sin diluir de sobrenadante del cultivo celular para comprobar el nivel de psoriasina usando el kit ELISA de CircuLex. Se diluyeron las muestras clínicas hasta 1:25 en tampón de dilución y se usaron 100 \(\times\) I de muestras diluidas para comprobar el nivel de psoriasina mediante ELISA. En el caso de LL-37, se usaron 100 \(\times\) I de muestras sin diluir a partir de muestras *in vitro* así como clínicas para comprobar el nivel de LL-37 mediante ELISA (Hycult Biotech).

La expresión génica de AMP psoriasina y LL-37 en queratinocitos tratados con niacinamida durante 18 horas. Se estudió LPS (20 μg/ml) usado como control positivo, para desencadenar la expresión génica de AMP psoriasina y LL-37 en queratinocitos primarios después de 18 horas usando el procedimiento dado anteriormente. Se dan los resultados en cuanto a cambio de múltiplo de variación en la tabla-2 a continuación.

#### 60 Tabla-2

Ejemplo	Muestra	Múltiplo de variación
1	Control para la expresión génica de LL-37	1,0
2	LPS de control positivo (25 \g/ml) para la expresión génica de LL-37	3,9

3	Niacinamida (1,22 mg/ml) para la expresión génica de LL-37	2,4
4	Control para la expresión génica de psoriasina	1,0
5	LPS de control positivo (25 \g/ml) para la expresión génica de psoriasina	2,3
6	Niacinamida (1,22 mg/ml) para la expresión génica de psoriasina	1,1

Los datos en la tabla-2 anterior indican que la niacinamida fue incapaz de inducir la expresión génica de psoriasina incluso a una concentración muy alta (1,22 mg/ml), pero sorprendentemente, la niacinamida fue capaz de inducir la secreción de AMP psoriasina que se detectó usando la técnica ELISA.

Ejemplos 7 a 12: Experimentos *in vivo* con lociones para la piel que contienen niacinamida para demostrar la secreción inducida de psoriasina y LL-37 en la piel

Para confirmar los hallazgos de los experimentos *in vitro*, se sometió a prueba el efecto de la niacinamida en voluntarios humanos sanos *in vivo*. Se les pidió a los voluntarios que aplicaran una loción con y sin niacinamida (3%) sobre su antebrazo dos veces al día. Después de 7 días de aplicación, se extrajeron los puntos en PBS y se realizó ELISA para la detección de AMP psoriasina y LL-37.

## Procedimiento del estudio in vivo

5

15

20

25

55

#### Preparación de cultivo de *E. coli*

Se inoculó reserva de glicerol de *E. coli* (10536) en 30 ml de medio TSB y se incubó el cultivo durante la noche a 37°C en una estufa de incubación agitadora. Se subcultivó el cultivo cultivado durante la noche en tubos de agar inclinados TSA y se incubó durante la noche a 37°C luego se almacenaron los tubos de agar inclinados a 4°C (una vez en 15 días, se prepararon los tubos de agar inclinados de nuevo).

Se subcultivó el cultivo de *E. coli* de tubo de agar inclinado en una placa TSA y se incubó durante la noche a 37ºC. Se suspendió el cultivo en placa crecido durante la noche de *E. coli* en de 6 a 7 ml de tampón de fosfato de sodio (10 mM). Se ajustó la densidad de cultivo hasta 1 DO<sub>620</sub> usando un espectrofotómetro y se usó para ensayos clínicos.

#### Método de extracción de recogida de microorganismos por lavado

Esta técnica está incluida en el método ASTM, E2752 - 10 (Standard guide for evaluation of residual effectiveness of antibacterial). La cubeta y varilla estaban hechas de teflón y el área de la cubeta es de 2,84 cm². Se usó la cubeta para sostener el tampón sobre la piel y se usó la varilla para lavar, para una mejor recuperación de AMP de la piel y/o bacterias residuales de la piel. La duración del limpiado fue de 1min. Se recogió la muestra extraída en un tubo Eppendorf de 1,5 ml para análisis (apéndice-1).

Estimación de AMP psoriasina y LL-37 y enumeración de *E. coli* residual de piel humana mediante método de recogida de microorganismos por lavado

Se aplicaron 10 µl de cultivo de *E. coli* 1 DO<sub>620</sub> en un área de 2,27 cm² en el área marcada sobre el antebrazo (punto sin crema, crema base y crema de niacinamida aplicadas). Se extendió el cultivo uniformemente sobre cada punto. Después de 15 min tiempo de contacto, se extrajeron las muestras mediante método de recogida de microorganismos por lavado en 1 ml de PBS. Se recogieron las muestras en un tubo de microcentrífuga estéril.

