



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 500**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/49** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00906605 .1**

96 Fecha de presentación : **01.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1159952**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

54 Título: **N-acetilhidroxiprolina para mejorar el poder de retención de la humedad de la epidermis.**

30 Prioridad: **02.03.1999 JP 11-53767**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2009**

73 Titular/es: **KYOWA HAKKO KOGYO Co., Ltd.**  
**6-1, Ohtemachi 1-chome**  
**Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es: **Makimoto, Yutaka;**  
**Kobayashi, Asako;**  
**Sakakibara, Toshihiro;**  
**Takaboshi, Chiemi;**  
**Kamimura, Ayako;**  
**Takahashi, Tomoya;**  
**Tajima, Minako y**  
**Takekoshi, Yoichiro**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 319 500 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).

# ES 2 319 500 T3

## DESCRIPCIÓN

N-acetilhidroxiprolina para mejorar el poder de retención de la humedad de la epidermis.

### 5 **Campo industrial**

La presente invención se refiere a N-acetilhidroxiprolina o sales de la misma para su utilización en la mejora de la función de retención de la humedad de la epidermis y a un método cosmético para mejorar la función de retención de humedad de la epidermis que comprende la aplicación de N- acetilhidroxiprolina a la piel.

### 10 **Antecedentes de la invención**

15 Materiales preventivos del envejecimiento han sido utilizados desde hace mucho tiempo en cosmética con el propósito de conseguir efecto de belleza evitando el envejecimiento de la piel o el deterioro de la calidad de la piel que causa problemas en la piel tales como arrugas, bolsas, piel seca, etc.

20 Los materiales preventivos del envejecimiento empleados en cosmética se clasifican en sentido amplio en inhibidores de lípidos peróxido y activadores celulares. Entre los ejemplos de los materiales que tienen la actividad de inhibir lípidos peróxido están  $\alpha$ -hidroxiácidos, vitamina A,  $\beta$ -caroteno, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina E, pigmentos tales como plarutina y platonina, raíz de *scutellaria*, rutina, extracto de sésamo y extracto de té, etc. Por otra parte, ejemplos de activadores celulares son muminequis, ácido glicólico,  $\gamma$ -aminoácido, ácido siálico, jalea real, extracto de *Swertia japonica* (Schult), Makino, chirata japonesa, extracto de ginseng, etc.

25 Es conocido que los activadores celulares incluyen materiales que promueven síntesis de colágeno y materiales que tienen la actividad de mejorar la calidad de la piel.

Entre los ejemplos de materiales que promueven la síntesis de colágeno se incluyen varios factores de crecimiento tales como factor de crecimiento de transformación,  $\beta$ 1, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos básico, y factor de crecimiento tipo insulina 1, etc. y proteína de la seda, etc.

30 Ejemplos de materiales que tienen la actividad de mejorar la calidad de la piel incluyen alantoína, extracto de áloe, extracto de ginseng, extracto de placenta, sangre bovina librada de proteína, metabolitos de fermentación, etc.

35 Hay un informe sobre derivados de hidroxiprolina utilizados como componentes de cosméticos para mantener la elasticidad de la piel por incremento del consumo de oxígeno de hígado de ratón desorganizado (JP 1.131.107, A). El informe no contiene, sin embargo, ninguna descripción de la relación entre el incremento en el consumo de oxígeno del hígado de ratón desorganizado y el efecto sobre la piel humana ni datos concernientes a la eficacia de compuestos como componentes de cosméticos. Según esto, no es posible sacar la conclusión desde el informe de que los derivados de hidroxiprolina sean eficaces como componentes de cosméticos. No ha habido ningún informe que muestre que los derivados de hidroxiprolina sean eficaces como cosméticos.

40 Para el propósito de potenciar el efecto de la retención de humedad existen informes sobre cosméticos que comprenden mucina (JP 5-339140 A) o glicina betaína y ácido pirrolidonicarboxílico o su sal (JP 9-871262, A) en combinación con aminoácidos. En los informes, se menciona la hidroxiprolina como un ejemplo de aminoácido, pero no se da ningún dato concerniente al efecto de cosméticos que comprendan hidroxiprolina.

45 Se desconoce, por tanto, la función y el efecto de hidroxiprolina y sus derivados N-acílicos para la piel en el campo cosmético.

50 No es conocido que la hidroxiprolina y sus derivados N-acílicos muestren la actividad de promover la proliferación de células epidérmicas ni la actividad de promover la síntesis de colágeno en los fibroblastos. Tampoco se conoce hasta ahora ningún cosmético que utilice la citada actividad.

55 Además nunca se ha conocido un cosmético hecho de hidroxiprolina producido utilizando un microorganismo.

### **Descripción de la invención**

60 Un objeto de la presente invención es el de proporcionar agentes de mejora de la función de retención de la humedad de la epidermis y proporcionar composiciones cosméticas que tienen la actividad de mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar la utilización de N-acetil hidroxiprolina, o sales de la misma, para la producción de agentes que mejoran la función de retención de humedad de la epidermis.

65 Un objeto de la presente invención es proporcionar la utilización de N-acetil hidroxiprolina, sus sales, para la producción de composiciones cosméticas que tienen la actividad de mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis.

