

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 272**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/132** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61K 8/41** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/IB2014/060555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14730995 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2983656**

54 Título: **Composición para resistir al envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria**

30 Prioridad:

**09.04.2013 IT MI20130555**

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

**20.07.2020**

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**

**PAUS, RALF**

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 2 774 272 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

Composición para resistir al envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a una composición cosmética o farmacéutica para resistir a los efectos del envejecimiento de la piel.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La piel humana está constantemente expuesta al aire, a radiación solar, a contaminantes medioambientales, agentes físicos y químicos que son capaces de inducir la producción de radicales libres en el cuerpo.

15 [0003] El daño oxidativo hecho por los radicales libres es una causa principal de envejecimiento físico en general, y de la piel en particular. El proceso de envejecimiento consiste en un deterioro del equilibrio metabólico, u homeostasis, acompañado por una alteración de los sistemas fisiológicos, que incluyen el sistema inmunitario.

20 [0004] Uno de los objetivos del daño oxidativo dentro de la célula es la mitocondria, que genera la mayor parte de la energía para los requisitos celulares y que consume más de 90 % del oxígeno. El proceso de la oxidación mitocondrial está, por tanto, directamente asociado al envejecimiento.

25 [0005] Los cambios en la función inmunitaria relacionada con la edad avanzada se originan a partir de estrés oxidativo e inflamatorio. Numerosos estudios muestran que la inflamación crónica es la principal responsable del envejecimiento de la piel.

30 [0006] Los dos principales estímulos pro-inflamatorios son la alteración o destrucción de la barrera de la piel y la radiación ultravioleta. En general, los inductores de agresiones medioambientales de radicales libres conducen a una destrucción de la barrera de la piel que activa la liberación de TNF-alfa y las interleucinas IL-1 e IL-8, así como otras moléculas pro-inflamatorias que inducen una reacción inflamatoria aguda. La inflamación aguda no parece ser un inductor del daño directo a la piel, pero agrava el envejecimiento de la piel en progreso.

35 [0007] Por otra parte, la repetida alteración de la barrera de la piel, incluso si es ligera, activa la inflamación crónica.

[0008] Considerando esta evidencia, parece posible ralentizar o retrasar el proceso de envejecimiento de la piel actuando sobre la inflamación crónica con tratamientos basados en antioxidantes y productos antiinflamatorios.

40 [0009] Aunque al nivel de la piel existen sistemas endógenos de protección de radicales libres, tales como la melanina y alguna enzima y sistemas no antioxidantes, se debe considerar que durante el proceso de envejecimiento disminuye fisiológicamente el mecanismo de defensa de antioxidantes de la piel.

45 [0010] Esta disminución fisiológica se suma al importante agotamiento adicional del conjunto de antioxidantes endógenos debido a la exposición UV. Enfrentándose a esta reducción, muchos estudios muestran que el tratamiento tópico con antioxidantes es útil en restaurar las defensas contra los radicales libres, en algunos casos incluso revirtiendo el proceso de envejecimiento.

50 [0011] El documento de patente WO2005013932 por el mismo solicitante describe una composición para uso farmacéutico, dietético o cosmético para uso humano adaptado para ralentizar el envejecimiento de la piel y los anejos cutáneos, que incluyen espermina, espermidina o sales de las mismas como principio activo. En particular, este documento describe estudios experimentales relacionados con los efectos de dichas poliaminas sobre la elasticidad, hidratación y la acción de renovación celular de la piel. Sin embargo, no se describen efectos ni antiinflamatorios o antioxidantes ni se sugieren en su interior por los compuestos activos espermina, espermidina o sales de las mismas.

55 [0012] También se debe observar que en el caso de formulaciones tópicas, la espermidina, así como otras poliaminas, se someten a oxidación debido a que cuando se aplica por vía tópica sobre la piel, antes de ser absorbida por la piel para realizar su acción, permanece durante un cierto tiempo en contacto prolongado con el aire. Una posible oxidación de espermidina durante ese tiempo antes de la absorción conduciría a productos de oxidación que ya no son activos.

60 [0013] El documento de patente JP 61 053250 A (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd; Japón) desvela una N<sup>1</sup>-fenilespermidina y otros derivados de espermidina como inhibidores de la inflamación. Este documento no desvela un efecto antiinflamatorio sobre la piel.

65

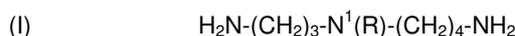
[0014] Según la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que se pueden resistir los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria usando un compuesto de la fórmula general (I): R-N<sup>1</sup>-espermidina como se define a continuación, como tal o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable tal como una sal.

5

### Descripción de la invención

[0015] El objeto de la invención son compuestos de la fórmula (I) R-N<sup>1</sup>-espermidina, es decir, 1,4-butanodiamina, N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-R,

10



en donde R es un sustituyente unido a la función de amina secundaria de la espermidina, seleccionado de:

15

metilo, etilo, propilo, isobutilo,  
o una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente,  
para su uso en oponerse a los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria.

20

[0016] Como se muestra en la parte experimental más adelante en la presente descripción, dicha actividad antiinflamatoria también va acompañada por una actividad antioxidante contra radicales libres de oxígeno (ROS), comparable a la del  $\alpha$ -tocoferol.

25

[0017] Además, los compuestos de la fórmula general (I) son tanto activos como estables al aire para permitir una aplicación eficiente para uso tópico sobre la piel sin ser transformado en una sustancia diferente no activa debido al efecto de oxidación.

30

[0018] Dichos compuestos de la fórmula general (I), que se proporcionan, por tanto, con una actividad antiinflamatoria y que ralentizan los procesos de envejecimiento de la piel, se pueden usar eficazmente para administración tópica sobre la piel en forma de composiciones adecuadas para uso cosmético o farmacéutico para el logro de dichos efectos.

35

[0019] Por tanto, la invención también proporciona una composición para su uso según la reivindicación 9 y compuestos de la fórmula (I) para su uso como se define en la reivindicación 17. La composición desvelada en el presente documento está adaptada para llevar a cabo un efecto antiinflamatorio y ralentizar los procesos de envejecimiento de la piel y que contiene al menos un compuesto de la fórmula (I) como principio activo como tal o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable tal como una sal, para administración tópica sobre la piel.

### Descripción detallada de la invención

40

[0020] Las formas adecuadas para uso tópico son, por ejemplo, una crema, un suero, un bálsamo, una máscara, un gel para la cara o el cuerpo.