En la muestra extraída, se usaron 800 l para enumerar la E. *coli* residual mediante un método microbiológico convencional (sembrado en placa 100 l de muestras sin diluir, diluidas -1 y -2 en placa de agar de MacConkey mediante método de recuento por extensión en placa). Se usaron los 200 l restantes de la muestra para analizar el nivel de psoriasina y de LL-37 mediante ELISA usando kits normalizados. Se usó la muestra pura para comprobar el nivel de LL-37 en las muestras. En el caso de psoriasina se diluyeron las muestras hasta 1:25 en tampón de dilución (que se proporcionó junto con el kit) y se usaron 100 l de muestras diluidas para análisis.

## Diseño del estudio in vivo

- 1. Se les pidió a los voluntarios que viniesen al sitio del estudio después del baño cada día por la mañana.
- 2. Se marcó un área de 6,25 cm<sup>2</sup> de área (2,5 x 2,5 cm) en el antebrazo interno usando un rotulador y escala. Se marcaron tres áreas en el antebrazo, excluyendo la muñeca (5 cm desde la base de la palma). (Se dio un rotulador a cada voluntario para marcar el área si se vuelve apagada o se borra).
  - 3. Se pesaron alícuotas de 62,5 mg de las formulaciones en recipientes estériles (placas redondas de plástico

# 6

de 35 mm) y se les dieron a los voluntarios.

- 4. Se les pidió a los voluntarios que aplicasen las formulaciones (62,5 mg/6,25 cm² de área) en los puntos delineados en el antebrazo. (El orden de aplicación fue formulación base seguida por formulaciones que contienen principios activos). Se extendieron las formulaciones sobre el área durante -30 s cada una.
- 5. Después de la aplicación de cada formulación se limpió el dedo con pañuelos desechables estériles.
- 6. Se pesaron alícuotas similares de 62,5 mg formulación en placas de Petri de plástico de 35 mm estériles y se sellaron con Parafilm y se dieron a cada voluntario para aplicarlas por la noche (antes de dormir).
  - 7. Se repitieron las etapas 3 a 6 durante 7 días para un estudio de 7 días. En el caso de estudio de un día se hizo la valoración en el segundo día.
- 8. En el día 8 se les pidió a los voluntarios que viniesen al sitio del estudio por la mañana sin lavarse los antebrazos.
  - 9. Se lavaron los antebrazos de los voluntarios (por los investigadores) con jabón no antibacteriano (jabón Lux).
- 20 10. Se retiró el exceso de agua secando dando palmaditas usando pañuelos desechables estériles.
  - 11. Se les pidió a los voluntarios que esperasen durante 6 h sin tocarse el antebrazo.
- 12. Se marcó un área circular de 2,27 cm² en cada punto de aplicación de crema usando una plantilla y se añadieron 10 μl de cultivo de *E. coli* 10536 correspondientes con de 1X10<sup>8</sup> a 1X10<sup>9</sup> células/ml a cada área circular y se extendieron uniformemente.
  - 13. Después de 15 min de tiempo de contacto, se recuperó *E. coli* mediante método de recogida de microorganismos por lavado usando 1 ml de 1X PBS. La duración de la extracción fue de 1 min.
  - 14. Se analizaron las muestras para determinar el recuento bacteriano mediante método de recuento por extensión en placa en agar de MacConkey.

El log residual de *E. Coli* en el área del antebrazo en los diversos experimentos está resumido en la tabla-3 y tabla-4 a continuación:

Tabla-3: Log residual de E. coli medido después de un día de aplicar de una composición (n= 28)

Ejemplo	Muestra	Múltiplo de variación
7	Log residual basal de <i>E. coli</i>	4,21
8	Log residual cuando se aplicó loción sin niacinamida	3,44
9	Log residual cuando se aplicó loción con niacinamida al 3%	2,31

Tabla-4: Log residual de *E. coli* medido después de 7 días de aplicar una composición (n= 34)

	3	- /
Ejemplo	Muestra	Múltiplo de variación
10	Log residual basal de <i>E. coli</i>	4,41
11	Log residual cuando se aplicó loción sin niacinamida	3,56
12	Log residual cuando se aplicó loción con niacinamida al 3%	2,39

Los datos en la tabla-3 anterior indican que una composición que comprende niacinamida es capaz de reducir bacterias incluso después de un día de su uso mientras que la tabla-4 indica que este efecto se retiene durante un largo periodo de tiempo (aplicación de siete días).

45 Ejemplo 13: Experimento para determinar los tipos y cantidades de péptidos antimicrobianos (AMP) secretados debido a la inducción por niacinamida.

Se usó el siguiente procedimiento para determinar los AMP inducidos como consecuencia de la niacinamida sobre células queratinocíticas.

1. Se sembraron queratinocitos primarios en placas de 12 pocillos con 1 ml de medio completo KGM. (Se sembraron 60.000 células/pocillo en el pase 4).