## ES 2 319 500 T3

Como resultado de investigaciones exhaustivas para lograr cosméticos de alta seguridad que tuvieran el efecto de mantener la humedad, los autores de la presente invención han encontrado que la N-acetil hidroxiprolina muestra tal efecto y, de este modo, se ha completado la presente invención.

5 Según esto, la presente invención se refiere a las características siguientes (1)-(8).

- (1) N-acetil hidroxiprolina o sales de la misma para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis
- 10 (2) La N-acetil hidroxiprolina según (1) se refiere a una composición donde la cantidad de la citada hidroxiprolina o derivados de hidroxiprolina N-acetilados es de 0,01 a 5% en peso basado en el peso total.
- (3) La N-acetil hidroxiprolina según el punto (1) o el (2), donde la citada hidroxiprolina se selecciona del grupo que consiste en cis-4-hidroxi-L-prolina, cis-4-hidroxi-D-prolina, cis-3-hidroxi-L-prolina, cis-3-hidroxi-D-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-3-hidroxi-D-prolina.
- 15 (4) Un método cosmético para mejorar la función de la retención de humedad de la epidermis, que comprende la aplicación de N-acetil-hidroxiprolina, como se define en (2) a (3) sobre la piel.
- 20 (5) El método según el punto (4), donde la citada piel es piel humana.
- (6) El uso de N-acetilhidroxiprolina o sales de la misma para la producción de un agente para mejorar la función de retención de humedad en la epidermis.
- 25 (7) La utilización según el punto (6) donde el citado agente contiene 0,01 a 5% en peso de N-acetil hidroxiprolina o sales de la misma basado en el peso total.
- (8) La utilización según cualquiera de los puntos (6) ó (7) donde la citada hidroxiprolina se selecciona del grupo que consiste en cis-4-hidroxi-L-prolina, cis-4-hidroxi-D-prolina, cis-3-hidroxi-L-prolina, cis-3-hidroxi-D-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina, trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-3-hidroxi-D-prolina.
- 30

35 La hidroxiprolina utilizada en la presente invención incluye cualquiera de las 8 clases de estereoisómeros en que puede aparecer la prolina: la forma D o la forma L, la localización del grupo hidroxilo puede ser la posición 3, o la posición 4, y el estereoisómero puede tomar la forma cis o la forma trans.

40 Los ejemplos de hidroxiprolina incluyen cis-4-hidroxi-L-prolina, cis-4-hidroxi-D-prolina, cis-3-hidroxi-L-prolina, cis-3-hidroxi-D-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina, trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-3-hidroxi-D-prolina.

45 La hidroxiprolina es un tipo de aminoácido muy extendido en la naturaleza como componente aminoácido principal de colágeno y también como uno de los aminoácidos que componen la elastina, y puede prepararse por hidrólisis ácida del colágeno derivado de animales tales como el cerdo, vaca, etc.. y purificándolo siguiendo un método convencional.

50 La trans-4-hidroxi-L-prolina se puede preparar utilizando prolina-4-hidroxilasa aislada del género *Amycolatopsis* o el género *Dactylosporangium* (JP 7-313179 A)- Además la cis-3-hidroxi-L-prolina se puede preparar empleando prolina 3-hidroxilasa (JP 7-322885 A) aislada del género *Streptomyces* (*Bioindustry*, 14, 31 (1997)).

En la presente invención, es preferible la hidroxiprolina producida utilizando microorganismos debido a que normalmente el producto es de alta calidad y fácilmente asequible.

55 La sal de la N-acetilhidroxiprolina incluye sales de metal alcalino tales como sal de sodio, de potasio, de litio, etc, sales de metal alcalino-térreo tales como sal de calcio, magnesio, etc. sal de amonio, sales de aminas tales como sal de monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, triiso-propanolamina, etc. y sales de aminoácidos básicos tales como arginina, lisina, etc.

60 La N-acetilhidroxiprolina se puede preparar siguiendo un método convencional. Por ejemplo, se puede preparar por reacción de un ácido graso de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene 1 a 24 átomos de carbono con agente halogenante tal como cloruro de tionilo y fosgeno para dar el haluro tal como cloruro y bromuro y condensando el haluro con la citada hidroxiprolina o se puede preparar por conversión del citado ácido graso en el anhídrido ácido y reacción del anhídrido de ácido con hidroxiprolina.

65 Como ácido graso se puede emplear el ácido acético.

Un método para producir un derivado de hidroxiprolina N-acetilada vía haluro de ácido es el dado a continuación.

## ES 2 319 500 T3

El ácido graso se dispersa en un disolvente tal como cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, xileno o n-hexano, y a lo anterior se añaden 1-5 equivalentes de agente halogenante para reacción, con lo que se obtiene un haluro de ácido graso. Entonces, se añade la hidroxiprolina directamente o dispersada en un disolvente y tiene lugar la reacción de acilación por adición a lo anterior de un haluro de ácido graso, en una cantidad de 0,3 a 3,0 equivalentes basada en hidroxiprolina, mientras se mantiene la temperatura de la mezcla resultante a 5 -70°C, y los derivados de hidroxiprolina N-acilada.

Como disolvente para la reacción de acilación se puede utilizar agua, metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, acetona, tolueno, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etc. pudiéndose utilizar solos o en combinación. En el momento de disolver o dispersar la hidroxiprolina en un disolvente, se pueden disolver los materiales alcalinos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etc. en un disolvente en una cantidad de 0,8 a 2,0 equivalentes basada en hidroxiprolina, si es necesario.