45

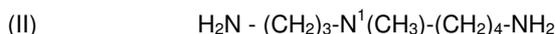
[0021] Si dicho compuesto de la fórmula (I) está en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, tal como una sal, es preferentemente una sal de ácido maleico, tal como trimaleato, o una sal de ácido clorhídrico, tal como triclorhidrato.

50

[0022] Es adecuada cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable de ácido orgánico o inorgánico para una formulación para administración tópica.

50

[0023] Un compuesto preferido de la fórmula (I) para su uso según la reivindicación 4 es N<sup>1</sup>-metilespermidina, o N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-metil-1,4-butanodiamina (Número de Registro CAS 51460-23-2), de la fórmula:



55

y para su uso en una composición según la reivindicación 9 o 10 como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como trimaleato (3C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) o triclorhidrato (3HCl).

60

[0024] Los compuestos preferidos adicionales de la fórmula (I) para su uso según la reivindicación 5, 6 o 7 son, respectivamente:

N<sup>1</sup>-etilespermidina, de la fórmula



65

N<sup>1</sup>-propilespermidina, de la fórmula



N<sup>1</sup>-isobutilespermidina, de la fórmula



10 **[0025]** Un compuesto de la fórmula (I) para su uso según la reivindicación 1, como tal o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable tal como una sal, está contenido en una composición en una cantidad preferentemente dentro de los siguientes intervalos en porcentaje en peso, p/p (%): 0,0001 a 0,30; preferentemente desde 0,010 hasta 0,30 y desde 0,0001 hasta 0,15.

**[0026]** Las composiciones para su uso según la invención formuladas para uso tópico sobre la piel del cuerpo o la cara se describen en lo sucesivo, a modo de ejemplos.

15 **[0027]** Las cantidades de los componentes, indicadas por la nomenclatura INCI, se expresan como un porcentaje en peso variable dentro de los intervalos allí indicados.

Ejemplo 1

20 SUERO FACIAL CONCENTRADO

**[0028]**

25	Componente (nombre INCI)	Cantidad p/p (%)
	Ácido cítrico	0,001-0,30
	Hidróxido sódico	0,001-0,30
	Goma gellan	0,10-0,80
	Goma xantana	0,01-0,80
	Ácido sórbico	0,01-0,20
	Fenoxietanol	0,10-0,99
	Sorbitol	0,10-1,00
	N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,010-0,30
	EDTA disódico	0,025-0,10
	Caprililglicol	0,01-0,30
	Aceite de semilla de <i>Limnanthes alba</i>	0,20-5,00
	Paraffinum liquidum	0,05-0,90
	Alquil C12-20-glucósido	0,10-0,99
	Alcoholes C14-22	0,10-0,99
	Glicerina	0,50-8,00
	Propanodiol	0,50-8,00
	Copolímero de acrilato de hidroxietilo/acriloldimetiltaurato sódico	0,05-1,00
	Poliisobuteno	0,01-0,90
	Éter de trimetilolpropanococo PEG-7	0,01-0,90
	Perfume	0,10-0,70
	Aqua	según se necesite hasta 100 g

Ejemplo 2

30 Loción PARA LA PIEL Y EL CUERO CABELLUDO

**[0029]**

Alcohol	15-20
Pantotenato de calcio	1-2
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40	0,75-1,5
Ácido láctico	0,1-0,5
Perfume	0,1-0,2
Hialuronato de hidroxipropiltrimonio	0,02-0,08
N <sup>1</sup> -Etilespermidina	0,02-0,08
Di-t-butil-4-hidroxihidrocinnamato de octadecilo	0,02-0,08
Lecitina	0,02-0,08
Rutina	0,001-0,003
Biotina	0,001-0,003
Extracto de semilla de <i>Vitis vinifera</i>	0,005-0,01
Poliuretano-26	0,002-0,008

## ES 2 774 272 T3

(continuación)

Aceite de semilla de Helianthus annuus	0,002-0,004
Extracto de hojas de Olea europaea	0,0005-0,001
Zeaxantina	0,0005-0,001
Aqua	según se necesite hasta 100

### Ejemplo 3

#### 5 SUERO HIDRATANTE

**[0030]**

Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,0001-0,15
Goma xantana	0,02-0,50
Alginato de sodio	0,01-0,50
Goma gellan	0,10-0,80
Ácido cítrico	0,001-0,30
Hidróxido sódico	0,001-0,30
Glicerina	0,50-5,00
Pantenol	0,01-0,20
Sorbitol	0,50-5,00
Propanodiol	0,50-5,00
Pentilenglicol	0,50-4,00
Sorbato de potasio	0,05-0,20
Benzoato de sodio	0,05-0,20
Perfume	0,050-0,50
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40	0,10-0,80
Glicéridos caprílicos/cápricos PEG-6	0,10-0,80
Aqua	según se necesite hasta 100 g

10

### Ejemplo 4

#### AGUA MICELAR

15 **[0031]**

Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Glicerina	1-10
Cocoilprolina	1-2
Glucósido de coco	0,5-1,5
Gluconolactona	0,05-0,15
N <sup>1</sup> -Propilespermidina	0,1
Lauroilsarcosinato de sodio	0,1-1
Fenoxietanol	0,1-1
Benzoato de sodio	0,1-0,5
Hidróxido sódico	0,1-0,2
Agua de flor de Citrus Aurantium Amara	0,05-0,15
EDTA disódico	0,05-0,15
Sorbitilfurfural	0,05-0,2
Gluconato cálcico	0,05-0,1
Cloruro sódico	0,01-0,05
Perfume	0,01-0,02
Cloruro sódico	0,005-0,02
Acetato de tocoferilo	0,005-0,015
Benzoato de sodio	0,001-0,005
Sorbato de potasio	0,001-0,005
Alcohol bencílico	0,001-0,002
Aqua	según se necesite hasta 100

### Ejemplo 5

20

#### CREMA FACIAL HIDRATANTE NUTRITIVA

**[0032]**

## ES 2 774 272 T3

### Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Goma xantana	0,05-0,20
EDTA disódico	0,025-0,05
Xilitol	0,50-1,50
Glicerina	0,50-3,00
Sorbitol	0,50-3,00
Trehalosa	0,50-3,00
Ciclopentasiloxano	0,10-3,00
Hidroximetilglicinato de sodio	0,05-0,30
Aceite de semilla de Limnanthes alba	0,20-5,00
Paraffinum liquidum	0,50-5,00
Glicérico caprílico/cáprico	0,50-5,00
Manteca de Butyrospermum parkii	0,10-0,50
Isoestearato de isoestearilo	0,50-5,00
Estearato de glicerilo	0,20-3,00
Cocoato de sacarosa	0,20-3,00
Branato de arroz de poliglicerilo-3	0,50-4,00
Dimeticona	0,20-6,00
Alcohol cetearílico	0,20-5,00
Fenoxietanol	0,30-0,90
N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,0001-0,15
Perfume	0,10-0,30
Ácido láctico	0,001-0,30
Aqua	según se necesite hasta 100 g