50

40

5

10

30

- 2. Se incubaron las placas en la estufa de incubación de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.
- 3. Después de 48 horas de incubación, se trataron las células con y sin niacinamida en concentración de 1 mg/ml en pocillos duplicados (se usaron medios recién preparados para el tratamiento).
- 4. Después de 72 horas de incubación, se transfirió el sobrenadante del cultivo celular a tubos Eppendorf de 1,5 ml respectivamente.
- 5. Se pasaron luego las muestras a través de filtros con punto de corte de 20 kDa para retirar proteínas de alto peso molecular.
  - 6. Se transfirieron las muestras eluidas, que contenían proteínas con < 20 kDa en tubos de centrífuga estériles de 15 ml.
- Luego, se añadió acetona enfriada (calidad para HPLC) a las muestras eluidas (1 ml de muestra:4 ml de acetona)
  - 8. Se transfirieron los tubos hasta -20ºC durante 24 horas para precipitar las proteínas.
- 20 9. Después de 24 horas, se centrifugaron los tubos a 14000 g durante 40 minutos a 4ºC.
  - 10. Se descartó el sobrenadante y se analizó el sedimento de proteína usando espectrometría de masas para proteínas.
- Los datos sobre los niveles aumentados de secreción de diversos AMP están tabulados en la tabla-5. Se mide el nivel aumentado de secreción de AMP mediante un valor de PSM (una función de puntuación de coincidencia de espectro de péptido) que es una medida relativa de la abundancia del péptido en el secretomo.

#### Tabla-5

5

10

Tabla-5		
AMP secretado	Valor de PSM sin tratamiento con niacinamida (muestra de control)	Valor de PSM con tratamiento con niacinamida
Lactoferrina	1	7
Lipocalina-2	1	4
S-100-A8	1	3
S-100-A11	2	5
Elafina	1	3
Lisozima C	2	4
S100-A9	2	4
Lipocalina-1	0	2

30

35

40

50

Los datos en la tabla-5 indican que hay un nivel significativamente alto de secreción de diversos AMP como consecuencia del uso de niacinamida.

Ejemplos 14 a 17: Estudio con voluntarios humanos sobre la capacidad de la piel de defenderse a sí misma contra infecciones

Se llevó a cabo un experimento usando el siguiente protocolo:

- 1. Se les dio a los voluntarios jabón Lux™ para su uso y se les pidió que no usasen ningún otro jabón o hidratante sobre su antebrazo durante 7 días antes del comienzo del estudio.
- 2. Se les pidió a los voluntarios que aplicasen crema de base Vaseline™ healthy white y Vaseline™ healthy white formulada con niacinamida (1%, 2% y 3%) en diversos puntos sobre el antebrazo.
- 45 3. Se les pidió a los voluntarios que repitiesen la etapa 1 dos veces al día durante 1 día, por la mañana después del baño y por la noche justo antes de dormir. Se les pidió a los voluntarios que no se lavasen los antebrazos después de la aplicación de las formulaciones por la noche.
  - 4. En el día 2, el investigador lavó los antebrazos con una pastilla de jabón no antibacteriana y pidió a los voluntarios que esperasen durante 6 horas en condiciones controladas (24 ±2°C y 45%±5% de HR)

- 5. Después de 6 horas de espera, se aplicaron  $\sim 10^6$  *E. coli* sobre el antebrazo a cada punto por separado. El tiempo de contacto de *E. coli* en la piel fue de 15 minutos.
- 6. Después de 15 minutos, se extrajo la muestra del antebrazo usando el método cubeta-varilla.
  - 7. Se contó E. coli usando un método microbiológico convencional.

Los datos sobre el recuento de E. coli para los diversos tratamientos están resumidos en la tabla-6.

#### Tabla-6

100.0	Table 0		
Ejemplo	Muestra	Log residual de <i>E. coli</i>	
15	Control	4,3	
16	Niacinamida al 1%	3,5	
17	Niacinamida al 2%	3,0	
18	Niacinamida al 3%	2,7	

Los datos en la tabla-6 indican que el uso de niacinamida eleva la inmunidad inherente de la piel contra bacterias invasoras.

15

5

10

Por tanto, la invención contempla un nuevo uso de la niacinamida no conocido hasta ahora que es inducir la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) cuando se aplica sobre la superficie externa del cuerpo humano.

## **REIVINDICACIONES**

- 1. Uso no terapéutico de niacinamida para la inducción de secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) de queratinocitos cuando se aplica sobre una superficie externa del cuerpo humano.
- 2. Uso no terapéutico según la reivindicación 1, para mejorar la inmunidad de dicha superficie externa.

5

3. Uso no terapéutico según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha superficie externa incluye piel, cuero cabelludo o cavidad oral.