

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 707**

51 Int. Cl.:

A61K 8/02 (2006.01)

A61K 8/46 (2006.01)

A61K 8/67 (2006.01)

A61K 8/19 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/IB2013/051438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13124821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13751594 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2816993**

54 Título: **Producto para el cuidado de la piel para remover el hierro y procedimiento de preparación del mismo**

30 Prioridad:

23.02.2012 CN 201210041549

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**FE:I BEAUTY TECH, INC. (100.0%)
251 Little Falls Drive
Wilmington, DE 19808, US**

72 Inventor/es:

HUANG, XI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 745 707 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

Producto para el cuidado de la piel para remover el hierro y procedimiento de preparación del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención introduce una clase novedosa de productos para el cuidado de la piel destinados a remover el hierro en la piel y su procedimiento de preparación.

10 **Antecedentes técnicos**

A lo largo de la vida de una mujer, la menopausia tiene el mayor impacto en su salud. Debido a la menopausia, la estructura y función de la piel cambia más que cualquier otro órgano. Durante la transición menopáusica y después de la menopausia, la piel se vuelve más delgada, seca y forma más arrugas que antes de la menopausia. Estas dolencias se deben principalmente a la disminución del contenido de colágeno y su capacidad para mantener la humedad. Por lo tanto, la piel se vuelve más susceptible al daño causado por factores ambientales como la luz ultravioleta (UV) y el ozono (Miquel J., Ramirez-Boscá A., Ramirez-Boscá J.V., Alperi J.D. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants (Menopausia: una revisión sobre el papel del estrés por oxígeno y los efectos favorables de los antioxidantes dietéticos). Arch Gerontol Geriatr 42:289-306).

Los inventores han descubierto que, después de la menopausia, los niveles séricos de ferritina, una proteína de almacenamiento de hierro con una capacidad de unión de hasta 4500 átomos de hierro por molécula de ferritina y un indicador del estado del hierro corporal, aumentaron de 2 a 3 veces (**Figura 1**) (Jian, J., Pelle, E. y Huang, X. 2009. Iron and menopause: does increased iron affect the health of postmenopausal women? (Hierro y menopausia: ¿el aumento del hierro afecta la salud de las mujeres posmenopáusicas?) Antioxid Redox Signal 11:2939-2943). Los niveles de ferritina en la piel aumentan en un 40% (**Figura 2**). Después de la conversión, hemos encontrado que la concentración de ferritina sérica en las mujeres está entre 0,94-1,3 ng/mg de proteína. La concentración promedio de ferritina en la piel posmenopáusica es de aproximadamente 542 ng/mg de proteína (**Figura 2**). Por lo tanto, nuestro estudio ha demostrado que la concentración de ferritina en la piel es de 400 a 575 veces mayor que la del suero. Debido a que el cuerpo humano no tiene otros medios para excretar el hierro, excepto la menstruación y la descamación, la piel se convierte en un objetivo muy importante para el hierro en mujeres peri y posmenopáusicas (Andrews, N.C. 1999. Disorders of iron metabolism (Trastornos del metabolismo del hierro). N Engl J Med 341:1986-1995).

El aumento de hierro puede producir grandes cantidades de radicales libres en la piel. Además, también hemos encontrado que el aumento de hierro sensibiliza la piel a la luz ultravioleta (UV), causando daños mediados por los rayos UVA (**Figura 3**) (Jian, J., Pelle, E., Yang, Q., Pernodet, N., Maes, D. y Huang, X. 2011. Iron sensitizes keratinocytes and fibroblasts to UVA-mediated matrix metalloproteinase-1 through TNFalpha and ERK activation (El hierro sensibiliza los queratinocitos y los fibroblastos a la metaloproteinasa de matriz 1 mediada por UVA a través de la activación de TNF-alfa y ERK). Exp. Dermatol 20:249-254). Por ejemplo, después de la exposición a los rayos UVA, la actividad de la metaloproteinasa de matriz 1 (MMP-1) aumentó significativamente en fibroblastos dérmicos humanos primarios con una alta concentración de hierro en comparación con los mismos fibroblastos que contienen una concentración de hierro normal (Jian, J., Pelle, E., Yang, Q., Pernodet, N., Maes, D. y Huang, X. 2011. Iron sensitizes keratinocytes and fibroblasts to UVA-mediated matrix metalloproteinase-1 through TNFalpha and ERK activation. Exp Dermatol 20:249-254). Hasta ahora, la deficiencia de estrógenos ha sido considerada como la causa principal del envejecimiento de la piel en mujeres de mediana edad (Brincat, M.P., Baron, Y.M. y Galea, R. 2005. Estrogens and the skin (Los estrógenos y la piel). Climacteric 8:110-123). Sin embargo, según nuestros hallazgos, una disminución en el estrógeno no es la única causa de adelgazamiento de la piel, pérdida de elasticidad de la piel, aumento de la formación de arrugas y sensibilización de la piel a la exposición al sol en mujeres posmenopáusicas. Debido a que la terapia de reemplazo de estrógenos aumenta el riesgo de cáncer (Nelson, H.D., Humphrey, L.L., Nygren, P., Teutsch, S.M. y Allan, J.D. 2002. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review (Terapia de reemplazo hormonal posmenopáusica: una revisión científica). Jama 288:872-881), es necesario desarrollar otras alternativas.

El hierro es un elemento esencial en el cuerpo humano. Es un componente importante del hemo, que es responsable del transporte de oxígeno en los glóbulos rojos. El hierro también participa en la síntesis de ADN y otras funciones enzimáticas. El exceso de hierro se almacena en ferritina y se excreta a través de la descamación de la piel. La ferritina es una fuente importante de hierro en la piel y sensibiliza la piel a la exposición al sol y al daño oxidativo. Por lo tanto, la remoción del hierro de la ferritina puede mejorar la apariencia de la piel. En la actualidad, la quelación de hierro es la terapia principal para remover el hierro del cuerpo humano. Sin embargo, los quelantes de hierro son químicos y tienen efectos secundarios considerables. Por ejemplo, los agentes quelantes se utilizan principalmente para la desintoxicación del envenenamiento por metales o la remoción del exceso de hierro debido a una transfusión de sangre. En el caso de tratar la sobrecarga de hierro, generalmente se administran por inyección intravenosa o intraperitoneal (Jomova, K. y Valko, M. 2011. Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease (Importancia de la quelación de hierro en el estrés oxidativo inducido por radicales libres y la enfermedad humana). Curr Pharm Des 17:3460-3473).