#### Ejemplo 6

5

#### DISOLUCIÓN LIMPIADORA DE LA PIEL

#### **[0033]**

10

### Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Laurilsulfato de monoetanolamina	
Ricinoleth-40	5-15
Derivados de DEA de fosfatidas de lecitina de soja	1,5-7,5
Fenoxietanol	0,2-0,5
N <sup>1</sup> -Isobutilespermidina	0,01-0,3
Ácido láctico disol. al 80	0,02-0,08
Perfume	0,01-0,05
Aqua	según se necesite hasta 100

#### Ejemplo 7

15

#### LECHE CORPORAL PARA DESPUÉS DEL SOL

#### **[0034]**

20

### Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Glicerina	1,00-6,00
Metilpropanodiol	1,00-6,00
Cetilhidroxietilcelulosa	0,10-0,40
Goma xantana	0,10-0,40
Almidón de tapioca	1,00-2,00
EDTA disódico	0,025-0,20
Estearato de sorbitano	2,00-5,00
Cocoato de sacarosa	0,10-1,00
Palmitato de etilexilo	1,00-5,00
Polideceno hidrogenado	1,00-5,00
Triglicéridos caprílicos/cápricos	1,00-5,00
Butyrospermum parkii	1,00-5,00
Aceite de semilla de Limnanthes alba	1,00-3,00
N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,0001-0,15
Dimeticona	1,00-3,00

(continuación)

Hidroxitilglicinato de sodio	0,10-0,20
Fenoxietanol	0,70-0,90
Ácido láctico	según se necesite
Perfume	0,30
Delta tocoferol	0,02-0,25
Sorbitilfurfural	0,10-0,90
Aqua	según se necesite hasta 100,00

Ejemplo 8

5 TONIFICANTE FACIAL

[0035]

Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Glicerina	0,50-6,00
Butilenglicol	0,50-8,00
Metilpropanodiol	0,50-6,00
N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,0001-0,15
Hidroxiethylcelulosa	0,02-0,80
Polisorbato 20	0,50-10,00
Glicéridos de almendra PEG 60	0,10-1,00
PEG-8	0,10-4,00
Butilenglicol	0,50-8,00
Fenoxietanol	0,10-0,90
Ácido cítrico	0,001-0,30
Hidróxido sódico	0,001-0,30
EDTA disódico	0,05-0,10
Perfume	0,05-0,40
Ácido benzoico	0,01-0,20
Aqua	según se necesite hasta 100 g

10

Ejemplo 9

DESMAQUILLANTE

15 [0036]

Componente (nombre INCI) Cantidad p/p %

Benzoato de alquilo C12-15	5,00-30,00
Polideceno hidrogenado	5,00-30,00
Aceite de semilla de Limnanthes alba	0,50-10,00
N <sup>1</sup> -Metil-espermidina	0,0001-0,15
Cloruro sódico	0,01-0,40
EDTA disódico	0,001-0,09
Sulfato de magnesio	0,01-0,40
Ácido cítrico	0,01-0,40
Hidróxido sódico	0,01-0,40
Glicerina	0,50-6,00
Metilparabeno sódico	0,020-0,20
Etilparabeno sódico	0,020-0,20
Aqua	según se necesite hasta 100 g

20 Ejemplo de referencia 10

LOCIÓN SUAVIZANTE PARA LA PIEL

[0037]

25

Componente (nombre INCI) Cantidad p/p (%)

Estearato-palmitato de glicerilo	5-15
Estearato-palmitato de glicerilo	2-8
Aceite de coco	1-5
Alcohol cetosteárico	1-5

(continuación)

Emulsionante de cera	1-5
Alcohol bencílico	0,5-1,5
N <sup>1</sup> -Ciclohexilespermidina	0,2
Alcohol cetílico	0,02-0,06
Aqua	según se necesite hasta 100

**Pruebas experimentales**

- 5 [0038] Se llevaron a cabo las siguientes pruebas para estudiar la actividad de los compuestos de la fórmula (I) para el uso según la presente invención.

**Descripción de los dibujos**

- 10 [0039] Los resultados de estas pruebas se muestran en los gráficos en las Figuras 1 a 5 de los dibujos adjuntos, como se describe a continuación.

**Prueba antiinflamatoria**

- 15 [0040] Con referencia a las Figuras 1, 2 y 3, las muestras de un compuesto de la invención, N<sup>1</sup>-metilespermidina, es decir, N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-metil-1,4-butanodiamina de la fórmula (II) como se ha definido anteriormente, se sometieron a la siguiente prueba antiinflamatoria, usando muestras de la espermidina como comparación de referencia.

**Cultivo y propagación de la línea celular**

- 20 [0041] Se usa una línea inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC2544 (Perry, V.P., Sanford, K.K., Evans, V.J., Hyatt, G.W., Earle, W.R., 1957: Establishment of clones of epithelial cells from human skin. J Natl Cancer Inst. 18 (5): 709-717) cultivada en matraces estériles (25 cm<sup>3</sup>), se incuba a 37 °C en una atmósfera húmeda a 5 % de CO<sub>2</sub> en MEM (medio esencial mínimo) añadido con suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales, en presencia de 1 % de penicilina y estreptomina.

- 25 [0042] Se hace una división 1: 3 cada 2 días tras lograr la monocapa lavando con 1 x PBS (tampón fosfato sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) y desprendimiento de células con una disolución de tripsina-EDTA a 37 °C durante 2 minutos.

**Control**

- 30 [0043] Control negativo: queratinocitos NCTC2544 humanos cultivados en EMEM (EBSS) a 2,5 % de FBS, complementado con 1 % de L-glutamina 2 mM, 1 % de disolución de aminoácidos y 1 % de mezcla de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomina (10.000 Ug/ml) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>.

- 35 [0044] Control positivo: queratinocitos NCTC2544 humanos tratados con lipopolisacárido (LPS, 5 µg/ml) en EMEM (EBSS) a 2,5 % de FBS, complementado con 1 % de L-glutamina 2 mM, 1 % de disolución de aminoácidos y 1 % de mezcla de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomina (10.000 Ug/ml) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Métodos**

- 40 [0045] Se evaluó la expresión génica de TNF-α sobre células NCTC2544 tratadas con las muestras por qRT-PCR.