Cuando se desea obtener una sal de hidroxiprolina N-acilada y el derivado de hidroxiprolina N-acilada se obtendría en la forma de la sal deseada, la sal se puede purificar tal como está. Si el producto se obtiene en estado libre, y se quiere obtener la sal, se puede disolver o suspender en un disolvente apropiado, seguido de la adición de una base para formar la sal.

La purificación se puede llevar a cabo de una manera convencional tal como cristalización, cromatografía, o similares.

En los inhibidores del envejecimiento de la piel y/o agentes que mejoran la calidad de la piel así como composición cosmética para inhibir el envejecimiento de la piel y/o mejorar la calidad de la piel de la presente invención, se pueden utilizar, solas o en combinación, hidroxiprolinas tales como cis/trans-4-hidroxi-UD-prolina, cis/trans-3-hidroxi-UD-prolina, N-acetil hidroxiprolina o sales de las mismas.

El contenido de N-acetil hidroxiprolina o sus sales en los inhibidores del envejecimiento de la piel y/o agentes de mejora de la calidad de la piel y en la composición cosmética de la presente invención puede variar en un amplio intervalo dependiendo del efecto deseado. Por ejemplo, el contenido de estos compuestos en los inhibidores del envejecimiento de la piel y/o agentes que mejoran la calidad de la piel y en la citada composición cosmética es 0,01 a 5% en peso, preferiblemente 0,1 a 5% en peso, más preferiblemente 0,5 a 3% en peso. Además, la composición cosmética de la presente invención se utiliza para la piel de animales domésticos tales como ratón, perro, gato, caballo, etc. y piel humana, utilizándose preferiblemente para piel humana.

La composición (cosmética) según la presente invención, que contiene N-acetil hidroxiprolina o una sal de la misma puede contener ingredientes convencionales de los utilizados para los cosméticos ordinarios, si es necesario, además de los citados ingredientes esenciales.

Ejemplos de dichos ingredientes convencionales son aceite sólido, aceites semisólidos, otros hidratantes, emulgentes, polímeros hidrosolubles, polímeros óleosolubles, diversos compuestos tensioactivos, pigmentos inorgánicos u orgánicos tratados con silicona o compuestos de flúor, agentes colorantes tales como colorantes orgánicos, etc., etanol, absorbentes de rayos ultravioleta, antisépticos, antioxidantes, pigmentos, espesantes, reguladores del pH, perfumes, promotores de la circulación de la sangre, agentes de sensibilidad al frío, anti-transpirantes, fungicidas, suavizantes de la piel, agua, etc. Estos ingredientes se pueden añadir dentro del intervalo cualitativo o cuantitativo en el que no se perjudica el objeto y efecto de la presente invención.

Entre los ejemplos de aceite sólido o semisólido están la vaselina, lanolina, ceresina, cera microcristalina, cera de carnauba, cera de candelilla, ácidos grasos superiores tales como ácidos grasos de aceite de coco, ácido láurico, o ácidos grasos de sebo de buey endurecido, etc. y alcoholes superiores tales como alcohol laurílico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, o alcohol behenílico, etc.

Ejemplos del aceite líquido son aceite vegetal tal como aceite de aguacate, aceite de oliva, y aceite de yoyoba, ácido graso tal como ácido oleico y ácido isoesteárico, alcoholes tales como alcohol hexadecílico y alcohol oleico; aceite de éster tal 2-etilhexanoato cetílico, miristato de 2-octildodecilo, di-2-etilhexanoato de neopentilglicol, tri-2-etilhexanoato de glicerina, oleato de 2-etildodecilo, miristato de isopropilo, triisosteato de glicerina, 2-etilhexanoato de diglicérido y éster octildodecílico de ácido acilglutámico de cadena larga, aceite de silicona, tal como dimetilpolisiloxano, metilhidrogenopolisiloxano, metilfenilpolisiloxano, octametilciclotetrasiloxano, etc; aceite de hidrocarburo líquido tal como parafina líquida, escualeno, escualano, etc.

Ejemplos de hidratante son hidratante lipófilo, hidratante de bajo peso molecular e hidratante de alto peso molecular.

Ejemplos de hidratante lipófilo son lisolecitina, lecitina, colesterol, ésteres de colesterol, esfingolípidos, ceramidas, etc.

Ejemplos de hidratante de bajo peso molecular son serina, glutamina, sorbita, manita, glicerina, pirrolidonicarboxilato de sodio, 1,3-butilen glicol, propilen glicol, ácido láctico, sales de ácido láctico, y similares.

## ES 2 319 500 T3

Ejemplos de hidratante de alto peso molecular son ácido hialuránico, hialuronato de sodio, elastina, ácido algínico, mucopolisacáridos, polietilenglicol, sales de ácido poliaspártico, quitina hidrosoluble, etc.

Entre los ejemplos del emoliente están ésteres colesterílicos de ácido acilglutámico de cadena larga, hidroxies-tearato de colesterilo, ácido 12-hidroxiesteárico, ácido esteárico, ácido rodínico, éster colesterílico de ácido graso de lanolina, etc.