En la actualidad, existe una clase novedosa de quelantes de hierro para evitar el fotoenvejecimiento de la piel (Yiakouvaki, A., Savovic, J., Al-Qenaei, A., Dowden, J. y Pourzand, C. 2006. Caged-iron chelators a novel approach towards protecting skin cells against UVA-induced necrotic cell death (Quelantes de hierro encerrados: un nuevo enfoque para proteger las células de la piel contra la muerte celular necrótica inducida por rayos UVA). J Invest Dermatol 126:2287-2295). En condiciones fisiológicas normales, este tipo de quelante de hierro no tiene capacidad para quelar el hierro. Sin embargo, después de la exposición a los rayos UVA, se activa y luego quela el hierro. Este tipo de agentes quelantes se llama quelante de hierro "encerrado". Desafortunadamente, debido a que son químicos, pueden tener diferentes grados de efectos secundarios en la piel, FR2946530 divulga composiciones para mantener la elasticidad de la piel que comprende polvo de perlita y vitamina C.

Hasta ahora, la técnica antecedente no se había dirigido específicamente al hierro en la piel. Por lo tanto, desde el punto de vista clínico, es muy importante buscar mejores procedimientos y productos para remover el hierro en la piel que el quelante. La solicitud de patente china CN1965801A divulgó productos para el cuidado de la piel, que en realidad se colocaron en dos paquetes separados: Crema Corporal y Factor Revitalizante. Esta solicitud de patente solo consideró la absorción efectiva de los ingredientes y no consideró la remoción efectiva del hierro. La crema corporal es una emulsión con un pH ácido. El factor revitalizante es un polvo con un pH alcalino. Debido a las propiedades ácidas y alcalinas de los dos paquetes, no se mezclaron entre sí. Además, esta solicitud de patente utilizaba nanopartículas y las nanopartículas podrían penetrar en el sistema de circulación y causar toxicidad.

Sumario de la invención

Las deficiencias de las tecnologías existentes en el mercado actual de productos para el cuidado de la piel incluyen: toxicidad de los quelantes de hierro para las células de la piel; falta de productos para el cuidado de la piel disponibles que remuevan el hierro en la piel de manera segura y efectiva. Por lo tanto, los efectos antienvjecimiento de los productos actuales para el cuidado de la piel son limitados. La presente invención desarrolla una clase novedosa de productos para el cuidado de la piel que remueven el hierro en la piel y proporciona un procedimiento de preparación para los mismos.

Las soluciones técnicas proporcionadas por la presente invención son las siguientes:

Los ingredientes de los nuevos productos para el cuidado de la piel incluyen matriz y componentes principales. Los componentes principales consisten en uno o más agentes reductores y agentes precipitantes, en los que la relación molar del agente reductor al agente precipitante es 1:3-6, preferentemente 1:5; los componentes principales en los productos para el cuidado de la piel representan 5% - 10% p/p, preferentemente 5%; los valores de pH del producto para el cuidado de la piel están entre 6,6 y 7,4, preferentemente 7; el diámetro de partícula del agente precipitante para el cuidado de la piel está en el intervalo submicrométrico (0,1-1 micrómetros). Además, la matriz está fabricada de compuestos convencionales para el cuidado de la piel;

En el que el agente reductor se selecciona de vitamina C, vitamina E, glutatión, vitamina A, vitamina D y sus derivados;

En el que el agente precipitante se selecciona de carbonato de calcio, polvo de perlas, carbonato de magnesio, carbonato de bario, fosfato de calcio, fosfato de magnesio, fosfato de bario, silicato de calcio, silicato de magnesio y silicato de bario.

Un procedimiento de preparación de la clase novedosa de productos para el cuidado de la piel para remoción de hierro, como se establece en la presente invención, comprende las siguientes etapas:

1. Moler las partículas del agente precipitante a un tamaño de partícula de 1-5 micrómetros, preferentemente 1-3 micrómetros;

2. Suspender las partículas del agente precipitante a una concentración de 100 mg/ml en agua desionizada y saturada de nitrógeno y agitar de modo que las partículas pequeñas floten en la parte superior y las partículas más grandes permanezcan en la parte inferior del recipiente;

3. Agregar lentamente el agente reductor al fondo de la suspensión de agente precipitante. Esto sirve para usar la acidez del agente reductor para reducir el tamaño de partícula del agente precipitante en partículas submicrométricas. Después de que la reacción se complete sin que las burbujas hiervan a fuego lento, calentar suavemente la mezcla de reacción a 45 °C. En condiciones de vacío, reducir el volumen de la mezcla de reacción en aproximadamente un 50%. Obtener los componentes principales del cuidado de la piel con una relación molar final del agente reductor al agente precipitante entre 1:3-6, preferentemente 1:5;

4. Colocar los componentes principales en la matriz. Después de mezclar, los componentes principales

representan 5% - 10% (p/p). Ajustar el pH a 6,6-7,4.

En el que la velocidad de agitación en la etapa (2) es de 200-500 rotaciones por minuto;

5 En el que la relación molar del agente reductor al agente precipitante y la concentración relativa de los componentes principales en los productos para el cuidado de la piel juegan un papel importante en la capacidad de los productos para el cuidado de la piel para remover el hierro. Si la cantidad del agente precipitante excede la del agente reductor, podría favorecer la reacción hacia la precipitación de hierro inmediatamente después de su reducción. Los componentes principales necesitan alcanzar ciertas concentraciones para remover efectivamente el hierro en los productos para el cuidado de la piel; en el que el tamaño de partícula del agente precipitante es crítico; en el intervalo submicrométrico, el agente precipitante puede penetrar en la epidermis de la piel, pero no en el sistema de circulación sanguínea.

15 En la presente invención, el agente reductor es preferentemente vitamina C, mientras que el agente precipitante es preferentemente carbonato de calcio.

20 La ferritina, una de las proteínas principales, sensibiliza la exposición de la piel al sol al inducir fuertemente la actividad de la metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1). Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo remover el hierro de la ferritina. La ferritina tiene una fuerte afinidad de unión por el hierro trivalente (férrico) pero no tiene afinidad por el hierro divalente (ferroso). De acuerdo con esta característica físico-química, la presente invención usa un agente reductor, como la vitamina C, para liberar el hierro de la ferritina (**Figura 4**). Si solo se usa vitamina C, la ferritina puede liberar hierro, pero también puede continuar ejerciendo su efecto nocivo. Para evitar que esto ocurra, la presente invención emplea un producto natural de carbonato de calcio (CaCO₃) para precipitar el hierro liberado (**Figura 5**). El carbonato de calcio es insoluble en agua y su pH neutro puede causar fácilmente la precipitación del hierro inmediatamente después de su liberación de ferritina por la vitamina C. Por supuesto, si solo se usa carbonato de calcio, no puede precipitar el hierro de manera efectiva, porque el hierro todavía está almacenado en la ferritina.

