

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 923**

51 Int. Cl.:

A61P 17/18 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2009 E 09152528 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2087894**

54 Título: **Formulaciones que comprenden piceida capaces de prevenir e inhibir la peroxidación de lípidos**

30 Prioridad:

11.02.2008 IT FI20080019

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

21.04.2020

73 Titular/es:

**GLURES S.R.L. (100.0%)
Via Libertà, 5 Parco Scientifico Tecnologico
30170 Mestre - Venezia, IT**

72 Inventor/es:

**STEVANATO, ROBERTO;
RAVAGNAN, GIAMPIETRO;
MOMO, FEDERICO y
FABRIS, SABRINA**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

Observaciones:

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

ES 2 754 923 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

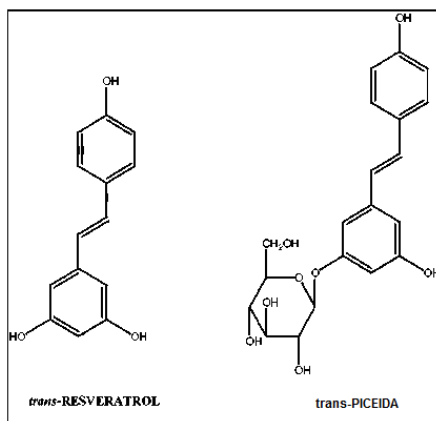
Formulaciones que comprenden piceida capaces de prevenir e inhibir la peroxidación de lípidos

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de las formulaciones que contienen piceida posiblemente en combinación con resveratrol.

10 **Estado de la técnica**

[0002] La piceida y el resveratrol, que pertenecen a la clase de los estilbenos, son productos bien conocidos.



[0003] Por ejemplo, los documentos de solicitud de Patente Europea EP 1292320 y EP 1292319 describen los productos y procesos para la extracción de productos farmacológicamente activos de plantas espermatofitas, que incluyen resveratrol y piceida; también informan de las propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas de estos productos, útiles para el tratamiento de tumores. En el caso del resveratrol, se han llevado a cabo diversos estudios sobre sus capacidades antioxidantes y sus propiedades beneficiosas consecuentes debido a sus efectos inhibidores sobre la formación y propagación del cáncer, su acción cardioprotectora debido a la inhibición de la oxidación de las lipoproteína de baja densidad (LDL) y la agregación plaquetaria, su actividad antiinflamatoria y sus efectos preventivos sobre la enfermedad de Alzheimer y la demencia.

[0004] Sin embargo, hay muy poca información sobre la piceida, la forma glucosilada de resveratrol que se encuentra presente en la naturaleza en una cantidad aproximadamente siete veces mayor que la del propio resveratrol y se supone que es la forma de distribución más extendida en la naturaleza. En particular, hasta la fecha no se han publicado comentarios significativos sobre sus características antioxidantes y su capacidad para la prevención e inhibición de la peroxidación lipídica que, como se conoce, es la causa de numerosas patologías importantes.

[0005] Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que el resveratrol exhibe innumerables propiedades beneficiosas en el tratamiento de patologías importantes debido a sus propiedades antioxidantes. Demostrando que la piceida no solo presenta propiedades similares sino propiedades realmente superiores, el potencial para su uso se extiende considerablemente, ya sea individualmente o en combinación en formulaciones farmacéuticas, cosméticas y protectoras de la piel, teniendo en cuenta además la gran abundancia de piceida en matrices naturales.

Descripción detallada de la invención

[0006] Se ha descubierto, y representa un aspecto de la presente invención, que la piceida, como el resveratrol en las dos formas cis y trans, exhibe características antioxidantes de interés y que los dos estilbenos, solos o en combinación, pueden actuar de forma particularmente eficaz en la prevención y la inhibición de la peroxidación lipídica. Se conoce que la peroxidación lipídica es un proceso que daña las células animales y vegetales. Los lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, que están presentes principalmente en las membranas celulares, experimentan con facilidad retirada de hidrógeno en presencia de radicales libres, transformándose ellos mismos en radicales que reaccionan rápidamente con oxígeno para formar radicales peroxilo. Estos últimos retiran un átomo de hidrógeno de otras moléculas lipídicas para crear más radicales, lo que da lugar a un ciclo de autooxidación con la destrucción sistemática de lípidos y daños graves en las membranas, que compromete la supervivencia celular real.