Ejemplos de agente tensioactivo son los agentes tensioactivos no-iónicos tales como éter polioxietilen (citado en adelante como "POE") cetílico, éster de ácido POE esteárico, monolaurato de POE sorbitano, éster glicerínico de ácido graso, éster de ácido graso y poliglicerina, aceite de ricino polioxietilénico endurecido; agentes tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio, cloruro de esteariltrimetilamonio, cloruro de dicetil-dimetilamonio y cloruro de beheniltrimetilamonio; agente tensioactivo anfátero tal como 2-cocoil-N-carboximetil-N-hidroxiethylimidazolínio betaína y amido-acetato de betaína, y agente tensioactivo aniónico tal como sulfatos de alcoholes superiores, sulfatos de éter alcoholes superiores, sales de metal alcalino de ácido graso de cadena larga, sales de metal alcalino-térreo de ácido graso de cadena larga, sales de aminoácido básico de ácido graso de cadena larga, N-acilaminoácidos de cadena larga y sales de N-acilaminoácidos de cadena larga.

Ejemplos del polímero hidrosoluble son los polímeros hidrosolubles utilizados frecuentemente en cosmética tales como carboximerilcelulosa, metil celulosa, hidroximetilcelulosa, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, carragenano, dextrina, éster de ácido graso y dextrina, polímero de carboxivinilo, goma de xantano, gelatina, alginato de sodio y goma arábica.

Entre los ejemplos de polímeros óleo-solubles utilizados frecuentemente en cosméticos están los copolímeros de polivinilpirrolidona eicoseno, copolímeros de polivinilpirrolidona hexadeceno, nitrocelulosa y siliconas de alto peso molecular.

Entre los ejemplos de pigmento orgánico o inorgánico están polvos inorgánicos tales como ácido silícico, ácido silícico anhidro, silicato de magnesio, talco, sericita, mica, caolín, óxido de hierro rojo, arcilla, bentonita, mica recubierta de titanio, oxiclорuro de bismuto, óxido de zirconio, óxido de magnesio, óxido de zinc, óxido de titanio, óxido de aluminio, sulfato de calcio, sulfato de bario, sulfato de magnesio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, óxido de hierro, azul ultramarino, óxido de cromo, hidróxido de cromo, calamina y negro de carbono, y complejos de ellos, etc.; polvo orgánico tal como poliamida, poliéster, polipropileno, poliestireno, poliuretano, resinas vinílicas, resinas de urea, resinas fenólicas, resinas fluoradas, resinas de silicona, resinas acrílicas, resinas de melamina, resinas epoxídicas, resinas de policarbonato, copolímeros de divinilbenceno-estireno, polvo de seda, celulosa, pigmento amarillo de CI, y pigmento naranja de CI, y complejo de I polvo inorgánico y polvo orgánico mencionados antes.

Ejemplos de polvo orgánico son los jabones metálicos tales como estearato de calcio; sales de metal polivalente de ácido alquilfosfórico tales como cetilfosfato de sodio zinc, laurilfosfato de zinc y laurilfosfato de calcio, sales de metal polivalente de acilamino ácido tales como N-lauroil- $\beta$ -alanina calcio, N-lauroil- $\beta$ -alanina zinc y N-lauroilglicina calcio; sales de metal polivalente de ácido amidosulfónico tales como lauroiltaurina calcio y N-palmitoil taurina calcio; ácido N-acilamino básico tal como N<sup>ε</sup>-lauroil-L-lisina, N<sup>ε</sup>-palmitoil lisina, N<sup>α</sup>-palmitoilomitina, N<sup>α</sup>-lauroilarginina, y ácido graso de buey N<sup>α</sup>-acilarginina endurecido; N-acilpolipéptidos tales como N-lauroilglicil-glicina;  $\alpha$ -aminoácidos grasos tales como ácido  $\alpha$ -aminocaprílico y ácido  $\alpha$ -aminoláurico y polvos de resina tales como polietileno, polipropileno, nylon, poli metacrilato de metilo, poliestireno, copolímeros de divinilbenceno-estireno y tetrafluoruro de etileno.

Entre los ejemplos de absorbente de rayos ultravioleta están el ácido p-aminobenzoico y derivados de ácido p-aminobenzoico tales como p-dimetilaminobenzoato de octilo; derivados de benzofenona, tales como 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona y dihidroxidimetoxibenzofenona, derivados de ácido metoxicinámico tales como p-metoxicinamato de etilo y p-metoxicinamato de octilo; derivados de ácido salicílico tales como salicilato de octilo y salicilato de homomentilo; derivados de  $\alpha$ -dehidroamino ácido tales como éster de 2-etilhexilo de N-benzoil-O-metil- $\alpha$ -dehidrotirosina; derivados de benzal-hidantoina tales como metilen-2,5-dioxo-1-imidazolidinpropionato de 2-etilhexil-4-(3,4-dimetoxifenilo), ácido urocánico, urocánico de etilo, 4-terc-butyl-4-metoxidibenzoilmetano, 2-(2'-hidroxi-5'-metilfenil)-benzotriazol, etc.

Ejemplos de antisépticos son metilparabeno, etc.

Ejemplos de suavizante de la piel son parafina líquida, vaselina, aceite de oliva, escualeno, lanolina, aceite de éster sintético, etc.

Cualquiera de los ingredientes mencionados antes se pueden utilizar dentro de un intervalo en que no se perjudique el objeto y efecto de la presente invención y este contenido es, preferiblemente, 0,01 a 5% en peso, y más preferiblemente 0,01 a 3% en peso. Las composiciones cosméticas para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis en la presente invención pueden tomar la forma de solución, emulsión, mezcla en pasta o similares.