30 En comparación con la técnica antecedente, los efectos beneficiosos de la presente invención son los siguientes:

1. Una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio puede disminuir efectivamente la formación de ferritina mediada por hierro (**Figura 6**), así como inhibir la peroxidación lipídica (**Figura 7**) en queratinocitos epidérmicos humanos primarios normales.

35 2. La presente invención usa una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio como inductor desferrizante (DII) y agrega esta mezcla a los productos para el cuidado de la piel de modo que constituya hasta 5% - 10% (p/p) del producto. La alta concentración de los componentes principales es capaz de reducir el hierro y precipitar el hierro y, por lo tanto, remueven el hierro de la ferritina de manera efectiva. Mediante el uso simultáneo de los dos productos naturales en dos etapas con la primera etapa para reducir el hierro de la ferritina, seguido de la precipitación de hierro en la piel, esta invención logra el objetivo de prevenir el envejecimiento en la piel posmenopáusica.

45 3. El procedimiento de preparación propuesto en la presente invención puede producir poderosamente partículas submicrométricas de carbonato de calcio (**Figura 8**), mientras se preserva la capacidad reductora de la vitamina C. La vitamina C y el carbonato de calcio se mezclan previamente para producir partículas submicrométricas. Estas partículas submicrométricas pueden entrar efectivamente en la piel (**Figura 9**) y remover el hierro de la piel. Sin embargo, no penetran en el sistema de circulación sanguínea. Los ensayos clínicos mostraron que la mezcla de éstos dos elementos puede ser la mejor para remover el hierro de la piel y prevenir el envejecimiento de la piel (**Figura 10**, **Figura 11**).

50 4. Los productos para el cuidado de la piel en la presente invención tienen un pH neutro, que estabiliza la vitamina C y el calcio en los productos.

Leyendas de las figuras

55 **Figura 1.** Cambios concurrentes pero inversos de ferritina versus estrógeno durante la transición menopáusica.

60 **Figura 2.** Diferencias en los niveles de ferritina entre muestras de biopsia de piel de mujeres pre- y posmenopáusicas.

Figura 3. Efectos de los rayos UVA y el hierro sobre las actividades de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos primarios.

65 **Figura 4.** Reducción de los efectos de la vitamina C sobre el hierro de la ferritina.

Figura 5. Efectos precipitantes del carbonato de calcio sobre el hierro.

Figura 6. Inhibición de la formación de ferritina por los componentes principales de la invención.

Figura 7. Inhibición de la peroxidación lipídica por los componentes principales de la invención.

Figura 8. Análisis del tamaño de partícula de carbonato de calcio con o sin tratamiento con vitamina C.

Figura 9. Comparación de penetraciones de partículas submicrométricas y micrométricas de carbonato de calcio en el modelo tridimensional de la piel.

Figura 10. Resultados del cuestionario de ensayo clínico sobre la tasa de satisfacción después de usar el producto para el cuidado de la piel de la presente invención.

Figura 11. Mejoras en la piel después de usar el producto para el cuidado de la piel de la presente invención.

Descripción de las realizaciones

En conjunto con los dibujos y las realizaciones, la presente invención se explica adicionalmente en los detalles a continuación:

Realización 1:

Cambios en los niveles de estrógeno y ferritina durante la transición menopáusica: los niveles séricos de 17β -estradiol (E2) se convirtieron al % del valor máximo a 500 pg/ml de suero a los 25 años de edad. Los niveles de ferritina se expresaron como ng/ml de suero. Los datos de E2 en función de la edad se obtuvieron del sitio web http://www.drlam.com/A3R_brief_in_doc_format/Estrogen_Dominance.cfm. Los datos de ferritina se obtuvieron de la Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES III) en los Estados Unidos (**Figura 1**).

Estudios en humanos: los estudios se realizaron después de obtener el consentimiento informado de acuerdo con la aprobación de la Junta de Revisión Institucional local. Se obtuvieron muestras de biopsia por punción de 3 mm en piel humana de seis mujeres premenopáusicas y seis mujeres posmenopáusicas perforando los brazos superior, interno izquierdo y derecho. El peso de la piel varió de 3 a 50 mg. Después de moler con un Dremel mini-Tissue Homogenizer en 400 μ l de tampón de lisis M-PER en presencia de un cóctel inhibidor de proteínas (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL), los extractos de proteínas se recogieron después de remover los desechos mediante centrifugación. Las concentraciones de proteína total extraída de las muestras de piel se determinaron mediante un ensayo de ácido bicinonínico (BCA). Los extractos de proteínas restantes se usaron para mediciones de ferritina. En el estudio se presentaron dos puntos de datos (brazo izquierdo y derecho) por sujeto. Los resultados se expresaron como ng de ferritina por mg de proteína total y se presentan en la **Figura 2**. La edad media de las mujeres posmenopáusicas fue de $58,8 + 1,3$ años ($n = 5$) y el nivel medio de ferritina en la piel posmenopáusica fue de $542,4$ ng/mg de proteína. La edad media de las mujeres premenopáusicas fue de $41,6 + 1,7$ años ($n = 6$) y el nivel medio de ferritina en la piel premenopáusica fue de $381,6$ ng/mg de proteína. Cabe destacar que un valor atípico de la piel posmenopáusica con una ferritina del brazo izquierdo de $2.360,2$ ng/mg de proteína y una ferritina del brazo derecho de $989,0$ ng/mg de proteína se excluyó en los análisis. De lo contrario, la diferencia sería aún más significativa (**Figura 2**).

Cultivo celular y exposición a los rayos UVA: Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos primarios en placas de 6 pocillos y se privaron de suero en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (FBS) al 0,1%. De acuerdo con la **Figura 1**, se desarrollaron dos condiciones de cultivo celular con las mujeres posmenopáusicas que simulan bajas en estrógenos y altas en hierro y las mujeres premenopáusicas que simulan altas en estrógenos y bajas en hierro. En condiciones premenopáusicas (Pre-), el nivel de 17β -estradiol (E2) en el medio de cultivo celular es de 500 ng/ml y el de apotransferrina (Tf, sin hierro) es de 5 μ g/ml. En la condición posmenopáusica (Post-), el nivel de ferritina es de 20 ng/ml y el de holo-Tf (el hierro está 100% saturado en los dos sitios de unión de Tf) es de 5 μ g/ml. Después de privación durante la noche, los fibroblastos cultivados bajo las condiciones de control, Pre- o Post- se expusieron a rayos UVA a 50 kJ/m². Los medios se recogieron 24 h después para las mediciones de las actividades de la metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1). Las actividades de MMP-1 se midieron mediante el ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) siguiendo el protocolo del fabricante (AnaSpec, San José, CA). A modo de resumen, se añadieron 100 μ l de muestra o 100 μ l de patrón en la placa pre-recubierta con anticuerpo anti-MMP-1 durante 2 h. Después del lavado, se añadió sustrato fluorogénico MMP, péptido 5-FAM/QXL™ 520 FRET, y se cultivaron durante 16 h a temperatura ambiente. La fluorescencia se mide en Ex/Em = 490 nm/520 nm tras la escisión inducida por MMP-1 del sustrato FRET. Los resultados muestran que no hubo diferencias en los niveles de fondo de MMP-1 en fibroblastos cultivados en condiciones Pre- o Post-menopáusicas. Sin embargo, los rayos UVA indujeron significativamente actividades de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos primarios crecidos bajo la condición Post- en comparación con

fibroblastos cultivados bajo el control o condiciones previas (**Figura 3**).