[0007] A la luz de lo expuesto anteriormente, no parece haber ninguna duda sobre el beneficio de usar aquellos

componentes naturales, es decir, no sintetizados, que están ampliamente extendidos en la naturaleza y ya están presentes en los ingredientes alimentarios de la dieta mediterránea (frutas, verduras, vino, etc.), como antioxidantes eficaces en la formulación de productos farmacéuticos, cosméticos y protectores de la piel, así como para la conservación de los alimentos de la oxidación química y la fotooxidación.

[0008] La actividad antioxidante del trans-resveratrol y la trans-piceida se ha verificado de la siguiente manera:

a) mediante el estudio de su acción inhibidora sobre la peroxidación de ácido linoleico en micelas de SDS (dodecil sulfato de sodio) y liposomas unilamelares de DPPC (dipalmitoil L-alfa-fosfatidilcolina, C16:0);

b) por medición de su capacidad para neutralizar diferentes radicales libres, tales como DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazilo) y TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) y los iniciadores de radicales ABIP (2,2'-azo-bis[2-(2-imidazolin-2-il)propano], AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)), ABCPA (4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico)), y a continuación por comparación de los datos obtenidos de ese modo con los de dos antioxidantes conocidos, vitamina E (alfa-tocoferol) y BHT (2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol).

[0009] El efecto de los antioxidantes sobre la peroxidación lipídica se verificó midiendo la cantidad de oxígeno consumido a 37 °C como consecuencia de la reacción radicalaria iniciada térmicamente por ABIP. En estas condiciones, se observa una disminución constante en el oxígeno que disminuye drásticamente después de la adición de antioxidante.

[0010] Tanto la piceida como el resveratrol muestran un descenso constante en el consumo de oxígeno mayor que el de la vitamina E y el BHT (aparte de un breve período inicial de fuerte inhibición exhibido por este último) pero con un efecto más prolongado con el tiempo.

[0011] Con DHHP, la actividad de neutralización de radicales se siguió en su lugar de forma espectrofotométrica por medición de la velocidad inicial (V_0) de desaparición de su banda característica a 515 nm. Los datos recopilados muestran que los valores de V_0 del resveratrol y la piceida son comparables a los de BHT (aunque más bajos que los de la vitamina E), lo que confirma la buena capacidad de neutralización de los dos productos examinados. También se requería verificar si los dos productos examinados pueden reaccionar con los iniciadores de radicales libres antes de que estos últimos activen la peroxidación lipídica en la membrana.

[0012] A diferencia del caso de BHT (la vitamina E no se sometió a ensayo debido a su insolubilidad en agua), se descubrió que el resveratrol y la piceida reaccionan con todos los radicales libres y los iniciadores de radicales que se examinaron.

[0013] Esta reactividad peculiar y extraordinaria sugiere que tales compuestos podrían ser capaces de bloquear la cadena de radicales desde el comienzo y, por lo tanto, se presentan como agentes potenciales en la inhibición preventiva de la peroxidación de lípidos.

[0014] La acción mencionada anteriormente es importante también para la formación de los epóxidos que, como se conoce, normalmente son muy reactivos y se unen a grupos nucleófilos de proteínas y ADN, iniciando patologías peligrosas.

[0015] El colesterol es uno de los componentes más importantes de las membranas de las células plasmáticas animales a las que imparte la rigidez necesaria debido a sus características estructurales. Además, el colesterol está presente en las lipoproteínas del plasma sanguíneo, aunque en forma de derivados.

[0016] Se ha demostrado que, en la piel irradiada con UV, el colesterol sufre oxidación con la formación del epóxido correspondiente (5a,6a-epoxi-colestan-3 β -ol) a través de un mecanismo radicalario. El epóxido de colesterol se considera la causa probable del carácter carcinógeno de los rayos UV y como agente mutagénico directo (véase, por ejemplo, Sevanian *et al.* Proc. Natl Acad Sci USA 81/13, 4198 - 4202 (1984) y Morrin R.J. J. Clin. Lab. Anal. 5/3, 219-225(1991)).

