



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 811**

51 Int. Cl.:

C07H 13/06 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04292619 .6**

86 Fecha de presentación : **04.11.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1531158**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Composición de lípido A y tópico, en particular un cosmético.**

30 Prioridad: **06.11.2003 FR 03 50798**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **L'ORÉAL**
14, rue Royale
75008 Paris, FR

72 Inventor/es: **Martin, Richard**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 271 811 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 de lípido A y tópico, en particular un cosmético.

5 La presente invención se relaciona con un nuevo compuesto del tipo lípido A, así como con las composiciones que lo contienen y con sus utilizaciones cosméticas y dermatológicas.

10 La piel constituye el órgano más importante del organismo y se la reconoce como uno de los principales elementos activos del sistema de defensa inmunitaria. Tres tipos de células epidérmicas participan en este sistema: los queratinocitos, los melanocitos y las células de Langerhans. Estas células, que no se encuentran más que a nivel de la piel, juegan un papel primordial en la respuesta inmunitaria y en particular en la presentación antigénica.

15 La piel sana es capaz de defenderse de las agresiones exteriores gracias a los medios puestos a su disposición. Se sabe, sin embargo, que el sistema inmunitario, y más concretamente el de la piel, se debilita en el curso del envejecimiento cronobiológico.

20 Además, la piel está sometida a la agresión permanente del ambiente y de ciertos productos químicos. En particular, las células de Langerhans son el blanco privilegiado de las radiaciones ultravioletas. Estas agresiones se traducen por un efecto supresor de las defensas inmunitarias.

25 Esto tiene especialmente como consecuencia una destrucción peor de las "sunburn cells", cuya acumulación genera citokinas, que son susceptibles de generar por sí mismas radicales libres y de alterar la dermis (en particular favoreciendo la degradación del colágeno) y la epidermis (en particular ralentizando la renovación del epitelio). Estos efectos concurren en una aceleración del envejecimiento cutáneo.

30 Un efecto inmunoestimulante puede entonces restablecer las funciones inmunitarias y más particularmente las de la epidermis, reforzando las defensas naturales de la piel, y permitir así especialmente luchar contra, o prevenir, los signos cutáneos del envejecimiento.

35 Se conocen en la técnica anterior extractos bacterianos dotados de propiedades inmunoestimulantes. Se sabe además que los lipopolisacáridos (designados a continuación como LPS) anclados en la membrana externa de estas bacterias son en parte responsables de estas propiedades.

40 Los LPS son moléculas químicas complejas, de masa molecular comprendida entre 8.000 y 54.000 aproximadamente, que tienen una estructura dispuesta en tres compartimentos, que, desde el exterior hacia el interior, son:

- el antígeno O, que es un polímero, específico para una cepa dada, constituido por 1 a 10 unidades, cada una de las cuales comprende un encadenamiento de 5 a 7 azúcares generalmente aminorados;

45 - el Núcleo, que es un polisacárido muy conservador de un género bacteriano a otro y que está unido al lípido A por una molécula específica de las bacterias Gram negativas, el KDO (ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico), y

- el lípido A, que ancla el LPS en la membrana externa de la bacteria.

50 El lípido A es un dímero de glucosamina portador por condensación, sobre sus grupos hidroxilados situados en las posiciones 3 y 3', así como sobre sus grupos amino, situados en las posiciones 2 y 2', de ácidos grasos más o menos insaturados e hidroxilados que pueden a su vez estar esterificados, sobre sus grupos hidroxilo, por otros ácidos grasos. Son estos ácidos grasos los que permiten el anclaje del lípido A en la membrana externa de la célula, que es de naturaleza fosfolipídica. Además, su naturaleza (C₁₂-C₁₈) y su posicionamiento sobre las glucosaminas determinan la actividad biológica de los lípidos A y, por lo tanto, de los LPS.

55 La investigación de LPS biológicamente activos se topa, sin embargo, con el problema de la endotoxicidad de estas moléculas. En efecto, la mayor parte de los LPS poseen un lípido A, que, una vez desanclado de la membrana celular, es capaz de fijarse a los receptores CD14 y de activarlos, conllevando así especialmente una liberación de TNF susceptible de provocar un choque séptico.

60 Se han conducido, pues, investigaciones con vistas a determinar qué factores estructurales podían influir en el carácter agonista o antagonista de los receptores CD14 de estos LPS. Se ha evidenciado así que los LPS de forma cilíndrica y/o cuyos ácidos grasos están dispuestos simétricamente sobre el esqueleto de glucosamina son más bien antagonistas de CD14, en oposición a los LPS de forma cónica y/o asimétricos.

65 Es en este contexto que la Solicitante ha descubierto un nuevo lípido A dotado de propiedades inmunoestimulantes, estando al mismo tiempo desprovisto de toxicidad. Este lípido A tiene una estructura muy próxima (de dos átomos de carbono aproximadamente) a la presente en el LPS de *Neisseria meningitidis*, tal como se describe en la patente US-6.482.807 (Figura 4a), sin no obstante presentar su toxicidad.

Berardesca y col. (J. Appl. Cosmetol., 15, 69-75 (1997)) describen la utilización de extractos de *Vitreoscilla filiformis* con fines antiarrugas y antienvjecimiento, pero no especifican, sin embargo, ninguna fórmula.

El lípido A según la invención fue inicialmente aislado a partir de una cepa de *Vitreoscilla filiformis*.