- 45 [0046] El análisis de expresión génica implica cuatro etapas:

- 50 1. Tratamiento de las células con las muestras durante 16 y 24 horas;  
2. Extracción de ARN;  
3. Retrotranscripción en ADNc;  
4. RT-PCR cuantitativa.

**Tratamiento de células NCTC2544**

- 55 [0047] En las condiciones experimentales, en relación con los resultados obtenidos en una prueba de MTT previa, se probaron muestras de la espermidina y N<sup>1</sup>-metil-espermidina a las siguientes concentraciones: 1 µM, 500 nM y 1 mM (concentración final en el medio).

- [0048] También se probaron dichos controles positivos y negativos.

**Prueba antiinflamatoria en NCTC2544**

60

Día 1: Siembra de células

5 [0049] Cuando las células NCTC 2544 de queratinocitos humanos han alcanzaron aproximadamente 80 % de confluencia, se desprenden con tripsina/EDTA y se siembran a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de 12 pocillos y se incuban a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> (24 h).

Día 2: exposición a las muestras durante 16 y 24 h

10 [0050] Se disolvieron en EMEM las muestras anteriores de espermidina y N<sup>1</sup>-metil-espermidina, complementadas con 2,5 % de FCS, 1 % de L-glutamina 2 mM, 1 % de disolución de NEAA y 1 % de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomocina (10.000 pg/ml).

15 [0051] Se incluyeron en cada placa controles, que contenían solo medio de cultivo (control negativo) y medio de cultivo más LPS (5 µg/ml) (control positivo).

[0052] Las células se expusieron a la acción de las muestras de la espermidina y N<sup>1</sup>-metil-espermidina a las concentraciones anteriores de 1 µM, 500 nM y 1 mM: un total de seis muestras.

20 [0053] Se añadió LPS a una concentración de 5 µg/ml a cada pocillo (excepto en el control negativo). Cada muestra se probó por duplicado.

### Resultados

25 [0054] Los resultados se muestran en los gráficos de las Figuras 1 y 2 de los dibujos adjuntos, en donde N<sup>1</sup>-metil-espermidina se indica con la abreviatura 'Me-espermidina' en comparación con 'espermidina' tomada como referencia.

La Fig. 1 muestra la expresión génica de TNF-α sobre células NCTC2544 tratadas con las seis muestras en cuestión y los dos controles como se ha definido anteriormente, después de 16 horas de tratamiento.

30 La Fig. 2 muestra un diagrama similar después de 24 horas de tratamiento.

[0055] En general, los resultados obtenidos muestran un efecto antiinflamatorio de N<sup>1</sup>-metil-espermidina a todas las concentraciones examinadas.

35 [0056] En la Fig. 1, después de 16 horas de tratamiento, a la concentración de 1 µM, se puede decir que el efecto antiinflamatorio de la espermidina y N<sup>1</sup>-metil-espermidina, aunque es mejor para el compuesto de la invención con respecto a la comparación, es comparable (4:29 % y 3:25 %, respectivamente); sin embargo, a concentraciones más bajas de 500 nM y 1 nM hubo un efecto antiinflamatorio significativamente mayor para N<sup>1</sup>-metil-espermidina que para la espermidina, con una expresión de TNF-α igual a 1,52 % a 500 nm y 7,94 % a 1 nM en el caso de N<sup>1</sup>-metil-espermidina, contra 12:48 % a 500 nM, y 13,99 % a 1 nM en el caso de la espermidina.

[0057] En particular, es sorprendente el mejorado efecto antiinflamatorio a la concentración de 500 nM.

45 [0058] En la Fig. 2, después de 24 horas, los efectos antiinflamatorios de N<sup>1</sup>-metil-espermidina siguen casi invariables, incluso si se comparan con la Fig. 1 son reducidos a la concentración de 500 nM, para la que, sin embargo, todavía existe un efecto antiinflamatorio significativamente mayor de N<sup>1</sup>-metil-espermidina que la espermidina.

### Prueba de antioxidante ROS

50 [0059] Se sometieron las muestras de un compuesto de la invención, sal de triclorhidrato de N<sup>1</sup>-metil-espermidina, es decir, 3HCl de N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-metil-1,4-butanodiamina, a la siguiente prueba antioxidante a especies reactivas de oxígeno (ROS).

55 [0060] Se monitorizó la producción de ROS espectrofluorométricamente usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), como se describe por Tobi et al. (Tobi SE, Paul N, T McMillan J. J Photochem Photobiol, B 2000: 57: 102-112).

60 [0061] Se desprendieron las células NCTC 2544 (aproximadamente 80 % de confluencia) con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pocillos en placas de 96 pocillos. Posteriormente, las células se trataron con muestras de N<sup>1</sup>-metil-espermidina, a las siguientes concentraciones: 500 nM, 1 µM y 500 µM, 1 mM (concentración final en el medio de cultivo).

65 [0062] Se usó α-tocoferol (250 µg/ml, 580 µM) como comparación de la actividad antioxidante. Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1,5 horas. Se usaron células cultivadas en medio basal con 2,5 % de FBS como control.

## Resultados

5 [0063] Los resultados se muestran en el gráfico de la Fig. 3, en donde la sal de triclóridato de N<sup>1</sup>-metilespermidina se indica por brevedad como 'metilespermidina'. La ordenada muestra la disminución en la producción de ROS (% de ROS) en comparación con el control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROS = 100 %) para N<sup>1</sup>-metilespermidina a las diversas concentraciones indicadas aquí y para α-tocoferol.

10 [0064] En comparación con las células de control tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ambas células tratadas con α-tocoferol y las tratadas con el compuesto de la invención a las diversas concentraciones indicadas en el presente documento mostraron una disminución sustancialmente comparable a la concentración intracelular de ROS producido. En particular, se puede observar que a la concentración de 500 μM, la sal de triclóridato de N<sup>1</sup>-metilespermidina muestra una mayor actividad antioxidante que la de α-tocoferol (580 μM).

15 [0065] A partir del complejo de la evidencia experimental resumida anteriormente, se observa que los compuestos de la fórmula (I) son adecuados para un uso farmacéutico o cosmético que pretende oponerse a los efectos del envejecimiento de la piel principalmente mediante una acción antiinflamatoria.

20 [0066] Dicha actividad antiinflamatoria también va acompañada por una actividad antioxidante contra radicales libres de oxígeno (ROS) comparable a la del α-tocoferol.