Como composiciones cosméticas de la presente invención se pueden mencionar crema de limpieza facial, espuma de limpieza facial, crema limpiadora, leche limpiadora, loción limpiadora, crema de masaje, cold-cream, crema hidratante, emulsión, loción cosmética, compresa, crema para después del afeitado, crema filtro solar, aceite para

bronceado, champú corporal, champú para el cabello, enjuagado del cabello, tratamiento del cabello, tónico para el cabello, restauración del cabello, pomada en barra, crema capilar, líquido para el cabello, loción fijadora, pulverizador para el cabello, tinte para el cabello, decoloración del cabello, enjuagado con color, pulverizador de color, líquido de ondulación permanente, polvo de alisado, polvo de ahuecado, sombra de ojos, o crema para las manos, etc.

5 Las composiciones (cosméticas) según la presente invención pueden tomar parte de una formulación tal como emulsión, crema, loción facial, compresa, crema base y cosmético para el cabello, sin limitación específica.

10 El método de uso de las composiciones según la presente invención varía dependiendo de la edad, del individuo y de la parte del cuerpo en que se utiliza. Una concentración apropiada de N-acetil hidroxiprolina o sales de la misma en la composición cosmética en la piel, una o varias veces al día, es preferiblemente 0,01 a 5% en peso, preferiblemente 0,1 a 5% en peso, más preferiblemente 0,5 a 3% en peso y se recomienda aplicar la composición cosmética una o varias veces al día en una cantidad de 0,1-5  $\mu$ l preferiblemente 1-5  $\mu$  y, más preferiblemente, 2  $\mu$ , pero la aplicación no queda limitada a lo recomendado,

15 En los siguientes ejemplos se ilustran determinados modos de realización, que no deberán considerarse como limitativos de la presente invención.

## 20 El mejor modo de llevar a cabo la presente invención

### Ejemplo comparativo 1

#### *Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina*

25 Se añadió, a agua purificada, un 0,5% en peso de trans-4-hidroxi-L-prolina (que en adelante se citará como “Hyp”, fabricada por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd); 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% en peso de glicerina, y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía Hyp (trans-4-hidroxi-L-prolina (Composición 1).

30

### Ejemplo comparativo 2

#### *Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina*

35 Se añadió, a agua purificada, 3% en peso de Hyp, 0,1% de metilparabeno y 0,17% de glicerina y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía Hyp (Composición 2).

### 40 Ejemplo 3

#### *Preparación de una composición cosmética que contiene N-acetil-trans-4-hidroxi-L-prolina*

45 Se añadió, a agua purificada, 3% en peso de N-acetil-trans-4-hidroxi-L-prolina (en adelante citada como “N-acetil-Hyp” fabricada por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% de glicerina y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía N-acetil-Hyp (Composición 3).

### Ejemplo comparativo 4

50

#### *Preparación de una composición cosmética que contiene colágeno*

55 Se añadió, a agua purificada, un 1% en peso de colágeno (Colágeno CLR, fabricado por Kotobuki Chemical), 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% en peso de glicerina y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía colágeno (Composición 4).

### Ejemplo comparativo 5

#### *Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina y lecitina*

65 Se añadió, a agua purificada, un 0,5% de Hyp, 0,05% de lecitina (SLP-White H, fabricado por True Lecithin Kogyo), 0,01% en peso de ácido hialurónico (Hyaluronic Acid LP, fabricado por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,1% en peso de metiparabeno y 0,17% en peso de glicerina, y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía Hyp y lecitina (Composición 5).

## ES 2 319 500 T3

### Ejemplo comparativo 6

*Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina y lisolecitina-n*

5 Se añadió, a agua purificada, un 3% en peso de Hyp, 0,05% en peso de lisolecitina (Lisolecitina Kiowa, fabricada por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,01% en peso de ácido hialurónico (Hyaluronic Acid LP, fabricado por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% en peso de glicerina, y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contiene Hyp y lisolecitina (Compuesto 6).

### 10 Ejemplo comparativo 7

*Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina y lecitina*

15 Se añadió, a agua purificada, un 3% en peso de Hyp, 0,05% en peso de lecitina (PC92H, fabricado por True Lecithin Kogyo), 0,01% en peso de ácido hialurónico (Hyaluronic Acid LP, fabricado por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% en peso de glicerina y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía Hyp y lecitina (Composición 7).

### Ejemplo comparativo 8

20

*Preparación de una composición cosmética que contiene trans-4-hidroxi-L-prolina y lecitina*

25 Se añadió, a agua purificada, un 3% en peso de Hyp, 0,05% en peso de lecitina (SLP-White H fabricado por True Lecithin Kogyo), 0,01% en peso de ácido hialurónico (Hyaluronic Acid LP fabricado por Kiowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), 0,1% en peso de metilparabeno y 0,17% en peso de glicerina y la mezcla resultante se fundió para dar una composición cosmética que contenía Hyp y lecitina (Composición 8).

En la Tabla 1 se muestra colectivamente la composición de las composiciones de los Ejemplos 1-8.