5 *Reducción de hierro de ferritina por la vitamina C:* se incubó ferritina a una concentración de 1 mg/ml con diversas concentraciones de vitamina C (0-500 μ M). Después de una hora de incubación, las soluciones se filtraron usando una membrana con un límite de peso molecular de 5000 Dalton (Millipore). Los niveles de hierro en los filtrados se midieron con ferrozina (Sigma, St. Louis, MO), que forma un complejo estable de color magenta (Fe^{2+} -ferrozina) con una absorción máxima a 560 nm. A modo de resumen, se añadieron 30 μ l de muestra a 135 μ l de tampón. Después de 10 minutos de incubación a 37 °C, la absorbancia se midió a 560 nm utilizando un lector de microplacas visible a los rayos UV (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Luego, se añadieron 5 μ l de agente cromogénico de hierro (ferrozina) y después de 15 minutos de incubación, la absorbancia se midió nuevamente a 560 nm. La diferencia en la absorbancia se utilizó para calcular la concentración de hierro después de compararla con la curva estándar de hierro. Para determinar si el hierro se libera completamente de la ferritina, se utilizó la absorción atómica (AA) para medir el hierro total en ferritina. Los resultados muestran que una alta concentración de vitamina C es efectiva para liberar el hierro de la ferritina. La absorción atómica (AA) confirmó que todo el hierro en la ferritina se libera después de la reducción de la vitamina C (**Figura 4**).

20 *Precipitación de hierro por carbonato de calcio:* se añadió hierro a la matriz extracelular, seguido de la adición de diferentes concentraciones de carbonato de calcio (0-10%) (**Figura 5**). Después de varios períodos de incubación, se filtró una pequeña parte de la mezcla usando una membrana con un límite de peso molecular de 5000 Dalton como se describió previamente en la **Figura 4**. Los niveles de hierro en los filtrados se determinaron por ferrozina. Los resultados muestran que el carbonato de calcio puede precipitar efectivamente el hierro en la matriz celular.

25 *Inhibición de la formación de ferritina por los componentes principales:* los queratinocitos epidérmicos humanos primarios normales (NHEK) se sembraron en placas de 6 pocillos. Las células se pretrataron con sulfato ferroso 50 μ M durante 4 h, seguido de una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio a 10 μ g/cm² durante 20 h. Después del lavado, se recogieron las células y se extrajeron las proteínas en tampón de lisis. Después de determinar la concentración de proteína, se usó una pequeña porción de la proteína para la medición de ferritina. Los resultados muestran que una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio puede disminuir efectivamente la formación de ferritina inducida por sulfato ferroso en NHEK (**Figura 6**).

30 *Inhibición de la peroxidación lipídica por los componentes principales:* las células NHEK se trataron como se describe en la **Figura 6**. Después de la centrifugación, se recogieron los residuos celulares para medir la peroxidación lipídica utilizando el ensayo de ácido tiobarbitúrico. Los resultados muestran que una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio puede inhibir eficazmente la peroxidación lipídica inducida por sulfato ferroso en las células primarias de NHEK (**Figura 7**).

Realización 2:

40 Se suspende el carbonato de calcio con un tamaño de partículas de aproximadamente 2 μ m a 100 mg por ml en agua desionizada y saturada de nitrógeno.

45 1. Moler el carbonato de calcio a un tamaño de partícula de aproximadamente 2 μ m; (2) Suspender el carbonato de calcio a 100 mg por ml en agua desionizada y saturada de nitrógeno para evitar la oxidación de la mezcla; agitar lentamente a 200-500 revoluciones por minuto para que las partículas pequeñas floten y las partículas más grandes permanezcan en el fondo; (3) A temperatura ambiente, agregar lentamente 0,2 ml de 176 mg por ml de vitamina C al fondo de la suspensión de carbonato de calcio; usar la acidez de la vitamina C para reducir las partículas micrométricas de carbonato de calcio a partículas submicrométricas; al final de la reacción cuando no haya más burbujas, calentar suavemente la mezcla de reacción a 45 °C y reducir el volumen en aproximadamente un 50% al vacío, y la relación molar de la vitamina C al carbonato de calcio es 1:5; (4) Agregar los componentes principales, una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio, en la matriz al 5% (p/p), y ajustar el pH a 7.

Realización 3:

55 1. Moler el carbonato de calcio a un tamaño de partícula de aproximadamente 2 μ m; (2) Suspender el carbonato de calcio a 100 mg por ml en agua desionizada y saturada de nitrógeno para evitar la oxidación de la mezcla; agitar lentamente a 200-500 revoluciones por minuto para que las partículas pequeñas floten y las partículas más grandes permanezcan en el fondo; (3) A temperatura ambiente, agregar lentamente 0,33 ml de 176 mg por ml de vitamina C al fondo de la suspensión de carbonato de calcio; usar la acidez de la vitamina C para reducir las partículas micrométricas de carbonato de calcio a partículas submicrométricas; al final de la reacción cuando no haya burbujas, calentar suavemente la mezcla de reacción a 45 °C y reducir el volumen en aproximadamente un 50% al vacío, y la relación molar de la vitamina C al carbonato de calcio es 1:3; (4) Agregar los componentes principales, una mezcla de vitamina C y carbonato de calcio, en la matriz al 10% (p/p) y ajustar el pH a 7.

65

Realización 4:

5 Se obtuvieron modelos de piel EFT 400 de MatTek (Ashland, MA). Los experimentos se dividieron en dos grupos. Un grupo fue tratado con partículas micrométricas de carbonato de calcio de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 h; el otro grupo fue tratado con $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas submicrométricas de carbonato de calcio durante 24 h. Después del tratamiento, se realizó un examen histológico mediante tinción con hematoxilina y eosina y se determinaron los niveles de calcio penetrados en la piel mediante tinción con alizarina, respectivamente. Los resultados muestran que las partículas submicrométricas de carbonato de calcio preparadas por la presente invención están más dispuestas a ingresar en la piel (**Figura 9**) en comparación con las partículas micrométricas.