25 [0067] Además, los compuestos de la fórmula general (I) son tanto activos según los fines de la presente invención, como estables al aire para permitir una aplicación eficiente para uso tópico sobre la piel sin ser transformados en una sustancia diferente no activa debido al efecto de la oxidación.

## Prueba antiinflamatoria

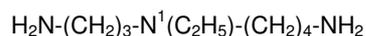
30 [0068] Con referencia a los gráficos en las Figuras 4 y 5, muestras de compuestos adicionales de la invención como se especificaron a continuación se sometieron a una prueba antiinflamatoria en una línea inmortalizada de queratinocitos NCTC2544 humanos sustancialmente como se ha descrito anteriormente, a la parte general de la que se debe hacer referencia.

## Compuestos probados

35 [0069]

N<sup>1</sup>-etilespermidina, de la fórmula

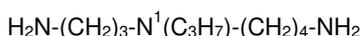
(IV)



40

N<sup>1</sup>-propilespermidina, de la fórmula

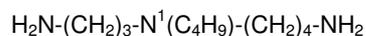
(V)



45

N<sup>1</sup>-isobutilespermidina, de la fórmula

(VI)



## Controles

50

[0070] Se incluyeron en cada placa controles que contenían solo medio de cultivo (control negativo) y medio de cultivo más LPS (5 μg/ml) (control positivo).

## Pruebas y resultados

55

[0071] Se expusieron las células a la acción de muestras de los compuestos N<sup>1</sup>-etilespermidina, N<sup>1</sup>-propilespermidina, N<sup>1</sup>-isobutilespermidina a las concentraciones de 1 nM y 1 μM.

60

[0072] Los resultados se muestran en los gráficos en las Figuras 4 y 5 de los dibujos adjuntos.

[0073] La Fig. 4 muestra la expresión génica de TNF-α (expresión de ARNm RQ) en células NCTC2544 tratadas con las muestras en cuestión a una concentración de 1 nM y los dos controles como se ha definido anteriormente, después de 16 horas de tratamiento.

65

[0074] La Fig. 5 muestra la expresión génica de TNF-α (expresión de ARNm RQ) en células NCTC2544 tratadas con las muestras en cuestión a una concentración de 1 μM y los dos controles como se ha definido anteriormente,

después de 16 horas de tratamiento.

5 **[0075]** Se obtuvieron datos de la expresión génica por RT-PCR. Los datos se interpretan como disminución relativa en comparación con el tratamiento con LPS solo y los datos expresados como RQ (cuantificación relativa) o como un porcentaje son directamente comparables.

**[0076]** En general, los resultados obtenidos muestran un sorprendente efecto antiinflamatorio de los compuestos de la invención a todas las concentraciones examinadas.

10 **[0077]** Los resultados se muestran en los gráficos en las Figuras 4 y 5 de los dibujos adjuntos.

15 **[0078]** La Fig. 4 muestra la expresión génica de TNF- $\alpha$  (expresión de ARNm RQ) en células NCTC2544 tratadas con las muestras en cuestión a una concentración de 1 nM y los dos controles como se ha definido anteriormente, después de 16 horas de tratamiento.

**[0079]** La Fig. 5 muestra la expresión génica de TNF- $\alpha$  (expresión de ARNm RQ) en células NCTC2544 tratadas con las muestras en cuestión a una concentración de 1  $\mu$ M y los dos controles como se ha definido anteriormente, después de 16 horas de tratamiento.

20 **[0080]** Se obtuvieron datos de la expresión génica por RT-PCR. Los datos se interpretan como disminución relativa en comparación con el tratamiento con LPS solo y los datos expresados como RQ (cuantificación relativa) o como un porcentaje son directamente comparables.

25 **[0081]** En general, los resultados obtenidos muestran un sorprendente efecto antiinflamatorio de los compuestos de la invención a todas las concentraciones examinadas.

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos de la fórmula (I) R-N<sup>1</sup>-espermidina, es decir, 1,4-butanodiamina,N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-R,



en donde R es un sustituyente unido a la función de amina secundaria de la espermidina, seleccionado de:

10 metilo, etilo, propilo, isobutilo,  
o una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente, para su uso en oponerse a los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria.

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 para oponerse a los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antioxidante y antiinflamatoria.

15 3. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) se aplica a la piel por vía tópica.

20 4. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-metilespermidina, es decir, N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-metil-1,4-butanodiamina de la fórmula:



25 5. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-etilespermidina de la fórmula



30 6. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-propilespermidina de la fórmula

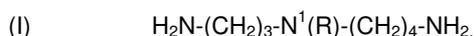


35 7. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-isobutilespermidina de la fórmula



40 8. Compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) está en forma de la sal de triclorhidrato o sal con ácido maleico.

45 9. Una composición para su uso en oponerse a los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria, en donde un compuesto de la fórmula (I) R-N<sup>1</sup>-espermidina, es decir, 1,4-butanodiamina,N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-R,



en donde R es un sustituyente unido a la función amina secundaria de la espermidina, seleccionado de:

50 metilo, etilo, propilo, isobutilo o una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente, se formula con excipientes adecuados para administración tópica sobre la piel.

10. Composición para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-metilespermidina, es decir, N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-metil-1,4-butanodiamina de la fórmula:



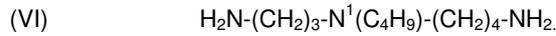
11. Composición para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-etilespermidina de la fórmula



12. Composición para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-propilespermidina de la fórmula



13. Composición para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) es N<sup>1</sup>-isobutilespermidina de la fórmula

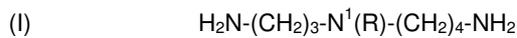


5 14. Composición para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) está presente en una cantidad, en porcentaje en peso (% p/p), desde 0,0001 hasta 0,30.

10 15. Composición para su uso según la reivindicación 14, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) está presente en una cantidad, en porcentaje en peso (% p/p), desde 0,010 hasta 0,30.

16. Composición para su uso según la reivindicación 14, en donde dicho compuesto de la fórmula (I) está presente en una cantidad, en porcentaje en peso (% p/p), desde 0,0001 hasta 0,15.

15 17. Compuestos de la fórmula (I) R-N<sup>1</sup>-espermidina, es decir, 1,4-butanodiamina,N-(3-aminopropil)-N<sup>1</sup>-R,



en donde R es un sustituyente unido a la función de amina secundaria de la espermidina, seleccionado de:

20 metilo, etilo, propilo, isobutilo o una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente, para su uso en el tratamiento de los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria.