30

TABLA 1

*Composición de las Composiciones Cosméticas*

35

Ingrediente (% en peso)	Composición cosmética							
	(1)*	(2)*	(3)	(4)*	(5)*	(6)*	(7)	^(8)*
Hyp	0,5	3	-	-	0,5	3	3	3
N-acetil-Hyp	-	-	3	-	-	-	-	-
Colágeno	-	-	-	1	-	-	-	-
Lecitina SLP	-	-	-	-	0,05	-	-	0,05
Lecitina PC92	-	-	-	-	-	-	0,05	.
Lisolecitina	-	-	-	-	-	0,05	-	-
Acido hialurónico	-	-	-	-	0,01	0,01	0,01	0,01
metilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicerina	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Hyp	trans-4-hidroxi-L-prolina							
N-acetil-Hyp	N-acetil-trans-4-hidroxi-L-prolina							
Lecitina SLP	Leciitina (SLP-White H, fabricado por True Lecithin Kogyo Co.Ltd)							
Lecitina PC92	Lecithin PC92H, fabricado por True Lecithin Kogyo Co. Ltd.							
* Ejemplos comparativos								

65

## ES 2 319 500 T3

### Ejemplo 9

#### *Actividad de la promoción de síntesis de colágeno en fibroblasto humano*

5 El ensayo de colágeno sintético se llevó a cabo por el método siguiente según "Experimental Method of Collagen" (Establecido por Nagai y col. Kodansha Scientific).

10 Se cultivó fibroblasto derivado de neonato humano (Sanko Junyaku Co. Ltd.) en medio DMEM [*Virology* 6, 396 (1959) que contenía 10% de suero bovino fetal en las condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en fase estacionaria. Se le añadió glicina marcada con <sup>3</sup>H y el compuesto de ensayo, y se volvió a cultivar durante 72 horas. Se preparó medio DMEM mezclando Medio Eagle Modificado de Dulbecco "Nissui" (2) (fabricado por Nissui Pharmaceutica) con 4 mmoles/litro de glutamina, una dosis óptima de hidrogenocarbonato de sodio, 10 mmoles/litro de HEPES 50 U/ml de penicilina G potasio, 50 µg/ml de estreptomycinina y 10% de suero bovino fetal.

15 Al caldo de cultivo resultante se añadieron 500 µmoles/litro de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) y se recogieron las células y el medio, se trituraron con un aparato de sonicación y se extrajo la proteína.

20 Al extracto se añadieron 100 micromoles/litro de albúmina de suero bovino (BSA) y 10% de ácido tricloroacético (TCA) y la mezcla resultante se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para recuperar el precipitado.

Al precipitado se añadieron 0,2 moles/litro de hidróxido de sodio a una densidad de 8 µl por 1 cm<sup>2</sup> de área del fondo del recipiente de cultivo utilizado para cultivarlo y la mezcla resultante se neutralizó con una cantidad equivalente de 1 mol/litro de tampón fosfato.

25 A 100 µl de la solución de proteína resultante se añadieron 25 mmoles/litro, cloruro de calcio (10 µmoles/litro), 62,5 mmoles/litro de N-etilmaleimida (20 µmoles/litro) y 20 unidades de colagenasa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., para analizar el colágeno) y la mezcla resultante se dejó reaccionar a 37°C durante 90 minutos.

30 La mezcla de reacción se filtró con un ultrafiltro (peso molecular 10.000) y la fracción proteínica del filtrado se ensayó en cuanto a actividad de radiación (CDP), y se designó como colágeno recién preparado. Se ensayó la actividad de radiación (NCDP) de la fracción de proteína sin filtrar, y se calculó la relación de síntesis de colágeno aplicando la siguiente fórmula 1.

35 La actividad relativa de promoción de síntesis de colágeno (cambio en la síntesis de colágeno) se calculó según la siguiente fórmula 2, comparando con el valor relativo de la relación de síntesis de colágeno de los compuestos de ensayo frente al control:

40 (Fórmula 1)

$$\text{Relación de síntesis de colágeno} = \frac{\text{CDP}}{\text{CDP} + \text{NCDP}}$$

45 (Fórmula 2)

50 Actividad relativa de promoción de síntesis de colágeno (%) =

$$= \frac{\text{Relación de síntesis de colágeno del compuesto de ensayo}}{\text{Relación de síntesis de colágeno de control}} \times 100$$

60

65

## ES 2 319 500 T3

El resultado se muestra en la Tabla 2.

Se observó actividad de promoción de síntesis de colágeno en Hyp y N-acetil-Hyp.

5

TABLA 2

*Actividad de promoción de síntesis de colágeno*

10

Compuesto de ensayo	0 mM	0,1 mM	1mM
Hyp	100	108,3	117,1
N-Acetil-Hyp	100	121,1	119,7

15

Ejemplo 10

*Actividad de proliferación de células epidérmicas humanas*

20

La actividad de proliferación de células epidérmicas humanas se ensayó según el método MTT [*Cell Culture III*, 4477-4482 (1984)] por incorporación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a células y midiendo el MTT formazano resultante por colorimetría a una longitud de onda de 570 nm (Referencia, 650 nanómetros).