[0017] La formación de epóxido de colesterol y, por lo tanto, el riesgo de tumores importantes se pueden prevenir mediante la acción de la piceida y el resveratrol en formulaciones de protección de la dermis debido a su capacidad para bloquear la acción de los radicales libres.

[0018] Se ha informado que la epoxidación de 17- β -estradiol y de estrona podría ser el factor principal en el tumor de mama. El tamoxifeno, un antiestrógeno utilizado para el tratamiento del tumor de mama, también muestra propiedades eficaces para prevenir el tumor. Se considera que la acción preventiva se debe a la capacidad del tamoxifeno para la prevención de la epoxidación de estradiol a través de un mecanismo competitivo.

[0019] Por otra parte, se conocen bien los efectos secundarios del tamoxifeno que se puede considerar a su vez como iniciador de cáncer debido a su capacidad, una vez activado metabólicamente, para unirse al ADN induciendo, por ejemplo, tumores endometriales.

[0020] La acción combinada de la piceida y el resveratrol en la inhibición de la formación de epóxido de estradiol puede ser eficaz, por lo tanto, para curar y prevenir el tumor de mama, reduciendo el riesgo de reacción secundaria con el ADN y, por lo tanto, el surgimiento de nuevos tumores (véase Yu, F.L. Asia Pac. J. clin. Nutr. 11/7, 460 - 66 (2002) y Cancer Detect. Prev. 26, 370-5 (2002)).

[0021] En particular, la velocidad inicial de consumo de piceidas es similar a la de la descomposición de ABIP, mientras que la del resveratrol es cinco veces mayor. Las evaluaciones cuantitativas han demostrado que la piceida es más eficaz que el resveratrol debido a que el último estilbeno es capaz de experimentar reacción con su forma de radical.

[0022] Dado que la eficacia antioxidante de ambos productos está relacionada con su reparto entre las fases acuosa y lipídica y su posición en la bicapa de membrana, se llevó a cabo una investigación sobre las interacciones del resveratrol y la piceida en liposomas multilamelares de L-alfa-fosfatidilcolina (PC) saturada de diversas longitudes de cadena (dimiristoilo, DMPC; dipalmitoilo, DPPC; distearoilo, DSPC) para determinar: a) los coeficientes de reparto de los estilbenos entre liposomas y agua; b) las modificaciones de la organización de la bicapa lipídica; c) su posición en la membrana mediante análisis calorimétrico diferencial (DSC) y etiquetado de rotación (EPR).

[0023] Se puede observar en las mediciones del coeficiente de reparto que, según lo previsto, la piceida es menos hidrófoba que el resveratrol debido a la presencia de un resto glucosídico muy hidrófilo en la molécula. A pesar de esto, ambas moléculas son suficientemente lipófilas para repartirse casi exclusivamente en la fase lipídica. Los perfiles DSC de la transición del estado de gel a fluido en liposomas multilamelares de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina, de 14 átomos de C), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina, de 16 átomos de C) y DSPC (diestearoilfosfatidilcolina, de 18 átomos de C) para concentraciones crecientes de resveratrol y piceida, se amplían y se desplazan hacia temperaturas más bajas para el aumento de las concentraciones de estilbenos, lo que demuestra que tanto el tamaño como el empaquetamiento de las unidades cooperativas sometidas a la transición se modifican por parte de los antioxidantes, debilitando de ese modo las bicapas lipídicas.

[0024] A partir de los espectros de EPR de ácidos esteáricos etiquetados por rotación en las posiciones de carbono 5, 7, 10, 12 y 16 (n-SASL) e incorporados a liposomas de DPPC, se puede observar que tanto el resveratrol como la piceida se encuentran en la región hidrófoba de la bicapa, aunque la piceida está más cerca de la región hidrófila. Además, el grupo hidroxilo de las dos moléculas, que es particularmente reactivo frente a los radicales libres, está muy cerca de los dos dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), mientras que el de la vitamina E está más desplazado hacia la superficie polar, y el de BHT, en cambio, se ubica más profundamente.