10

Realización 5:

15 Los participantes en ensayos clínicos usaron el producto para el cuidado de la piel de la presente invención dos veces al día, una por la mañana y otra por la noche. Después de un mes, se les pidió a los participantes que realizaran una encuesta de satisfacción después de usar el producto. Los resultados de la encuesta muestran que la tasa de satisfacción con la reconstrucción y la estimulación del nuevo colágeno y la formación de elastina es del 93% (**Figura 10**).

Realización 6:

20 Se requirió que los participantes del ensayo clínico tomaran fotografías en la esquina del ojo derecho (canto) antes de usar el producto de esta invención, y luego 3 meses después del uso continuo del producto. Los resultados muestran que las arrugas del canto, después de usar el producto de la invención, se reducen significativamente, mejorando altamente la apariencia de la piel (**Figura 11**).

25

REIVINDICACIONES

1. Un producto para el cuidado de la piel que comprende una matriz y componentes principales, en el que:
 - 5 los componentes principales consisten en al menos un agente reductor y al menos un agente precipitante, en los que la relación molar del agente reductor al agente precipitante es de 1:3-6; los componentes principales en el producto para el cuidado de la piel representan 5% -10% p/p; el valor de pH del producto para el cuidado de la piel está entre 6,6 y 7,4; la matriz comprende compuestos convencionales para el cuidado de la piel;
 - 10 el agente reductor es vitamina C, vitamina E, glutatión, vitamina A o vitamina D; y el agente precipitante es carbonato de calcio, polvo de perlas, carbonato de magnesio, carbonato de bario, fosfato de calcio, fosfato de magnesio, fosfato de bario, silicato de calcio, silicato de magnesio o silicato de bario.
- 15 2. El producto para el cuidado de la piel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación molar del agente reductor al agente precipitante es 1:5.
3. El producto para el cuidado de la piel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los componentes principales en los productos para el cuidado de la piel representan el 5% p/p.
- 20 4. El producto para el cuidado de la piel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor de pH del producto para el cuidado de la piel es 7.
5. El producto para el cuidado de la piel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el diámetro de partícula del agente precipitante se encuentra en el intervalo submicrométrico.
- 25 6. Un procedimiento de preparación de un producto para el cuidado de la piel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:
 - 30 (a) moler al menos un agente precipitante para formar partículas que tienen un tamaño de partícula de 1-5 micrómetros, en el que el agente precipitante es carbonato de calcio, polvo de perlas, carbonato de magnesio, carbonato de bario, fosfato de calcio, fosfato de magnesio, fosfato de bario, silicato de calcio, silicato de magnesio o silicato de bario;
 - 35 (b) suspender las partículas del agente precipitante en agua desionizada y saturada de nitrógeno, y agitar;
 - (c) agregar al menos un agente reductor al fondo de la suspensión de agente precipitante, luego calentar y concentrar la mezcla de reacción para formar componentes principales que consisten en al menos un agente reductor y el al menos un agente precipitante, en el que el agente reductor es vitamina C, vitamina E, glutatión, vitamina A o vitamina D, y en el que la relación molar del agente reductor al agente precipitante después de calentar y concentrar es como se define en la reivindicación 1 o 2; y
 - 40 (d) colocar los componentes principales en una matriz y ajustar el pH hasta 6,6 - 7,4, en el que la matriz comprende compuestos convencionales para el cuidado de la piel y en el que la matriz se encuentra en una cantidad tal que los componentes principales representan 5 - 10% p/p del producto para el cuidado de la piel.
- 45 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el tamaño de partícula en la etapa (a) es de 1 a 3 micrómetros.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la agitación en la etapa (b) se realiza a 200-500 rotaciones por minuto.
- 50 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el pH en la etapa (d) es 7.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que en la etapa (b), las partículas del agente precipitante se suspenden en agua desionizada y saturada de nitrógeno a una concentración de 100 mg/ml.
- 55
- 60

