



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 165**

21 Número de solicitud: 200601448

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **12.05.2003**

30 Prioridad: **19.11.2002 FR 02 14491**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2009**

Fecha de la concesión: **26.01.2012**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
07.04.2011

45 Fecha de anuncio de la concesión: **07.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

62 Número de la solicitud inicial: **P 200301096**

73 Titular/es: **ENGELHARD LYON**
32, rue St. Jean de Dieu
69007 Lyon, FR

72 Inventor/es: **André, Valérie;**
Grenier, Stéphane;
Reyermier, Corinne y
Perrier, Eric

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

54 Título: **Uso de un compuesto derivado de hesperitina o quercetina para limitar o prevenir modificaciones en parámetros biológicos debidas a la radiación solar.**

57 Resumen:

Uso de un compuesto derivado de hesperitina o quercetina para limitar o prevenir modificaciones en parámetros biológicos debidas a la radiación solar.

La presente invención se refiere al uso de laurato de hesperitina o caprilato de quercetina para fabricar una composición cosmética o farmacéutica de aplicación tópica capaz de prevenir o limitar la modificación de parámetros biológicos modificados por la exposición a la irradiación solar.

ES 2 331 165 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto derivado de hesperitina o quercetina para limitar o prevenir modificaciones en parámetros biológicos debidas a la radiación solar.

5

La presente invención trata esencialmente del uso de principios activos como son el laurato de hesperitina o de caprilato de quercetina para fabricar una composición cosmética o farmacológica para limitar y/o prevenir la modificación de al menos un parámetro biológico modificado en células vivas sujetas o no a estrés.

10 **Estado de la técnica**

La radiación solar está compuesta por radiaciones electromagnéticas incluyendo un 56% de radiación infrarroja (longitud de onda de 5.000 a 800 nm) que genera calor, un 39% de luz visible (entre 800 y 400 nm) y un 5% de ultravioletas A, B, C (entre 400 y 190 nm), incluyendo cerca de un 4,9% de UVA y 0,1% de UVB + UVC.

15

- Los UVC, que son muy dañinos, en general, son filtrados por la capa de ozono.

- Los UVB son parcialmente retenidos cuando atraviesan la atmósfera y el vidrio. Llegan a la epidermis, pero son retenidos antes de la dermis. Son los responsables de la formación de una quemadura solar caracterizada por la presencia de células quemadas por el sol, que son queratinocitos, que han iniciado un proceso de apoptosis debido a las lesiones del ADN de sus núcleos. Su número será tan alto como alta sea la dosis de UVB recibida. De hecho, un proceso natural de defensa permite la reparación o eliminación de las células dañadas, sin embargo, el fallo de este sistema por saturación o defecto genético juega un papel fundamental en la aparición de cánceres de piel.

20

- Los UVA atraviesan la atmósfera fácilmente, tanto en verano como en invierno, penetran la dermis y la epidermis y, aunque son menos dañinos que los UVB, sin embargo, son responsables de daños debido a las cantidades recibidas. Los UVA no producen, o producen muy pocas, células quemadas por el sol y pueden dañar el ADN celular, así como lípidos y proteínas celulares a través de la formación de radicales libres. Los UVA son responsables de un envejecimiento acelerado de la piel con un aumento de la degradación del colágeno y de las fibras elásticas, así como de otros constituyentes de la secuencia extracelular de la dermis. Además, muchos trabajos han demostrado los efectos inmunosupresores de los UVA a través de las células epidérmicas de Langerhans que, tras la irradiación, interaccionan con los linfocitos T y tienen un efecto sistémico a través de las citoquinas y de los neuromediadores producidos en cascada por las células epiteliales y por las fibras nerviosas (Meunier L., Eur. J. Dermatol. 1999, 9: 269-271). A largo plazo, el riesgo de cáncer de piel aumenta, las células precancerosas dejan de ser reconocidas como células extrañas y, por tanto, dejan de ser eliminadas por el sistema inmune.

25

30

35

Un estudio europeo de Helios (Zanetti R. y col., Br. J. Canc. 1996, 73: 1440-1454) muestra la relación entre la exposición a los rayos UV, el fenotipo de la piel y los carcinomas, y define la noción de riesgo directo unido a los rayos UV.