La cepa bacteriana *Vitreoscilla filiformis* es utilizada actualmente por la Solicitante para la fabricación de una biomasa introducida en productos cosméticos. El procedimiento de preparación de esta biomasa comprende el cultivo de las bacterias en medio estéril oxigenado, en presencia de sales minerales y de azúcares, y la recuperación, tras la centrifugación, del medio de cultivo que contiene las bacterias para obtener una biomasa que se pone en frascos y se esteriliza después. El estallido de las células resultantes de la esterilización provoca una decantación de la biomasa en un lodo que incluye esencialmente membranas celulares y proteínas coaguladas y que contiene aproximadamente un 70% en peso de LPS y en un sobrenadante que incluye el citoplasma y que contiene aproximadamente un 30% del peso de LPS, conteniendo la bacteria entera (en peso seco) aproximadamente un 10% de LPS. Se reconstituye una biomasa homogénea por agitación antes de su empleo.

Diversos extractos de *Vitreoscilla filiformis*, dotados de propiedades inmunoestimulantes y no tóxicas, han sido descritos por la Solicitante con vistas a una utilización cosmética o farmacéutica, en particular en el tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento.

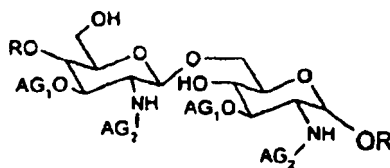
Así, la solicitud EP-0.765.667 utiliza una fracción de bacterias rica en ribosomas, obtenida por centrifugación de la biomasa y diálisis del sobrenadante obtenido. La solicitud EP-0.876.813 describe además una fracción inmunoestimulante, obtenida a partir del medio de cultivo de estas bacterias. Finalmente, la solicitud WO 94/02158 divulga la utilización como estimulante inmunitario de envueltas de bacterias o de fracciones, especialmente del LPS, obtenidas a partir de dichas envueltas.

Sin embargo, las fracciones descritas en la técnica anterior antes mencionada no contenían más que una cantidad muy baja, indetectable en la práctica, de lípido A libre, cuya estructura no había sido nunca elucidada hasta la fecha, encontrándose lo esencial del lípido A en forma de LPS a su vez presente en una cantidad relativamente baja en la mayor parte de los extractos de la técnica anterior.

Además, no era evidente que los efectos inmunoestimulantes de las fracciones bacterianas de la técnica anterior estuviesen ligados a la presencia de LPS. En efecto, el LPS no está presente más que en baja cantidad al lado de otros inmunógenos, que son especialmente la mureína contenida en las membranas celulares o los ribosomas presentes en el citoplasma (sobrenadante). Además, se podía pensar que el tratamiento térmico utilizado para recuperar estas fracciones (121°C durante 40 min.) había desnaturalizado el LPS, haciéndolo así inactivo. Sobre todo, no era previsible que los efectos inmunoestimulantes de las fracciones bacterianas de la técnica anterior pudieran conservarse por el LPS que contenían, sin riesgo de toxicidad, después de ser separado de las membranas celulares y volverse así potencialmente activo frente a los receptores CD14.

Es, pues, de manera sorprendente que la Solicitante, habiendo identificado el lípido A presente en el LPS de *Vitreoscilla filiformis*, haya mostrado que presentaba una actividad inmunoestimulante estando al mismo tiempo desprovisto de toxicidad. Este descubrimiento ha permitido a la Solicitante contemplar su utilización en el campo cosmético, donde, contrariamente al campo farmacéutico, se buscan compuestos activos que presenten una perfecta tolerancia.

La invención tiene, por consiguiente, como objeto un nuevo lípido A caracterizado por estar constituido por un compuesto seleccionado entre: (a) los compuestos de fórmula (I):



donde:

AG₁ representa un grupo 3-hidroxidecanoílo,

AG₂ representa un grupo 3-dodecanoiloxidecanoílo y

R representa un átomo de hidrógeno o un grupo PO(OR')₂, representando R' un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, C₁-C₆ o un grupo fenilo o bencilo, y

(b) en el caso en que R representa un grupo PO(OH)₂ en la fórmula (I) anterior, una sal inorgánica del compuesto de fórmula (I) o una sal de amina primaria, secundaria o terciaria del compuesto de fórmula (I) o una sal de fosfoetanolamina del compuesto de fórmula (I),

entendiéndose que, cuando están presentes varios grupos R, respectivamente R', son idénticos o diferentes los unos de los otros.

ES 2 271 811 T3

La sal de amina del compuesto de fórmula (I) puede ser seleccionada entre las sales de mono-, di- y trietanolamina, las sales de mono-, di- o triisopropanolamina, el 2-amino-2-metil-1-propanol, el 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol y el tris(hidroximetil)aminometano.

5 Las sales inorgánicas del compuesto de fórmula (I) pueden ser especialmente sales de sodio, magnesio, potasio, zinc o calcio.

La invención tiene igualmente por objeto una composición adaptada a una aplicación tópica sobre la piel, que contiene, en un medio cosméticamente aceptable, tal lípido A.

10

Por cosméticamente aceptable, se entiende en el sentido de la presente invención un medio inerte que no conlleva comezones, picazones o enrojecimientos susceptibles de apartar al usuario de la composición y que presenta un aspecto, un olor y un tacto agradables.

15

La presente invención tiene aún por objeto la utilización cosmética de un lípido A tal como se ha definido antes, o la composición antes citada, para el cuidado de la piel, en particular para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y/o para proteger la piel contra los efectos perjudiciales de los UV.