25

Es decir, las células epidérmicas queratinizadas derivadas de neonato humano (Sanko Junyako Co. Ltd) se cultivaron en medio KGM (Sanko Junyako Co. Ltd.) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C en fase estacionaria, se mezclaron con Hyp y N-acetil-Hyp y se cultivaron durante 4 días. Se mezcló entonces el caldo de cultivo con 1/10 volumen de reactivo MTT a 5 mg/ml en un tampón fosfato (pH 7,4 libre de calcio y magnesio) y se cultivó en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Después de separar el medio, se extrajo el formazano MTT de la célula con isopropanol que contenía 0,4 moles/litro de ácido clorhídrico y se midió la absorbancia a 570 nm comparándola con la de 630 nm.

30

El resultado se muestra en la Tabla 3.

35

Se observó actividad de proliferación de células epidérmicas en Hyp y N-acetil-Hyp. Se encontró actividad de proliferación en Hyp dependiendo de la concentración.

40

TABLA 3

*Actividad de proliferación de células epidérmicas*

45

Compuesto de ensayo	0 mM	10 mM	100 mM
Hyp	100	111,6	135,1
N-Acetil-Hyp	100	108,7	85,9

50

Ejemplo 11

*Actividad de proliferación de células epidérmicas de ratón*

55

Se desprendió la epidermis de un ratón C3H de tres días de edad siguiendo el método de Tanigaki y col. (*The Japanese Journal of Dermatology*, 1145-1152 (1989)).

60

La epidermis se trató con tripsina al 0,25% y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para obtener las células. Las células se inocularon a medio DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal y se cultivaron a 37°C durante 1 día para obtener las células epidérmicas de ratón.

65

Se cultivaron las células epidérmicas de ratón en medio MCDB 153 libre de suero que contenía el compuesto de ensayo (Hyp o N-acetil-Hyp) durante 6 días, se mezclaron con 1/10 volumen de reactivo MU de 5 mg/ml en tampón fosfato (pH 7,4, libre de calcio y magnesio) y se cultivó entonces en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Después de separar el medio, se extrajo el MTT formazano de la célula con isopropanol que contenía 0,4 moles/litro de ácido clorhídrico, y se midió la absorbancia a 570 nm comparándola con la de 630 nm. El resultado se muestra en la Tabla 4.

## ES 2 319 500 T3

Se encontró actividad de proliferación epidérmica en Hyp y en N- acetil-Hyp.

TABLA 4

*Actividad de proliferación de células epidérmicas*

Compuesto de ensayo	0 µM	1 µM	3 µM	10 µM
Hyp	100	88,6	107,5	126
N-Acetil-Hyp	100	110,7	118,2	121,9

### Ejemplo 12

#### *Evaluación de la función de retención de humedad (1)*

Se examinó el cambio de la función de retención de la humedad por el uso continuo, por evaluación del efecto de mejora cualitativa de la piel de las Composiciones (1)–(8) preparadas en los Ejemplos 1-8.

#### *Método de ensayo*

Las composiciones se aplican a la parte de ensayo/fosa cubital de 4 personas femeninas sanas que forman parte del un panel, de 23-28 años de edad, en una cantidad de 2 µl/cm<sup>2</sup> dos veces al día por la mañana y por la tarde durante 3 semanas o 2 meses.

#### *Método de evaluación*

Se midió el contenido de humedad de la parte de ensayo antes de la aplicación de la composición cosmética, por la mañana, con el transcurso del tiempo. Se puso en contacto la sonda de forma vertical sobre la parte de ensayo y se ensayó la conductividad de la piel (=contenido de humedad) con SKICON 200 (fabricado por IBS) como máquina de medida.

Cuando el valor de la medida es alto, significa que el contenido de humedad es alto. Se calculó el cambio de la conductividad de la piel (conductividad relativa) sobre la parte de ensayo aplicando la siguiente fórmula 3 ,como valor relativo al cambio de conductividad sobre la parte no tratada.

#### (Fórmula 3)

$$\text{Conductividad relativa (\%)} = \frac{\text{Conductividad diaria de la parte de ensayo}}{\text{Conductividad de la parte de ensayo el día 0}} + \frac{\text{Conductividad de la parte no tratada}}{\text{Conductividad de la parte de ensayo el día 0}} \times 100$$

Los resultados se muestran en las Tablas 5-1 y 5-2

Se potenció el contenido de humedad de la piel por aplicación continua de cada una de las composiciones de ensayo y, con ello, se observó una mejora de la función de retención de la humedad en Hyp y N-acetil-Hyp. Además, en el N-acetil-Hyp se observó un efecto de mejora que sobrepasaba al de colágeno.

## ES 2 319 500 T3

TABLA 5-1

*Mejora de la función de retención de humedad*

Composición de ensayo	Conductividad relativa (%)				
	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56
Agua purificada	100	96,9	94,5	88,7	93,8
Composición (1)*	100	125,2	119,8	111,1	109,6
Composición (2)*	100	127,5	118,2	108,6	110,3
Composición (3)	100	238,2	226,9	233,5	186,3
Composición (4)*	100	133,3	134,5	130,8	121,5
Composición (5)*	100	157,8	124,6	132,4	127
* Ejemplos comparativos					

TABLA 5-2

*Mejora de la función de retención de humedad*

Composición de ensayo	Conductividad relativa (%)				
	Día 0	Día 5	Día 9	Día 16	Día 21
Agua purificada	100	96,9	94,5	88,7	93,8
Composición (4)*	100	104,3	129,9	115,3	136,8
Composición (6)*	100	120,9	144,3	140,6	172
Composición (7)*	100	108,3	150,2	123,3	145,2
Composición (8)*	100	117	145,7	185,9	146,1
* Ejemplos comparativos					

Ejemplo 13

*Evaluación de la función de retención de humedad (2)*

Dependencia de la concentración del efecto de la retención de humedad de N-acetil. Hyp en una sola aplicación.