25 18. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de los efectos del envejecimiento de la piel mediante una acción antiinflamatoria.

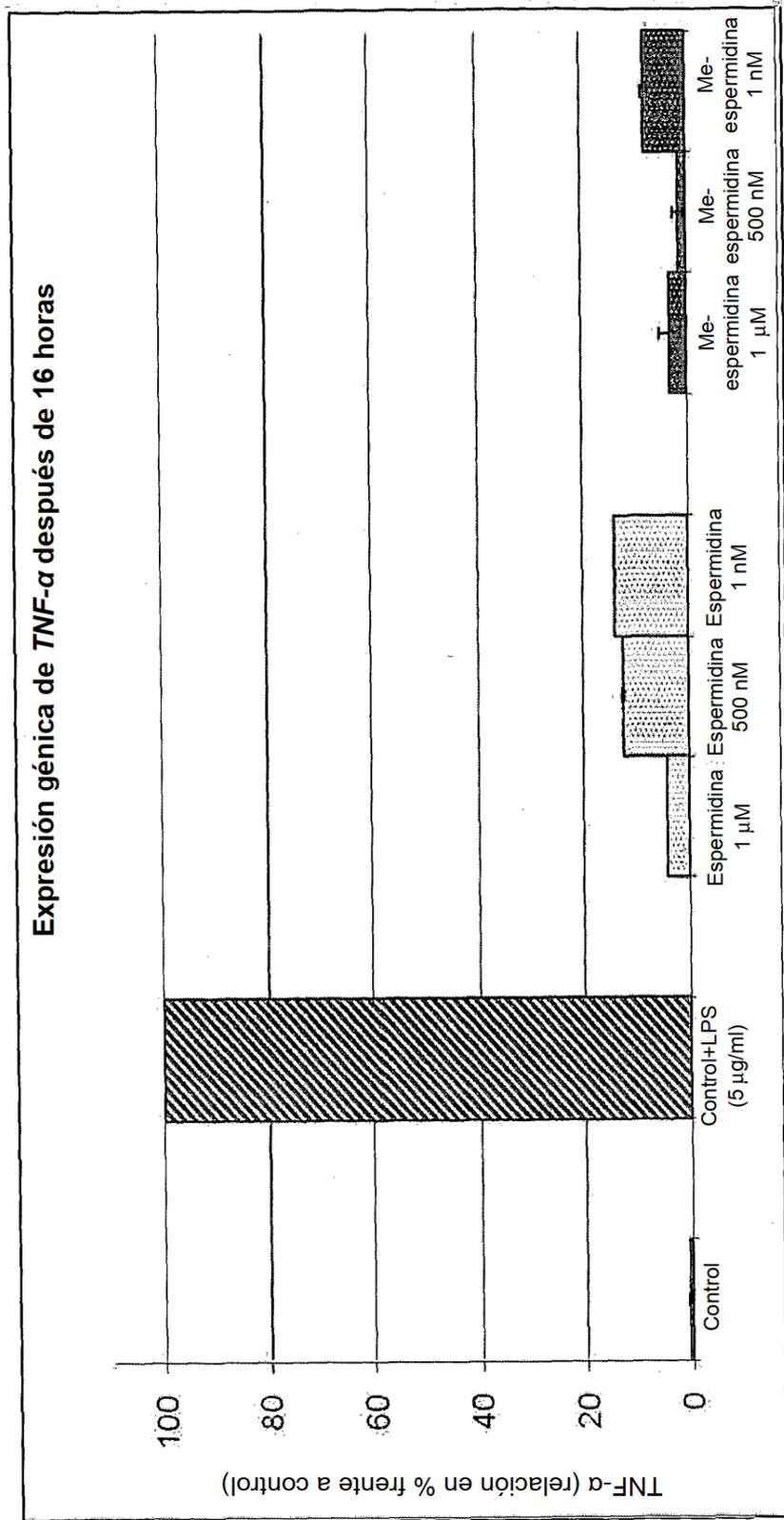
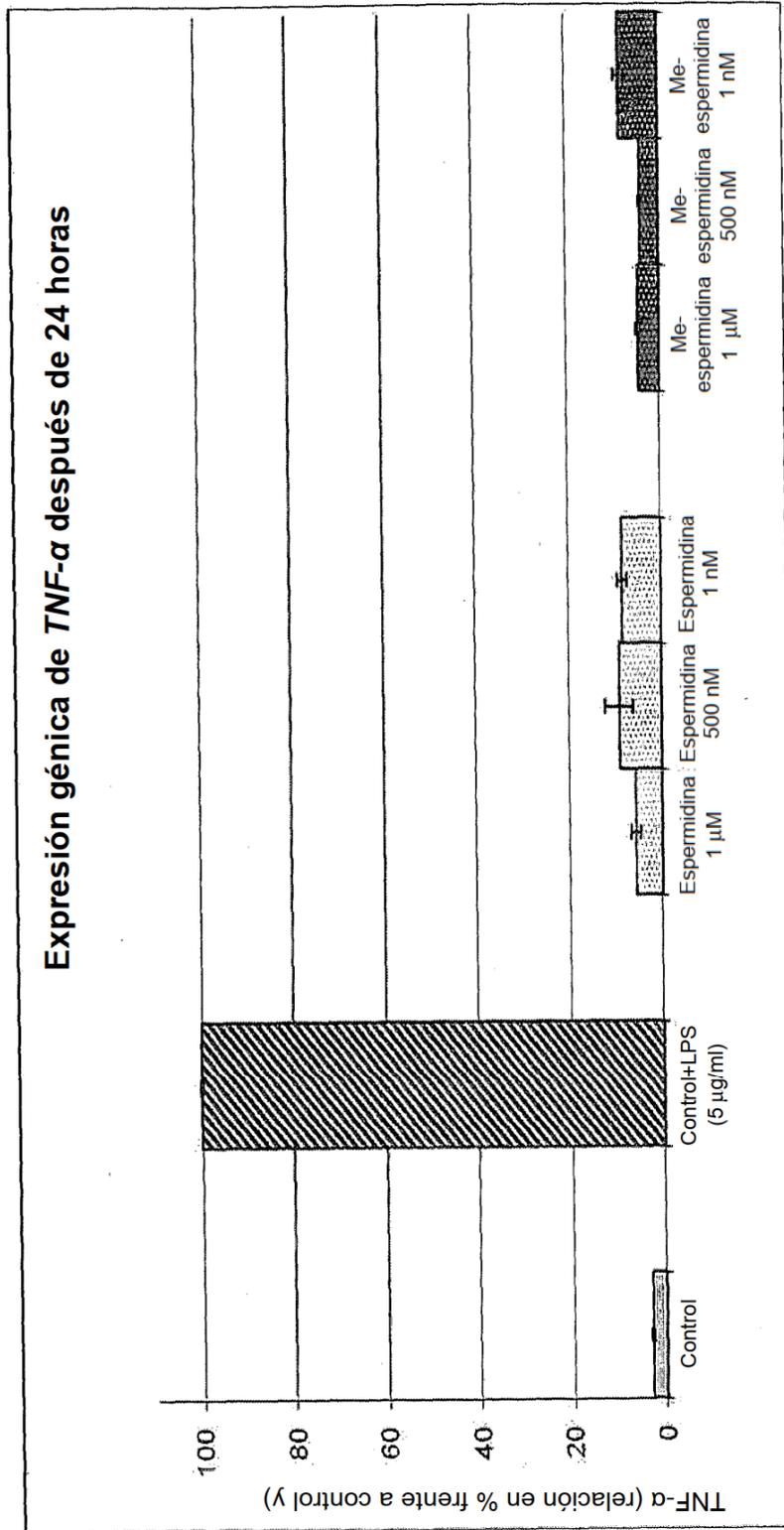