20

Tiene también por objeto un procedimiento de tratamiento cosmético de la piel, consistente en la aplicación tópica sobre la piel de la composición antes citada. Este procedimiento está, en particular, destinado a prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y/o a proteger la piel contra los efectos perjudiciales de los UV.

25

Tiene aún por objeto la utilización del lípido A tal como se ha definido anteriormente para la preparación de una composición dermatológica destinada a reforzar las defensas inmunitarias cutáneas.

El lípido A según la invención puede ser preparado por síntesis química, según el procedimiento ilustrado en la Figura adjunta y descrito con más detalle en el Ejemplo 1 que se dará más adelante.

30

Como variante, puede ser obtenido a partir de un cultivo de bacterias filamentosas no fotosintéticas y no fructificantes.

35

En esta variante del procedimiento, se puede utilizar un cultivo de bacterias del orden de las Beggiatoales, por ejemplo del género *Beggiatoa*, tales como diversas cepas de *Beggiatoa alba* según la definición dada en Arch. Microbiol. (1984) 137, 139-144. Se puede utilizar también un cultivo de bacterias del género *Vitreoscilla*, *Flexithrix* o *Leucothrix*. Estas bacterias pueden encontrarse en el agua o en ciertas fuentes termales.

Entre las bacterias utilizables, se pueden citar especialmente:

40

- *Vitreoscilla beggiatoides* (ATCC 43181)

- *Vitreoscilla stercoraria* (ATCC 15218)

- *Vitreoscilla beggiatoides* (ATCC 43181)

45

- *Beggiatoa alba* (ATCC 33555)

- *Flexithrix dorothaea* (ATCC 23163)

50

- *Leucothrix mucor* (ATCC 25107).

55

Estas bacterias pueden ser cultivadas según procedimientos conocidos, tales como los descritos, por ejemplo, en la solicitud WO 94/02158, para obtener una biomasa que puede ser separada y aislada de diferentes maneras, por ejemplo por filtración o centrifugación. Se extrae entonces de esta biomasa una fracción lipopolisacárida, por ejemplo según el método llamado de Westphal (Westphal, O. y Jann, K. (1965), en R.L. Whistler (ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 5, Academic Press, New York, pp. 83-91). Este método consiste en una extracción con ayuda de mezclas fenol-agua a 65°C, seguida de una diálisis con vistas a eliminar el fenol. Se obtiene así una fracción bacteriana concentrada en LPS. El lípido A según la invención puede ser entonces obtenido a partir de esta fracción, por ejemplo siguiendo uno de los métodos descritos en Morrison, D.C. y Leive, L. (1975), J. Biol. Chem., 250, 2911-2919, o Takayama, K. (1981), Cancer Research 41, 2654-2657.

60

La composición según la presente invención contiene una cantidad suficiente de lípido A para obtener el efecto buscado, y preferiblemente de un 0,01 a un 0,1% en peso de este compuesto con respecto al peso total de la composición.

65

La composición según la invención puede presentarse en todas las formas galénicas clásicamente utilizadas para una aplicación tópica y especialmente en forma de geles acuosos o de soluciones acuosas o hidroalcohólicas. Puede también presentarse, por adición de una fase grasa u oleosa, en forma de dispersiones de tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase

acuosa (Ac/Ag) o a la inversa (Ag/Ac), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda, semisólida o sólida de tipo crema o gel, o también de emulsiones múltiples (Ag/Ac/Ag o Ac/Ag/Ac), de microemulsiones, de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico o de dispersiones de cera/fase acuosa. Estas composiciones son preparadas según los métodos habituales.

Según un modo preferido de realización de la invención, la composición se presenta en forma de emulsión.

La composición utilizada según la invención puede ser más o menos fluida y tener el aspecto de una crema blanca o coloreada, de una pomada, de una leche, de una loción, de un suero, de una pasta o de una espuma. Puede ser eventualmente aplicada sobre el contorno del ojo en forma sólida, y por ejemplo en forma fluida, en copela o en forma de barra.

Cuando la composición está en forma de emulsión, la proporción de la fase oleosa de la emulsión puede ir, por ejemplo, del 5 al 80% en peso y preferiblemente del 5 al 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, los emulsores y los coemulsores utilizados en la composición en forma de emulsión son seleccionados entre los clásicamente utilizados en el campo cosmético o dermatológico. El emulsor y el coemulsor están generalmente presentes en la composición en una proporción que va del 0,3 al 30% en peso y preferiblemente del 0,5 al 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede además contener vesículas lipídicas.

Como materias grasas utilizables en la invención, se pueden utilizar los aceites y especialmente los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites de origen vegetal (aceite de aguacate, aceite de soja), los aceites de origen animal (lanolina), los aceites de síntesis (perhidroescualeno), los aceites siliconados (ciclometicona) y los aceites fluorados (perfluoropolíéters). Se pueden utilizar también como materias grasas alcoholes grasos tales como el alcohol cetílico, ácidos grasos, ceras y gomas, y en particular las gomas de silicona.

Como emulsores y coemulsores utilizables en la invención, se pueden citar, por ejemplo, los ésteres de ácido graso y de polietilenglicol, tales como el estearato de PEG-100, el estearato de PEG-50 y el estearato de PEG-40; los ésteres de ácido graso y de poliol, tales como el estearato de glicerilo, el triestearato de sorbitán y los estearatos de sorbitán oxietilenados disponibles bajo las denominaciones comerciales Tween® 20 ó Tween® 60, por ejemplo, y sus mezclas.