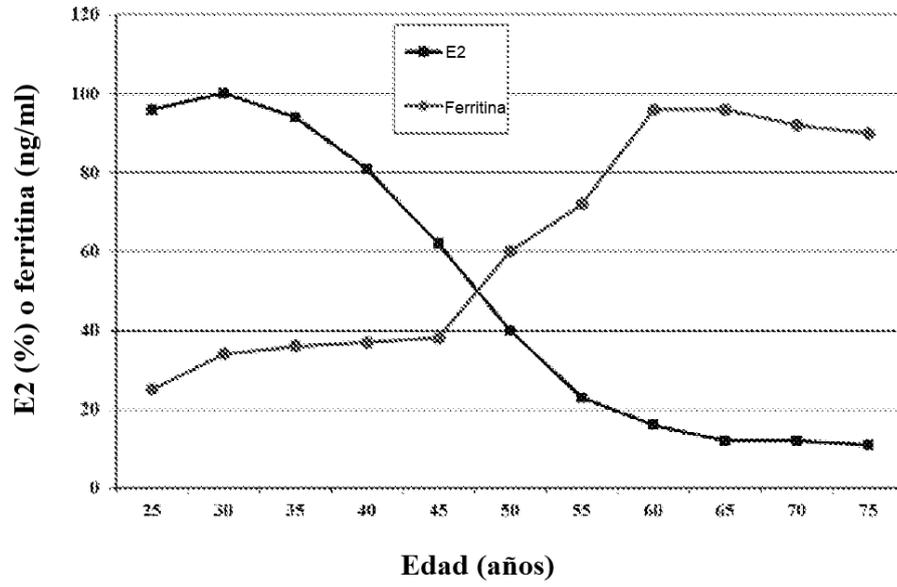


Fig. 1

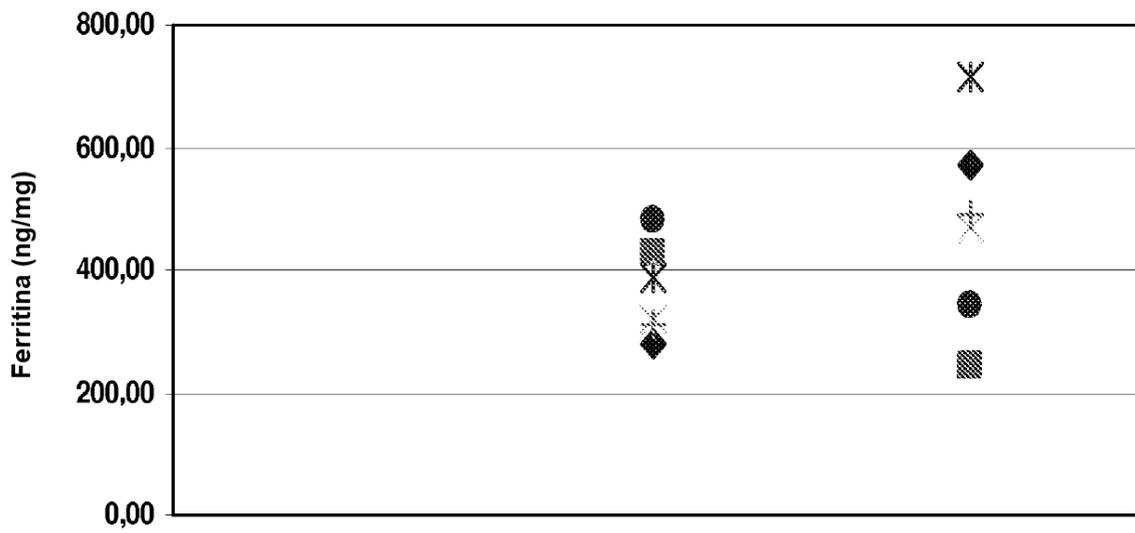


Fig. 2

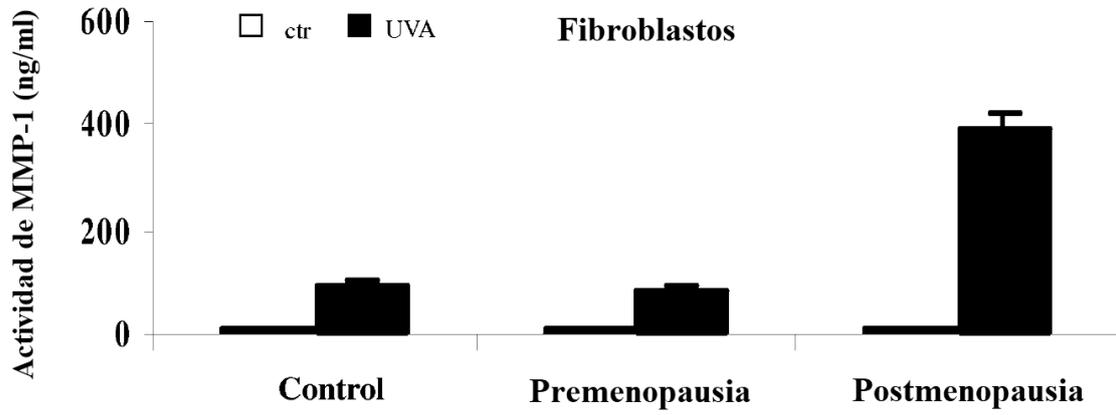


Fig. 3

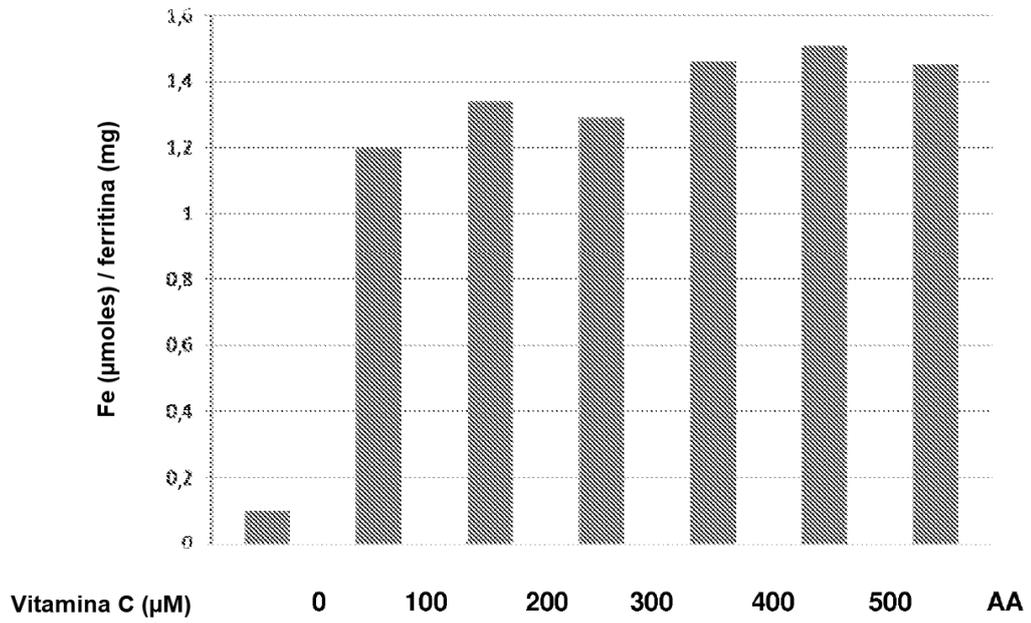