Fig. 1



**Fig. 2**

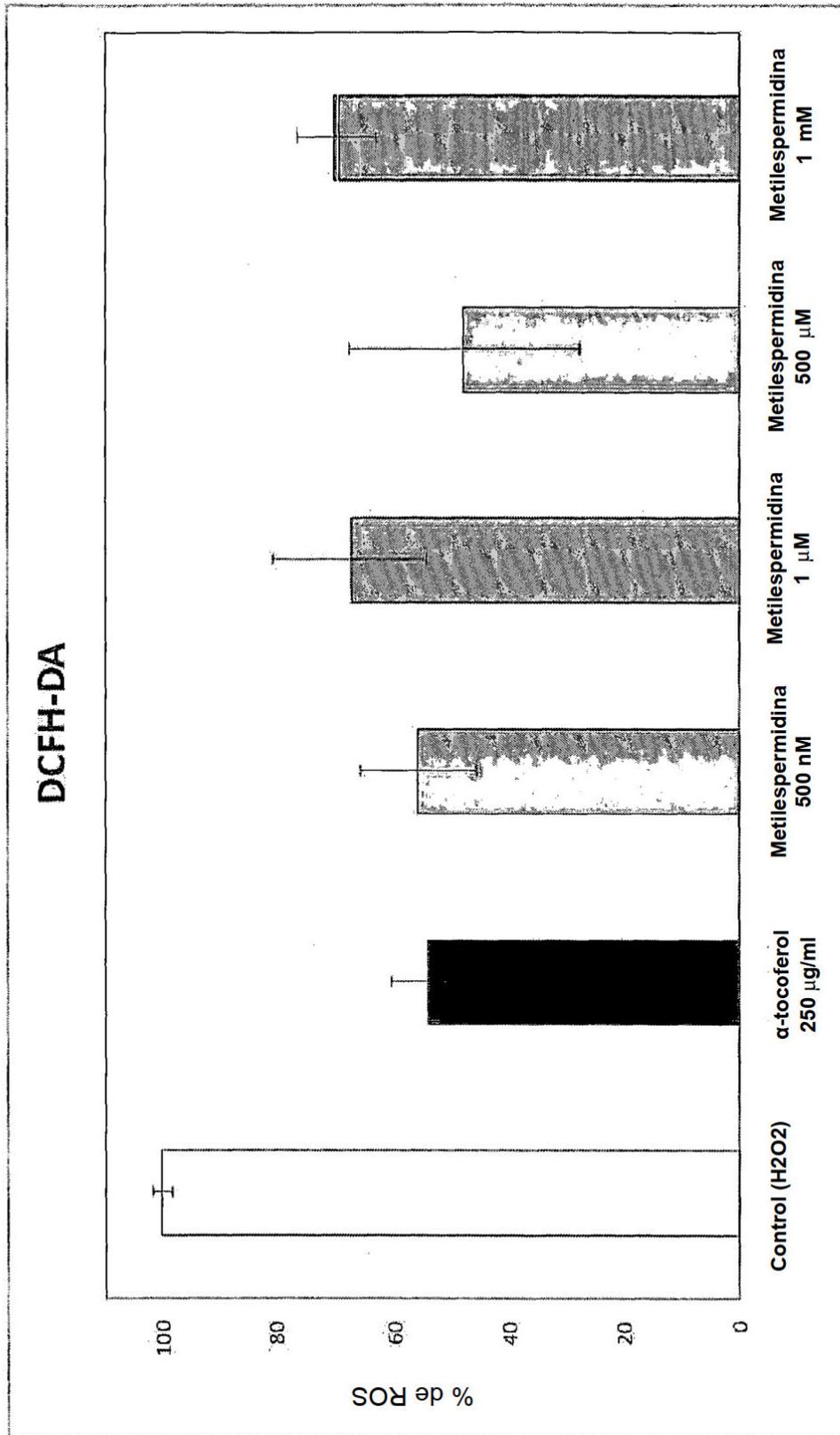


Fig. 3