*Método de ensayo*

Se ensayó la retención de humedad sobre la parte de ensayo/fosa cubital de 12 sujetos femeninos de un panel, sanas, de 23-32 años de edad, y se les aplicó cada una de las composiciones de ensayo en una cantidad de  $2 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  y se dejó eliminar,

Tres horas más tarde, se midió el contenido de humedad de la parte de ensayo, y se evaluó el efecto de retención de la humedad como conductividad relativa, habiendo definido el contenido de humedad antes de la aplicación como 100%.

## ES 2 319 500 T3

El resultado se muestra en la Tabla 6. El N-acetil-Hyp presentaba un efecto de retención de la humedad dependiente de la concentración incluso con una sola aplicación.

TABLA 6

*Función de retención de la humedad de N-acetil-Hyp*

	Agua purificada	N-acetil-Hyp			
		1%	3%	5%	10%
Conductividad relativa	91	100	129	186	189

### Ejemplo 14

*Efecto que mejora la calidad de la piel*

Se preparó una réplica de silicona sobre la parte de ensayo de las panelistas utilizando "Skin Cast" (nombre comercial fabricado por Yamada Shogyo) durante el ensayo del Ejemplo 12 y se puntuó el estado de la piel en cuanto a evaluación de la mejora de la cualidad de la piel según los siguientes criterios.

*Puntuación del estado de la piel*

Calificación 1: Las arrugas de la piel no son claras, pero se observa queratina desprendida

Calificación 2. Las arrugas de la piel poco claras o de tendencia direccional

Calificación 3. Se ven las arrugas de la piel, pero menos profundas o tendencia direccional

Calificación 4. Se ven arrugas en la piel o ligeramente encajadas

Calificación 5. Se ven claramente arrugas en la piel o claramente encajadas

El resultado se muestra en la Tabla 7. Las puntuaciones de las Composiciones (1)–(5) incrementan en 0,4-2,1 la mejora en comparación con el agua purificada, que probaba claramente la calidad de la piel. Es decir, se observa que la piel se hace suave y la formación de arrugas se inhibe o mejora su efecto. La Composición (5) que contiene lecitina mostraba puntuaciones más altas y daba un resultado de mejor sensación al utilizarla que la Composición (1) que está libre de lecitina.

TABLA 7

*Puntuaciones*

Composición de ensayo	Puntuaciones
Agua purificada	2,3
Composición (1)*	3,7
Composición (2)*	2,8
Composición (3)	4,4
Composición (4)*	3,8
Composición (5)*	3,6
* Ejemplos comparativos	

## ES 2 319 500 T3

Según esto, las composiciones y las composiciones cosméticas de la presente invención tienen la actividad de promover la proliferación de células epidérmicas, la actividad de promover la síntesis de colágeno de fibroblastos, la actividad de mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis, actividad de inhibir y/o mejorar la formación de arrugas, y han demostrado ser eficaces para inhibir el envejecimiento de la piel y/o mejorar la calidad de la piel.

### **Aplicabilidad industrial**

Por esta invención se pueden proporcionar composiciones que son eficaces para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis. La presente invención puede proporcionar composiciones cosméticas para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis. Por la presente invención se puede proporcionar un método cosmético para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis, que comprende aplicar a la piel N-acetil-hidroxiprolina o sales de la misma como ingrediente eficaz. La utilización de N-acetil-hidroxiprolina para producir un agente para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis puede ser proporcionada por la presente invención.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. N-acetilhidroxiprolina o sales de la misma para mejorar la función de retención de humedad de la epidermis.

5 2. La N-acetilhidroxiprolina según la reivindicación 1 en la forma de una composición, donde la cantidad de la citada N-acetilhidroxiprolina es 0,01 a 5% en peso basado en el peso total.

10 3. La N-acetilhidroxiprolina según la reivindicación 1 o la 2, donde la citada hidroxiprolina se selecciona del grupo que consiste en cis-4-hidroxi-L-prolina, cis-4-hidroxi-D-prolina, cis-3-hidroxi-L-prolina, cis-3-hidroxi-D-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina, trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-3-hidroxi-D-prolina.

4. Un método cosmético para mejorar la función de retención de la humedad de la epidermis, que comprende la aplicación de N-acetilhidroxiprolina como se define en las reivindicaciones 2 a 3 sobre la piel.

15 5. El método según la reivindicación 4 donde la citada piel es piel humana.

6. Utilización de N-acetilhidroxiprolina o sales de la misma para producir un agente para mejorar la función de retención de la epidermis.

20 7. La utilización según la reivindicación 6 donde el citado agente contiene 0,01 a 5% en peso de N-acetilhidroxiprolina o sales de la misma basado en el peso total.

25 8. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 donde la citada hidroxiprolina se selecciona del grupo que consiste en cis-4-hidroxi-L-prolina, cis-4-hidroxi-D-prolina, cis-3-hidroxi-L-prolina, cis-3-hidroxi-D-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina, trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-3-hidroxi-D-prolina.

30

35

40

45

50

55

60

65