Fig. 4

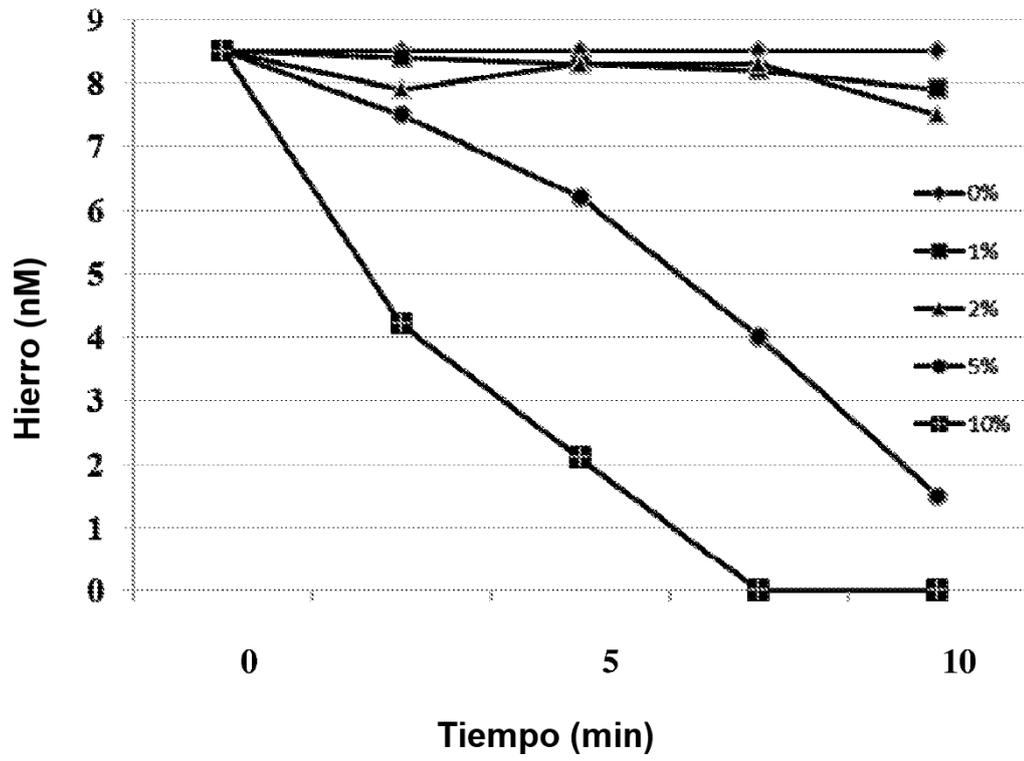


Fig. 5

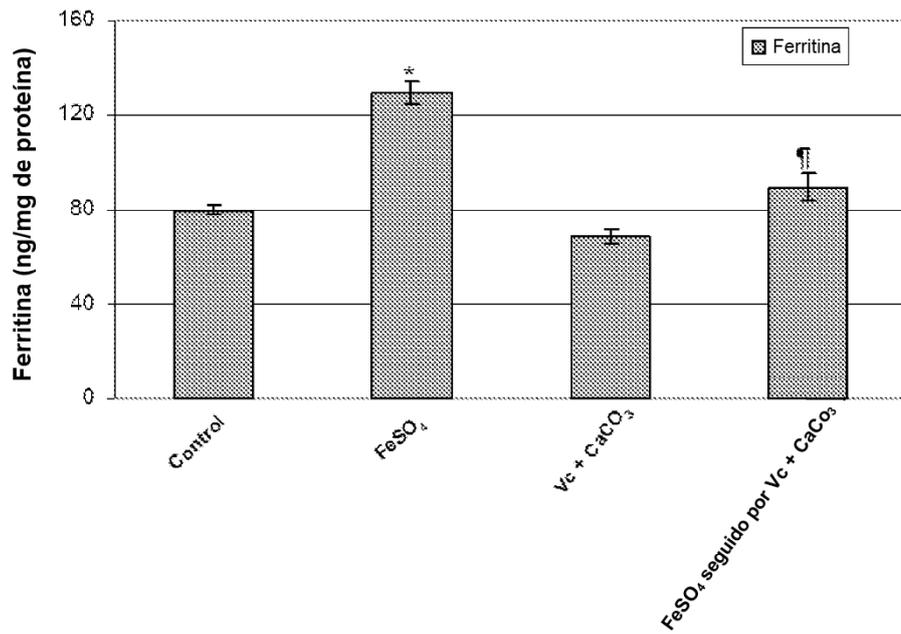


Fig. 6

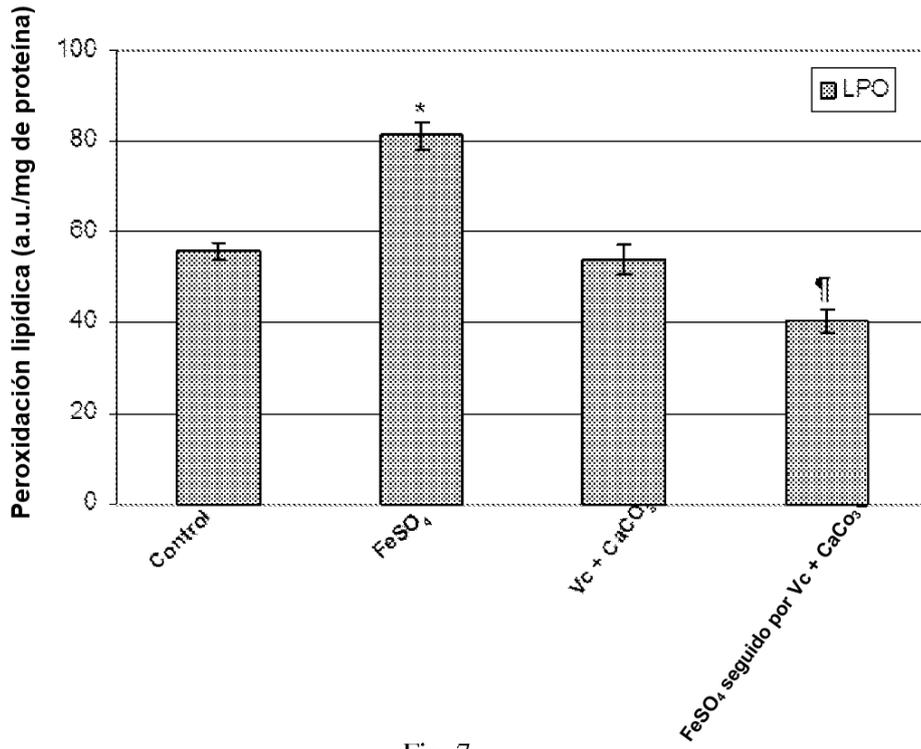
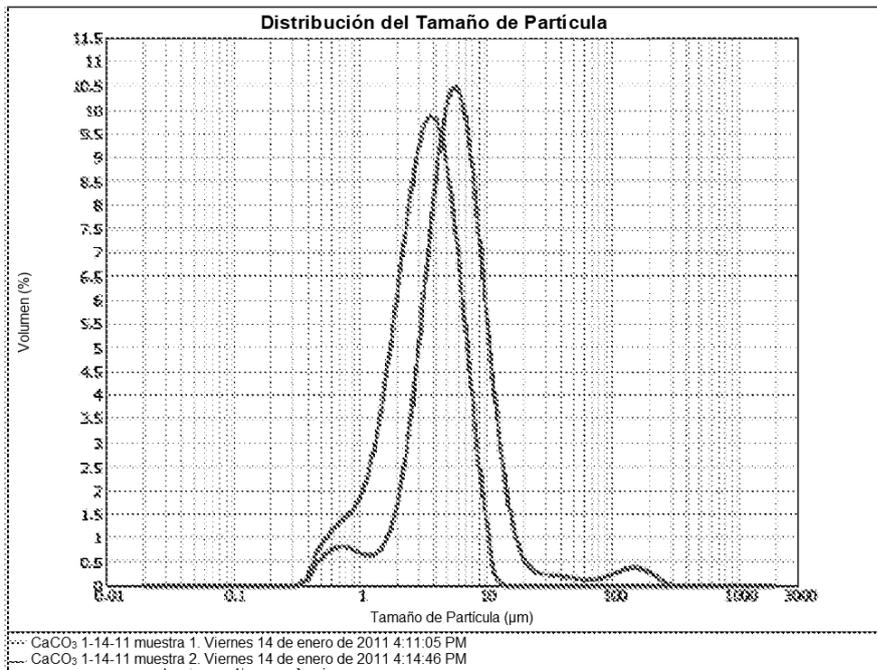