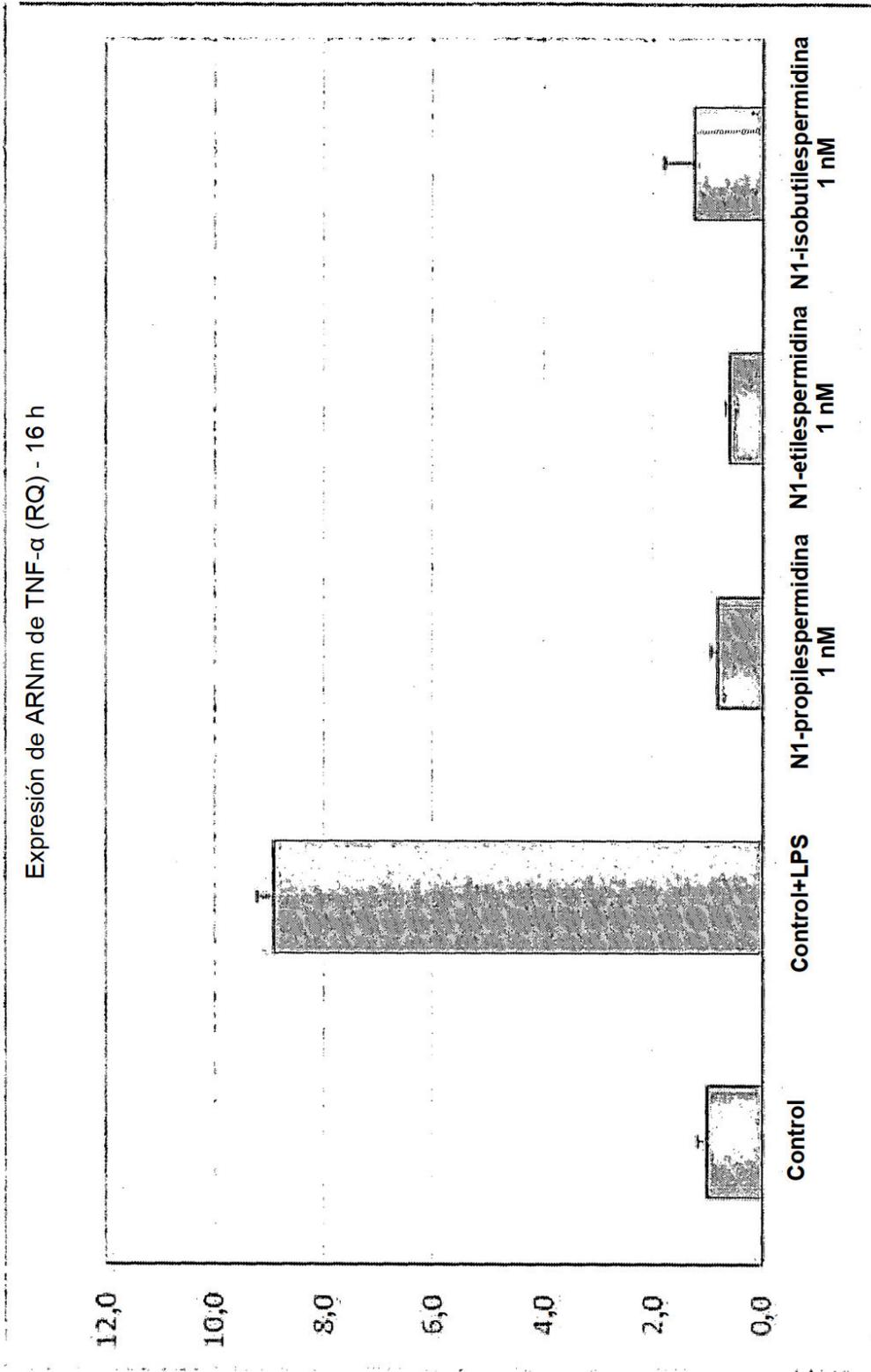


Fig. 4

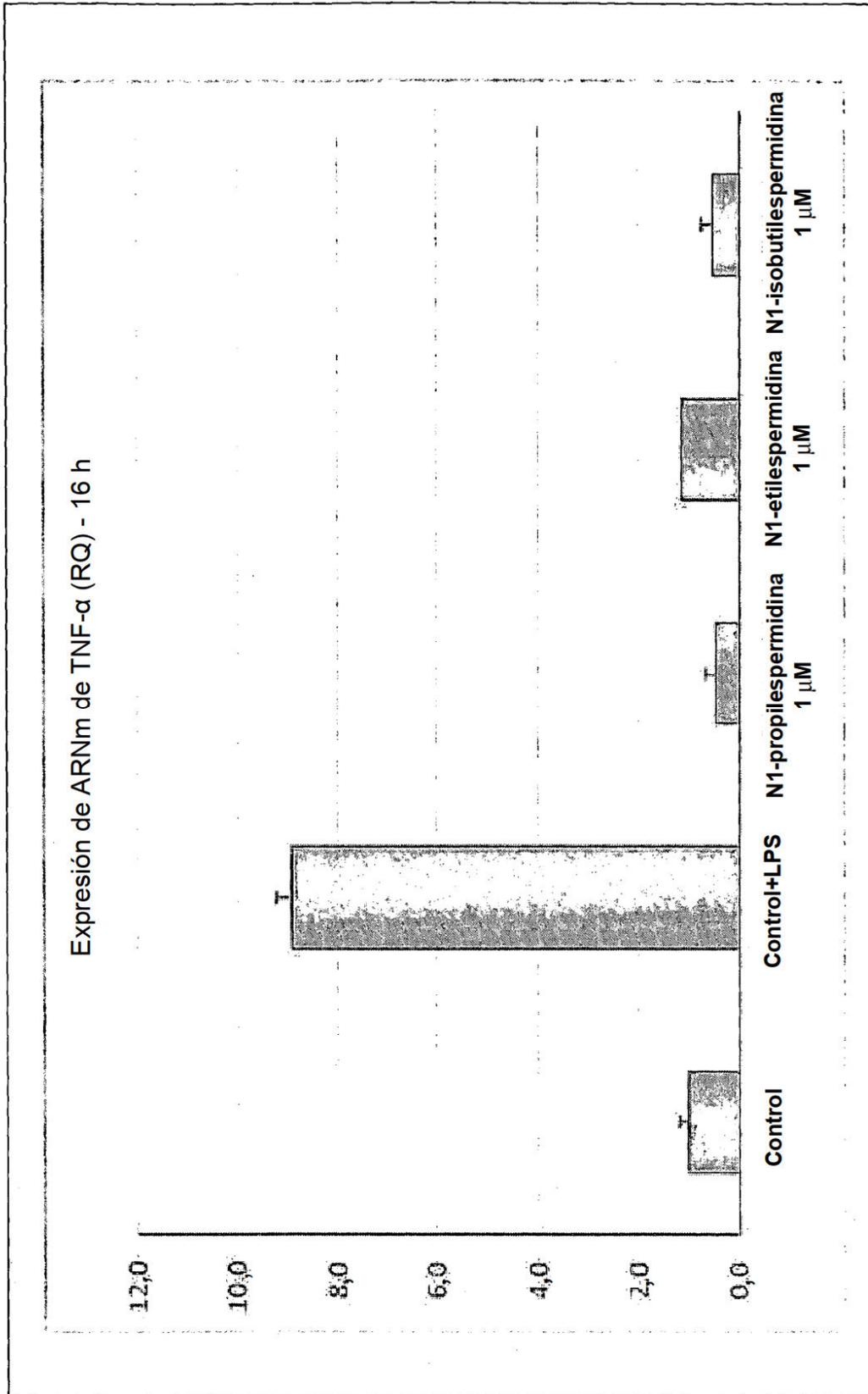


Fig. 5