La composición según la invención puede también contener los adyuvantes habituales en los campos cosmético y dermatológico, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los principios activos, los filtros, los conservantes, los solventes, los perfumes, las cargas, los pigmentos, los absorbentes de olor y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las clásicamente utilizadas en los campos considerados y, por ejemplo, del 0,01 al 20% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa o en la fase acuosa. Estos adyuvantes, así como sus concentraciones, deben ser tales que no perjudiquen a las propiedades ventajosas según la invención.

Como gelificantes hidrófilos, se pueden citar, en particular, los polímeros carboxivinílicos (carbómero), los copolímeros acrílicos, tales como los copolímeros de acrilatos/metilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos, las gomas naturales y las arcillas, y, como gelificantes lipófilos, se pueden citar las arcillas modificadas, como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos y la sílice hidrofóbica.

Como principios activos, la composición según la invención puede especialmente contener al menos un compuesto seleccionado entre: los agentes descamantes o hidratantes, los agentes despigmentantes, los agentes anti-glicación, los inhibidores de la NO-sintasa, los agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que impiden su degradación, los agentes estimulantes de la proliferación de los fibroblastos o de los queratinocitos y/o de la diferenciación de los queratinocitos, los agentes tensores, los agentes anti-polución y/o anti-radicales y los agentes miorrelajantes o dermodescontracturantes.

Son ejemplos de principios activos preferidos para una utilización en la presente invención: el ácido (N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etano)sulfónico (HEPES), el ácido 2-oxotiazolidina-4-carboxílico (procisteína), los α - y β -hidroxiácidos, en particular el ácido 5-n-tanoilsalicílico, las ceramidas, las sapogeninas y los extractos vegetales, en particular de Name Silvestre, que las contienen, el resveratrol, el ácido ascórbico y sus derivados, los retinoides y carotenoides, en particular el retinol, los ésteres de retinilo y el licopeno, los pseudodipéptidos tales como el ácido {2-[acetil(3-trifluorometilfenil)amino]-3-metilbutirilamino}acético, los extractos de soja, en particular los hidrolizados de proteína de soja o los extractos de soja ricos en isoflavonas, el tocoferol y sus ésteres y sus mezclas.

Como filtros utilizables en la presente invención, se pueden citar los agentes fotoprotectores orgánicos o inorgánicos, activos en el UVA y/o el UVB, liposolubles, hidrosolubles o insolubles en los solventes cosméticos.

Los agentes fotoprotectores orgánicos son especialmente seleccionados entre los antranilatos; los derivados cinámicos; los derivados de dibenzoilmetano; los derivados salicílicos; los derivados del alcanfor; los derivados de triazina tales como los descritos en las solicitudes de patente EE.UU. 4.367.390, EP 863.145, EP 517.104, EP 570.838, EP 796.851, EP 775.698, EP 878.469, EP 933.376, EP 507.691, EP 507.692, EP 790.243 y EP 944.624; los derivados de la benzofenona; los derivados de β,β -difenilacrilato; los derivados de benzotriazol; los derivados de benzalmalonato; los derivados de bencimidazol; las imidazolininas; los derivados de bisbenzoazolilo tales como los descritos en las patentes EP 669.323 y EE.UU. 2.463.264; los derivados del ácido p-aminobenzoico (PABA); los derivados de metilenbis(hidro-

ES 2 271 811 T3

xifenilbenzotriazol) tales como los descritos en las solicitudes EE.UU. 5.237.071, EE.UU. 5.166.355, GB 2.303.549, DE 197 26 184 y EP 893.119; los polímeros filtro y las siliconas filtro tales como los descritos especialmente en la solicitud WO-93/04665; los dímeros derivados de α -alquilestireno tales como los descritos en la solicitud de patente DE 19.855.649; los 4,4-diarilbutadienos tales como los descritos en las solicitudes EP 0.967.200, DE 19.746.654, DE 19.755.649, EP-A-1.008586, EP 1.133.980 y EP 133.981, y sus mezclas.

Como ejemplos de agentes fotoprotectores activos en el UV-A y/o el UV-B, se pueden citar los designados anteriormente bajo su nombre INCI:

- 10 • los derivados del ácido para-aminobenzoico, entre ellos los siguientes: PABA, etil-PABA, etildihidroxi-propil-PABA, etil-hexildimetil-PABA, vendido especialmente bajo la denominación “ESCALOL 507” por ISP, gliceril-PABA y PEG-25-PABA, vendido bajo la denominación “UVINUL P25” por BASF;
- 15 • los derivados salicílicos, entre ellos los siguientes: homosalato, vendido especialmente bajo la denominación “NEO HELIOPAN OS” por HAARMANN y REIMER, salicilato de dipropilenglicol, vendido especialmente bajo la denominación “DIPSAL” por SCHER, y salicilato de TEA, vendido especialmente bajo la denominación “NEO HELIOPAN TS” por HAARMANN y REIMER;
- 20 • los derivados del dibenzoilmetano, entre ellos los siguientes: butilmetoxidibenzoilmetano, vendido especialmente bajo la denominación comercial “PARSOL 1789” por HOFFMANN LAROCHE, e isopropildibenzoilmetano.
- 25 • los derivados cinámicos, entre ellos los siguientes: metoxicinamato de etilhexilo, vendido especialmente bajo la denominación comercial “PARSOL MCX” por HOFFMANN LAROCHE, metoxicinamato de isopropilo, metoxicinamato de isoamilo, vendido especialmente bajo la denominación comercial “NEO HELIOPAN E 1000” por HAARMANN y REIMER, cinoxato, metoxicinamato de DEA, metilcinamato de diisopropilo y etilhexanoato dimetoxicinamato de glicerilo;
- 30 • los derivados de β,β' -difetilacrilato, entre ellos los siguientes: octocrileno, vendido especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL N539” por BASF, y etocrileno, vendido especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL N35” por BASF;
- 35 • los derivados de la benzofenona, entre ellos los siguientes: benzofenona-1, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL 400” por BASF, benzofenona-2, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL D50” por BASF, benzofenona-3 u oxibenzona, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL M40” por BASF, benzofenona-4, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL MS40” por BASF, benzofenona-5, benzofenona-6, vendida especialmente bajo la denominación comercial “HELISORB 11” por NORQUAY, benzofenona-8, vendida especialmente bajo la denominación comercial “SPECTRA-SORB UV-24” por AMERICAN CYANAMID, benzofenona-9, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL DS-49” por BASF, benzofenona-12 y 2-(4-dietilamino-2-hidroxibenzoil)benzoato de n-hexilo;
- 40 • los derivados de bencilidenalcanfor, entre ellos los siguientes: 3-bencilidenalcanfor, 4-metilbencilidenalcanfor, vendido especialmente bajo la denominación “EUSOLEX 6300” por MERCK, ácido bencilidenalcanforsulfónico, metosulfato de alcanforbenzalconio, ácido tereftalilidendialcanforsulfónico y poliacrilamidometilbencilidenalcanfor;
- 45 • los derivados de bencimidazol, entre ellos los siguientes: ácido fenilbencimidazolsulfónico, vendido especialmente bajo la denominación comercial “EUSOLEX 232” por MERCK, y fenildibencimidazoltetra-sulfonato disódico, vendido especialmente bajo la denominación comercial “NEO HELIOPAN AP” por HAARMANN y REIMER;
- 50 • los derivados de triazina, entre ellos los siguientes: anisotriazina, vendida especialmente bajo la denominación comercial “TINOSORB S” por CIBA SPECIALTY CHEMICALS, etilhexiltriazona, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVINUL T150” por BASF, dietilhexilbutamidotriazona, vendida especialmente bajo la denominación comercial “UVASORB HEB” por SIGMA 3V, y 2,4,6-tris(4'-aminobenzal-malonato de diisobutilo)-s-triazina;
- 55 • los derivados de benzotriazol, entre ellos los siguientes: drometrisoltrisiloxano, vendido bajo la denominación “SILATRIZOLE” por RHODIA CHIMIE, metilbisbenzotriazoliltetrametilbutilfenol, vendido especialmente en forma sólida bajo la denominación comercial “MIXXIM BB/100” por FAIRMOUNT CHEMICAL o en forma micronizada en dispersión acuosa bajo la denominación comercial “TINOSORB M” por CIBA SPECIALTY CHEMICALS;
- 60 • los derivados antranílicos, entre ellos el antranilato de mentilo vendido bajo la denominación comercial “NEO HELIOPAN MA” por HAARMANN y REIMER;
- 65 • los derivados de imidazolin, entre ellos el dimetoxibencilidendioximidazolinapropionato de etilhexilo.

También se pueden citar los derivados de benzalmalonato, entre ellos el poliorganosiloxano con funciones benzalmalonato vendido bajo la denominación comercial "PARSOL SLX" por HOFFMANN LAROCHE, así como los derivados de 4,4-diarilbutadieno, entre ellos el 1,1-di-carboxi(2,2'-dimetilpropil)-4,4-difenilbutadieno.

5 Los agentes fotoprotectores orgánicos más particularmente preferidos son seleccionados entre los compuestos siguientes: salicilato de etilhexilo, metoxicinamato de etilhexilo, octocrileno, ácido fenilbencimidazolsulfónico, benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-5, 4-metilbencilidenalcanfor, ácido tereftalilidendialcanforsulfónico, fenilbencimidazoltetrasulfonato disódico, 2,4,6-tris(4'-aminobenzalmalonato de diisobutilo)-s-triazina, anisotriazina, etilhexiltriazona, dietil-hexilbutamidotriazona, metilbisbenzotriazoliltetrametilbutilfenol, drometrizoltrisiloxano, 1,1-dicarboxi-(2,2'-dimetilpropil)-4,4-difenilbutadieno y sus mezclas.

10 Los agentes fotoprotectores inorgánicos son seleccionados entre pigmentos o también nanopigmentos (tamaño medio de las partículas primarias: generalmente entre 5 nm y 100 nm, preferiblemente entre 10 nm y 50 nm) de óxidos metálicos recubiertos o no, como, por ejemplo, nanopigmentos de óxido de titanio (amorfo o cristalizado en forma de rutilo y/o anatasa), de hierro, de zinc, de zirconio o de cerio, que son todos agentes fotoprotectores UV bien conocidos *per se*. Son agentes de recubrimiento clásicos, además, la alúmina y/o el estearato de aluminio. Tales nanopigmentos de óxidos metálicos, recubiertos o no recubiertos, están en particular descritos en las solicitudes de patente EP 518.772 y EP 518.773.