Fig. 7



Pequeño ← → Grande

Fig. 8

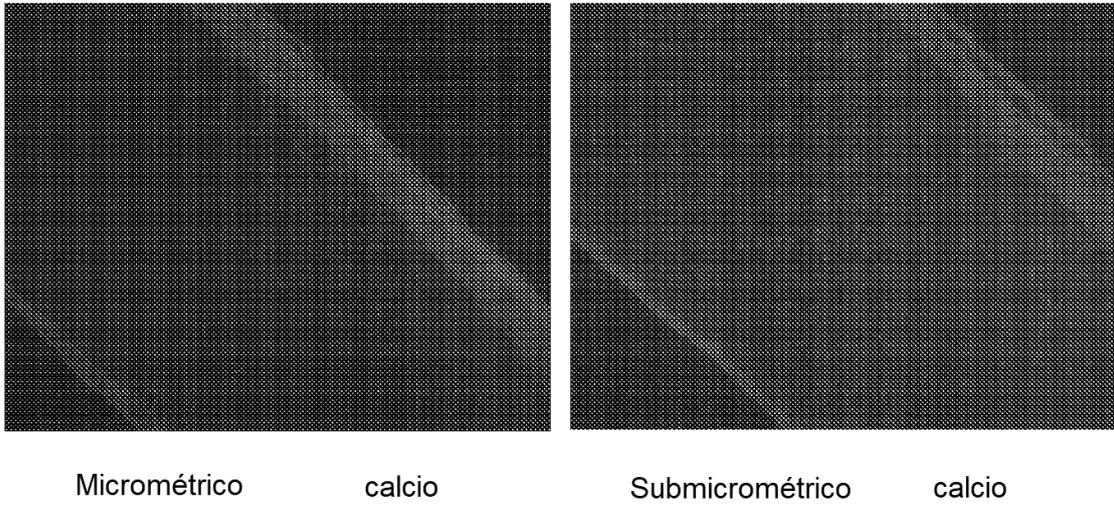


Fig. 9

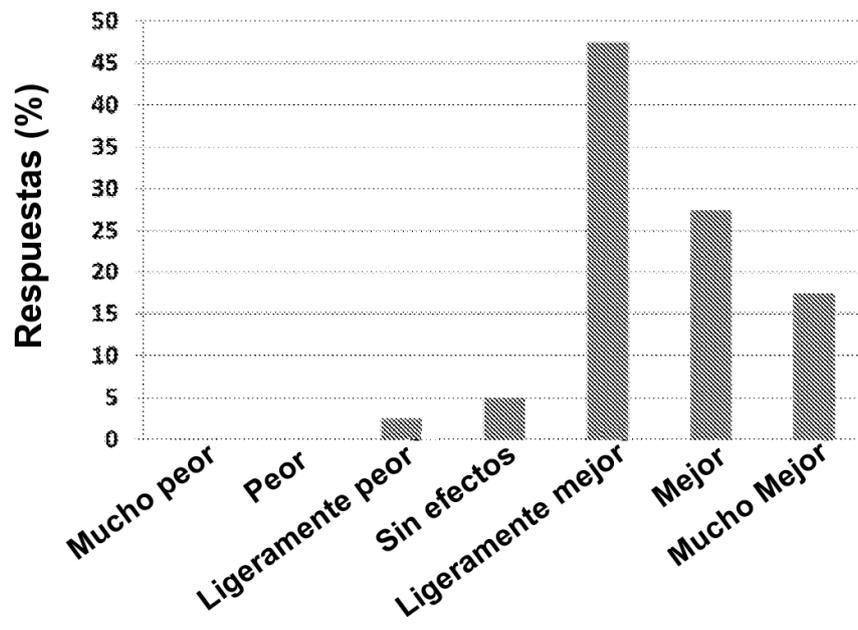


Fig. 10

Antes del uso

Después del uso

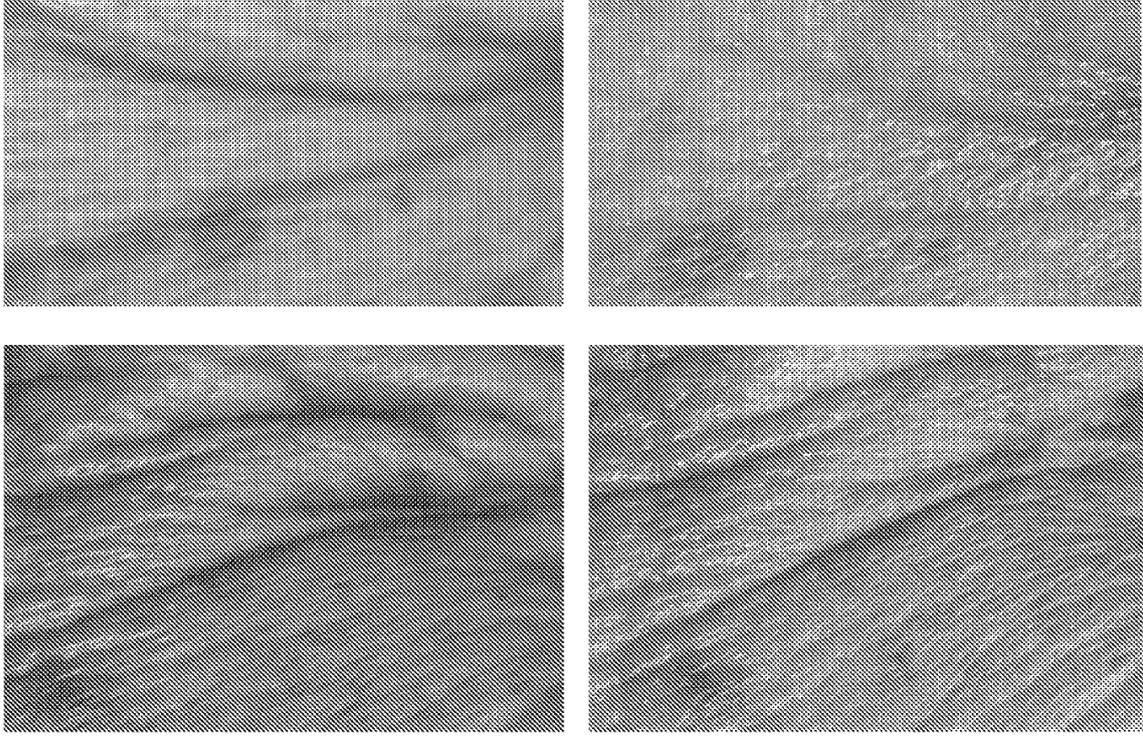


Fig. 11