40

Entre otros daños conocidos y que están relacionados con las radiaciones, pueden citarse aquellos debidos a un incremento en la temperatura por los rayos infrarrojos, que inducen en los melanocitos la producción de proteínas de choque térmico, así como efectos similares a los efectos inducidos por UVB (Nakazawa y col., J. Invest. Dermatol. 1998; 110: 972-977); aquellos debidos a las radiaciones del infrarrojo cercano que afecta a la viabilidad de las células de la piel (Yoo B.H. y col., J. Cosmet. Sci. 2002; 53(3): 175-184); aquellos debidos a la exposición a la luz visible (repetidas dosis) que induce una mutagenicidad (Larko O., Lakartidningen 2002, 99(18): 2036-2040); aquellos debidos a las radiaciones ionizantes que generan ulceraciones y cánceres (Lorette G., Machet L., Cancer Radiother. 2001, 5(1): 116s-120s) o modificaciones del metabolismo celular como la síntesis de colágeno de tipo I y III en la piel (Riekkii R., y col., Arch. Dermatol. Res. 2002, 294(4): 178-184) o incluso modificaciones de la proliferación y de la diferenciación epidérmica (Siran V. y col., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 2002, 53(2): 385-393); también aquellos debidos a los efectos citogénicos de las microondas (Zotti-Martelli L., y col., Mutat. Res. 2000, 472(1-2): 51-58) o a los efectos oncogénicos de la inhibición de la ruta de las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP27) o por generación de radicales libres debido a campos electromagnéticos y, sobre todo, a aquellos generados por los teléfonos móviles (French P.W. y col., Differentiation 2001 67(4-5): 93-97; Di Carlo y col., J. Cell Biochem. 2002; 84(3): 447-454; Lesczynski D., y col., Differentiation 2002; 70(2-3): 102-129; Moustafa Y.M., y col., J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 26(4): 605-608).

45

50

55

Existen también otros factores tales como ciertos agentes químicos (peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, metales pesados...) o agentes biológicos (virus, bacterias...) incluso factores mecánicos (estiramiento, comprensión) que pueden inducir un estrés celular.

60

Hasta ahora, todas las funciones celulares, incluyendo proliferación, diferenciación y muerte celular, que están controladas por numerosos genes y las rutas de señalización celular, se analizan *ex vivo* (biopsia) o *in vitro* en cultivos celulares en monocapa, generalmente de fibroblastos, queratinocitos o melanocitos obtenidos a partir de donantes sanos o patológicos, o a partir de líneas celulares. Además, no siempre es posible encontrar datos sobre la expresión y la síntesis celular en función de un estrés en particular, o los resultados obtenidos *in vitro* algunas veces resultan contradictorios con aquello que se pueden observar *in vivo* debido a la simplificación de los modelos usados en la experimentación.

65

ES 2 331 165 B2

Durante varios años se han desarrollado algunos modelos celulares tridimensionales para terapia celular, para ensayos citotóxicos y pruebas de eficacia, alternativos a la experimentación con animales. Podemos citar modelos de epidermis (documento EP 0 789 074 A1 de Oreal; A. De Brugerolle de Fraissinette y col., 1999, Cell Biol. Tox. 15: 121-135) usada para la predicción de la irritación aguda o crónica de la piel, y también modelos de epitelios reconstruidos (Schmalz G. y col, Eur. J. Oral. Sci. 2000, 108: 442-448; Nielsen y col., Int. J. Pharm. 2000, 200: 261-270) así como de pieles reconstruidas, pieles reconstruidas pigmentadas y/o pieles reconstruidas inmunocompetentes por ejemplo (Regnier M. y col., en Pour la science (1999) 266: 154-159).

Si hoy en día alguno de estos modelos se usan ampliamente en las evaluaciones fármaco-toxicológicas y en los estudios de eficacia de ingredientes farmacéuticos y cosméticos, los procedimientos de análisis usados son esencialmente técnicas histológicas combinadas con el análisis de imagen, el análisis de síntesis metabólica y de su regulación por análisis electroforético, análisis por Western-blot, Northern-blot y RT-PCR. Las técnicas de secuencia de proteínas (o MAPPING) y de secuencias de ADN, de electroforesis bidimensional o de determinaciones combinadas de citoquinas (MAP-citoquina), en particular, no se han aplicado a estos modelos tridimensionales que se cultivan bajo condiciones de cultivo estándar, en comparación con las condiciones de cultivo bajo las cuales estos modelos experimentan un estrés, sea de naturaleza física, química, biológica o mecánica.