20 Los filtros están generalmente presentes en las composiciones según la invención en proporciones que van del 0,1 al 20% en peso con respecto al peso total de la composición y preferiblemente que van del 0,2 al 15% en peso con respecto al peso total de la composición.

25 La invención será ahora ilustrada por los ejemplos no limitativos siguientes. En estos ejemplos, las cantidades están indicadas en porcentaje ponderal. Los constituyentes de las composiciones son designados según la nomenclatura CTFA.

Ejemplos

30 Ejemplo 1

Preparación del lípido A

a) *Síntesis de A*

35 Se trata una solución que contiene glucosamina comercial A' (1,4 mmol) y 3-dodecanoiloxidecanoílo (1,54 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) con EDC.MeI (2,10 mmol) y se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se concentra entonces la mezcla de reacción y se purifica el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice.

40 Se disuelve el compuesto anterior (15,2 mmol) con 3-hidroxidecanoílo (16,7 mmol) y 4-pirrolidinopiridina (1,7 mmol) en CH₂Cl₂ (95 ml). Se añade EDC.MeI (16,7 mmol) y se agita el medio a temperatura ambiente toda la noche. Se concentra entonces la mezcla de reacción y se purifica el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice.

45 Se disuelve el acetónido obtenido anteriormente en una mezcla de ácido acético/agua (4/1) y se calienta a 60°C durante 1 h. Se concentra entonces el medio y se purifica por cromatografía instantánea sobre gel de sílice para obtener el intermediario A.

b) *Síntesis de B*

50 Se obtiene B' a partir del producto comercial B'' aplicando el mismo protocolo utilizado para la síntesis de A (véase lo anterior).

55 Se añade TCBOC-Cl (13,2 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) gota a gota durante 15 min. a una solución a 0°C que contiene B' (12 mmol) y piridina (25 mmol) en CH₂Cl₂ (125 ml). Se lleva entonces la mezcla suavemente a temperatura ambiente durante 3,5 h. Se añaden sucesivamente 4-pirrolidinopiridina (6,0 mmol), N,N-diisopropiletilamina (60 mmol) y clorofosfonato de difenilo (18 mmol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h. Se diluye entonces la reacción con CH₂Cl₂, se lava con una solución acuosa de HCl (7,5%) fría y luego con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se seca y concentra después. Se purifica el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice.

60 Se añade ZnCl₂ (1,0 M en éter, 2,41 mmol) a 0°C a una solución que contiene el compuesto antes obtenido (4,84 mmol) y diclorometil metil éter (24,2 mmol) en CHCl₃ (60 ml). Se lleva la mezcla suavemente a temperatura ambiente y se agita después a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluye entonces el medio de reacción con EtOAc, se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, se seca después y se concentra. Se purifica el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice para obtener el compuesto B.

ES 2 271 811 T3

c) Síntesis de C

Se agita una solución que contiene B (1,85 mmol) y A (1,54 mmol) en 1,2-dicloroetano (18,5 mmol) con criba molecular 4 A (1 g) durante 1 h y se trata después con AgOTf (5,55 mmol) en una sola porción. Después de haber agitado durante 4 h a temperatura ambiente en oscuridad, se añade un suplemento de AgOTf (1,85 mmol) y se agita la reacción durante toda la noche. Se filtra entonces la mezcla cremosa sobre celita y se concentra. Una purificación por cromatografía instantánea sobre gel de sílice permite obtener el compuesto C'.

Se hidrogena una solución que contiene C' (0,46 mmol) en una mezcla de AcOH (4,5 ml)/THF (40 ml) en presencia de PtO₂ (0,45 g) a temperatura ambiente bajo una presión de 70 psig durante 18 h. Se diluye la solución con CHCl₃/MeOH (2/1) y se sonica luego brevemente. Se filtra entonces el catalizador y se lava con la mezcla de CHCl₃/MeOH (2/1). Se reagrupan los filtrados y se concentran. Se purifica el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice.

Se agita el producto anterior (12 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) en presencia de N,N-diisopropiletilamina (60 mmol) y POCl₃ (18 mmol) a temperatura ambiente durante 5 h. Se concentra entonces la reacción. Se diluye luego el medio de reacción con CH₂Cl₂, se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, se seca después y se concentra. Se disuelve entonces el residuo en ácido acético (100 ml) y se calienta a 60°C con polvo de zinc (0,9 mmol). Se vuelve a enfriar entonces la reacción y se filtra sobre celita y se concentra después. Una purificación por cromatografía instantánea sobre gel de sílice permite obtener el compuesto C.

Ejemplo 2

Evidenciación del efecto inmunoestimulante

Se evaluó el efecto inmunoestimulante sobre una fracción de *Vitreoscilla filiformis* rica en LPS cuyo lípido A guarda conformidad con la presente invención.

a) Extracción del LPS

Se cultiva una cepa de *Vitreoscilla filiformis* (ATCC 15551) según el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO-9402158. Se efectúa el cultivo a 26°C durante al menos 48 horas hasta obtener una concentración celular conveniente correspondiente a una densidad óptica a 600 nm superior o igual a 1,5. Se traspara la cepa al 2% V/V a un medio nuevo cada 48 horas hasta la obtención de un cultivo estable. Se siembra entonces un Erlenmeyer de 1 litro que contiene 200 ml de medio nuevo con 4 ml del cultivo anterior.