[0025] De esto se deduce que debido a razones de proximidad simple, la piceida y el resveratrol pueden reaccionar de forma más rápida y eficaz que la vitamina E y el BHT con el radical peroxilo que se forma después de la peroxidación lipídica.

[0026] Por las siguientes razones, podemos concluir que el resveratrol y la piceida son excelentes antioxidantes:

- son suficientemente hidrófobos para repartirse principalmente en la bicapa lipídica de la membrana;
- previenen la peroxidación lipídica al reaccionar con un amplio espectro de radicales e iniciadores de radicales;
- inhiben la peroxidación lipídica al reaccionar de forma eficaz con los radicales peroxilo que se forman en la fase de propagación de la peroxidación;
- se ubican dentro de la membrana de un modo tal que su grupo hidroxilo, que es particularmente reactivo frente a los radicales libres, se encuentra en proximidad inmediata a los dobles enlaces de los restos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que se someten con mayor facilidad a peroxidación lipídica.

[0027] Los productos que se pueden formular, de acuerdo con la invención, son:

- soluciones y emulsiones, tales como aditivos para la conservación natural de productos (alimentos, medicamentos, cosméticos, productos de protección solar, etc.) que son perecederos debido a la oxidación química o la fotooxidación, y pueden sustituir o complementar a otros conservantes sintéticos;
- suplementos alimenticios con el fin de aumentar el nivel de sustancias antioxidantes en el cuerpo, en particular en casos de deficiencia en el consumo de los alimentos (vino, frutas y verduras) en los que están presentes estas sustancias de forma natural;
- aceites, emulsiones, suspensiones, cremas y ungüentos protectores de la piel para la prevención del daño oxidativo y fotooxidativo causado por la exposición prolongada al sol, cuya radiación ultravioleta es la causa de la formación de radicales libres;
- preparaciones cosméticas para evitar posibles daños debido a otros componentes presentes en la formulación;
- medicamentos antiinflamatorios para uso oral, local y tópico.

[0028] Las composiciones que contienen los principios activos se pueden preparar siguiendo técnicas conocidas en la farmacopea para la producción de productos de este tipo, a concentraciones que dependen de los beneficios requeridos y los medios de administración, así como teniendo en cuenta parámetros subjetivos tales como el peso y la edad de la persona, y cualquier patología en progreso y/o la sensibilidad específica a los estilbenos en discusión.

- Teniendo en cuenta las cantidades de estas dos sustancias presentes en los alimentos naturales ampliamente consumidos (Phytochemistry, 37/2, 571, 1994; J. Agric. Food. Chem. 47, 1533, 1999; Meth. Enz. 299, 184, 1999), es evidente que en suplementos alimenticios o formulaciones de aditivos, las cantidades de piceida y resveratrol, en la proporción de las dos formas isómeras *trans/cis* presente generalmente en la naturaleza en la que el isómero *cis* está indudablemente en una cantidad menor que el isómero *trans* (J. Agric. Food. Chem. 47, 1533, 1999), debería estar entre 0,0001 y 1 miligramo por gramo o mililitro de producto en el caso de aceites, cremas y pomadas, mientras que para el consumo oral la cantidad máxima no debería exceder de 0,1 miligramos por gramo de producto.
- 5
- 10 **[0029]** Se pueden consumir dosis más altas pero únicamente bajo un estricto control médico, teniendo en cuenta la información que se proporciona en los documentos de Patente EP 1292319B1 y EP1292320B1 relacionada con la citotoxicidad de dichos compuestos y en particular del *cis*-resveratrol.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Composiciones antioxidantes que contienen piceida, posiblemente en combinación con resveratrol para su uso en la prevención de daño oxidativo y fotooxidativo de la piel causado por exposición prolongada al sol en forma de aceites, suspensiones, cremas, pomada, soluciones y/o emulsiones protectores de la piel.
- 2.** Las composiciones para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en las que la cantidad de principio activo está comprendida entre 0,0001 y 1 miligramos por gramo o mililitro de producto.
- 10 **3.** Las composiciones para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 en las que la cantidad de principio activo es menos de 0,1 miligramos por gramo de producto.