Se efectúa el cultivo en Erlenmeyer a 26°C sobre una mesa de cultivo agitada a 100 revoluciones/minuto. El pie de cuba así obtenido sirve de inóculo a un fermentador de 10 l. Se efectúa el crecimiento a 26°C, pH 7, 100 revoluciones/minuto y pO₂ ≥ 15%.

Después de 48 horas de crecimiento, se transfiere la biomasa a un fermentador de 600 litros útiles para su cultivo en las mismas condiciones.

Se utilizó el medio de cultivo siguiente:

Composición	Concentración
Extracto autolítico de levadura Biokar (ref. 112002)	2,0 g/l
Peptona papaínica de soja (origen PPS-USP Biokar ref. 1 1601)	2,0 g/l
Microelementos de Heller	2,0 ml/l
Glucosa anhidra	2,0 g/l
CaCl ₂ , 10 H ₂ O	0,066 g/l
Agua destilada	100,0 ml

Se ajusta el pH a 7,15 por adición de sosa o de potasa 1N antes de la esterilización a 121°C durante 20 min.

ES 2 271 811 T3

La composición de los microelementos de Heller, para 1 l de agua destilada, es la siguiente:

5	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	1 g
	MnSO ₄ , H ₂ O	0,076 g
	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,003 g
10	KI	0,010 g
	H ₃ BO ₃	1 g
	AlCl ₃ , 6H ₂ O	0,050 g
15	NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,030 g

Se añaden a este medio de cultivo 0,2 g/l de un antiespuma de tipo polimetilsiloxano (Silbione 97350 RP). Se regula la temperatura entre 26 y 30°C, situándose el óptimo a 29°C.

Se efectúa un ciclo completo de crecimiento en 48 h aproximadamente. Se regula la aireación por medio de un debitómetro de masa para tener como mínimo un 20% de oxígeno disuelto. Ya no hay prácticamente glucosa residual al final del crecimiento.

Se efectúa la separación de la biomasa por centrifugación. Se opera en una centrífuga de tipo industrial enfriada a 4°C que permite obtener un poder separador equivalente a 8.000 g, impulsada durante 2 minutos.

Se congela entonces el medio de cultivo así recogido para una utilización diferida.

Antes de su utilización, se descongela el medio a 4°C y se transfieren luego las células a envases de 1 a 2 litros cerrados, que son autoclavados a 121°C durante un período de tiempo comprendido entre 20 y 40 minutos.

Se centrifugan entonces 420 ml de producto autoclavado a 100.000 g a 4°C durante 1 h 30. Se recuperan las pellas y se resuspenden después en 150 ml de tampón de solubilización. Después de calentar a 100°C durante una hora, se efectúa una centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 30 minutos. Se retiran 100 ml del sobrenadante, al cual se añaden 60 mg de proteinasa K (0,6 mg/ml). Después de calentar a 60°C durante una hora, se añaden 200 ml de una solución de cloruro de magnesio en metanol y se mantiene la composición obtenida a -20°C durante una noche. Se efectúan entonces dos precipitaciones en etanol a -20°C. Tras resuspensión en agua destilada, se dializa el producto obtenido frente a agua y se liofiliza después.

b) Expresión de las moléculas de superficie de las células de Langerhans

Se incuban células de Langerhans humanas normales, obtenidas por tratamiento enzimático, durante 18 horas con 100 µg/ml del producto obtenido en la etapa (a) anterior o con 100 µg/ml de LPS de *E. coli*, utilizado como control positivo.

Se repite el experimento tres veces.

Se expresa la expresión de la molécula HLA-DR en términos de forma de razón de intensidad media de fluorescencia. La razón de ésta, en los tres experimentos, es de 1,28 para el producto estudiado, no significativamente diferente de la medida para el LPS de referencia (1,19).

Además, la expresión de las moléculas B7-2, apreciada por microscopía electrónica y expresada por el número de granos de oro para 100 µm de membrana, es mucho mayor cuando se incuban las células con el producto estudiado (162,4 ± 13,7) que con el LPS de referencia (88,5 ± 8,3).

Finalmente, la capacidad de fagocitosis de perlas de látex por las células de Langerhans, expresada en número de perlas fagocitadas por 100 µm² de membrana, aumenta significativamente en presencia del producto estudiado (54,1 ± 11,4) y es superior a lo obtenido en presencia del LPS de referencia (34,7 ± 6,9).

Conclusión: el producto estudiado induce en la superficie de las células de Langerhans un aumento de expresión de las principales moléculas implicadas en el contacto con los linfocitos T, necesario para la iniciación de la respuesta inmune. Además, siendo la fagocitosis una de las primeras etapas de la actividad funcional de las células de Langerhans para asegurar la defensa del organismo frente a agentes patógenos bacterianos o víricos, su estimulación por el LPS estudiado deja suponer una actividad aumentada de la eliminación de agentes patógenos por las células de Langerhans, atribuible al lípido A de este LPS.

ES 2 271 811 T3

Ejemplo 3

Composición cosmética

5 Se prepara una emulsión Ac/Ag a partir de los ingredientes siguientes en las proporciones ponderales indicadas a continuación:

	Estearato de glicerilo	2,0%
10	Polisorbato 60	2,0%
	Ácido esteárico	1,5%
	Hidróxido de sodio	0,7%
	Carbómero	0,4%
15	Aceite de girasol	15,0%
	Propilenglicol	3,0%
	Conservantes	0,5%
	Lípido A*	0,1%
20	Agua	csp 100 %

*Obtenido como se describe en el Ejemplo 1.

25 Se puede preparar esta composición de forma clásica para el experto en la técnica. Su procedimiento de preparación incluye preferiblemente una etapa de disolución del lípido A en una solución acuosa de hidróxido de sodio.

30

35

40

45

50

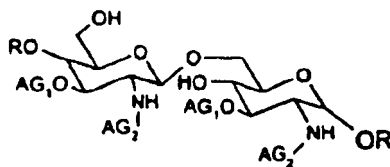
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Lípido A **caracterizado** por estar constituido por un compuesto seleccionado entre: (a) los compuestos de fórmula (I):



donde:

AG₁ representa un grupo 3-hidroxi-decanoilo,

AG₂ representa un grupo 3-dodecanoiloxi-decanoilo y

R representa un átomo de hidrógeno o un grupo PO(OR')₂, representando R' un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, C₁-C₆ o un grupo fenilo o bencilo, y

(b) en el caso en que R representa un grupo PO(OH)₂ en la fórmula (I) anterior, una sal inorgánica del compuesto de fórmula (I) o una sal de amina primaria, secundaria o terciaria del compuesto de fórmula (I) o una sal de fosfoetanolamina del compuesto de fórmula (I),

entendiéndose que, cuando están presentes varios grupos R, respectivamente R', son idénticos o diferentes los unos de los otros.

2. Lípido A según la reivindicación 1, **caracterizado** por seleccionar la sal de amina entre las sales de las sales de mono-, di- y trietanolamina, las sales de mono-, di- o triisopropanolamina, el 2-amino-2-metil-1-propanol, el 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol y el tris-(hidroximetil)aminometano.

3. Lípido A según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la sal inorgánica es una sal de sodio, magnesio, potasio, zinc o calcio.

4. Composición adaptada a una aplicación tópica sobre la piel, que contiene, en un medio cosméticamente aceptable, un lípido A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Composición según la reivindicación 4, **caracterizada** por contener de un 0,01 a un 0,1% en peso de lípido A según la reivindicación 1 con respecto al peso total de la composición.

6. Composición según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizada** por contener además al menos un filtro UV orgánico o inorgánico.

7. Utilización cosmética de un lípido A, tal como se ha definido en la reivindicación 1, o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y/o para proteger la piel contra los efectos perjudiciales de los UV.

8. Procedimiento de tratamiento cosmético de la piel, que consiste en la aplicación tópica sobre la piel de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizada** por estar destinada a prevenir o tratar los signos cutáneos del envejecimiento y/o a proteger la piel contra los efectos perjudiciales de los UV.

10. Utilización del lípido A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición dermatológica destinada a reforzar las defensas inmunitarias cutáneas.

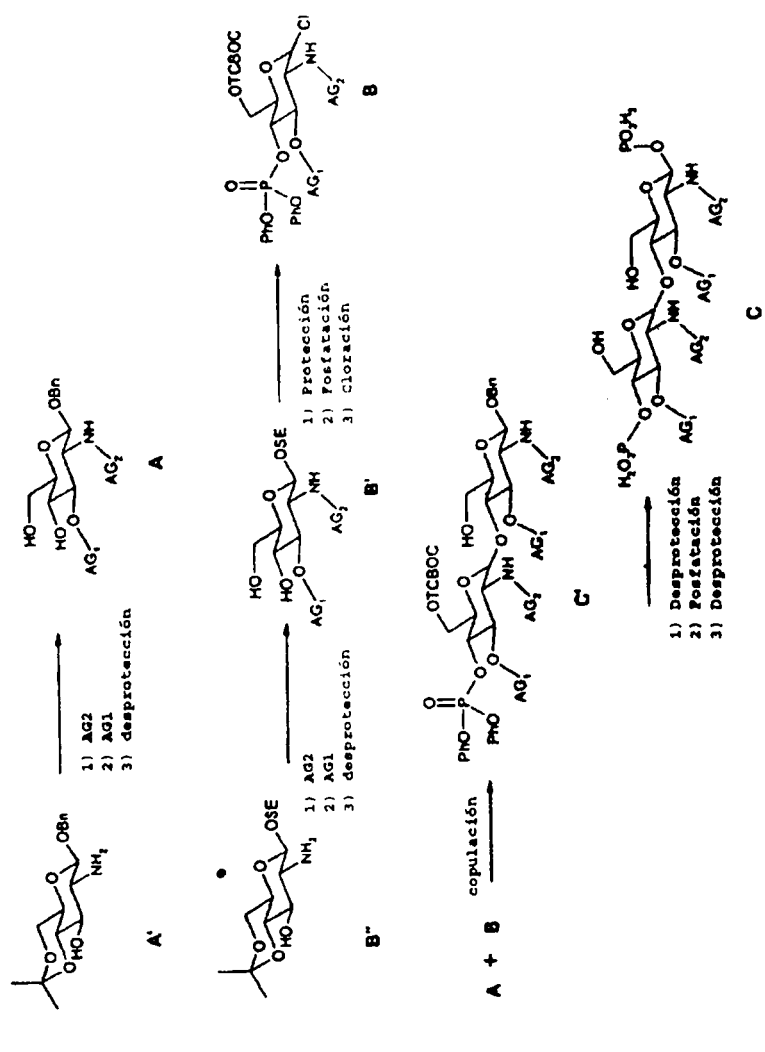


FIGURA ÚNICA