En contraste, estas tecnologías han sido desarrolladas y usadas en sistemas celulares en monocapa como, por ejemplo, en el estudio del papel modulador de un estrés por radiación ultravioleta en melanocitos humanos normales o malignos (línea celular o melanocitos extraídos de tejido tumoral) (Valerj C., Grob J.J. y Verrando P., en J. Invest. Dermatol. (2001) 117: 1471-1482).

Objetivos de la invención

El procedimiento para identificar una modificación final de al menos un parámetro biológico comprende los análisis de proteómica comparada y/o transcriptómica comparada y/o genómica comparada:

- a) de células vivas que están sujetas a estrés, denominadas células sometidas a estrés,
- b) de células vivas que no están sujetas a ese mismo estrés, denominadas células de referencia,
- c) siendo usadas al menos una de estas dos clases de células en un modelo tisular tridimensional, que permite finalmente identificar al menos un parámetro que se modifica tras dicho estrés.

Este análisis proteómico o transcriptómico o genómico permite definir dianas de acción para revertir o prevenir la modificación de al menos un parámetro que se modifica durante el estrés aplicado.

El objetivo de la presente invención es resolver el nuevo problema técnico que consiste en proporcionar una sustancia activa seleccionada por tal procedimiento y su uso para preparar una composición cosmética o farmacéutica.

Descripción de la invención

En el contexto de esta invención, por “estudio genómico”, los inventores quieren decir: el acto de diseñar una invención y llevar a cabo el estudio de al menos una parte del total de los genes de un organismo con la intención de estudiar su función.

Por “estudio transcriptómico”, los inventores quieren decir: el acto de diseñar una invención y llevar a cabo el estudio de al menos una parte del total de los ARN transcritos del genoma.

Por “estudio proteómico”, los inventores quieren decir: el acto de diseñar una invención y llevar a cabo el estudio de al menos una parte de las proteínas expresadas.

El procedimiento de identificación de una modificación final de al menos un parámetro biológico, está caracterizado porque comprende los análisis de proteómica comparada y/o transcriptómica comparada y/o genómica comparada:

- a) de células vivas que están sujetas a estrés, denominadas células sometidas a estrés,
- b) de células vivas que no están sujetas a ese mismo estrés, denominadas células de referencia,
- c) siendo usadas al menos una de estas dos clases de células en un modelo tisular tridimensional, que permite finalmente identificar al menos uno parámetro biológico que se modifica tras dicho estrés.

Las células denominadas “células de referencia” son células que no han sufrido el estrés estudiado. Será fácil de entender para la persona experta en la técnica que, con la intención de optimizar la invención descrita, las células de referencia son células expuestas lo menos posible a cualquier estrés. Estas células serán, sobre todo, extraídas de biopsias protegidas, es decir, aquellas que no han sido muy expuestas a radiaciones solares (mama, abdomen, etc.), o células que no se han expuesto a estrés de ningún tipo sea cual sea (estrés físico-químicos, biológico o mecánico).

ES 2 331 165 B2

Las células denominadas células “sometidas a estrés” son células procedentes de biopsias tomadas en áreas expuestas al sol (mano, cara, etc.), o células que estén expuestas a estrés (estrés físico, químico o biológico), incluyendo los estreses: UVA, UVB, luz solar, infrarrojo, infrarrojo cercano, térmico, campos magnéticos, radiaciones de ondas hertzianas incluyendo las microondas y las ondas de los teléfonos móviles, radiaciones ionizantes incluyendo beta, gamma y rayos X, así como aquellos sufridos durante una exposición accidental o no accidental a tal radiación, etc. Las células pueden proceder de varias biopsias, del mismo donante o de donantes diferentes.

El parámetro biológico corresponde en general con cualquier modificación de la expresión de un gen, con cualquier modificación de la secreción de una proteína, o con cualquier modificación que pueda ser detectada en el metabolismo de la células de referencia.

El modelo tisular se define como un modelo tisular, también denominado modelo tridimensional, que puede sembrarse con células vivas, sobre todo con el objetivo de reconstituir un tejido de un ser vivo, en particular, el modelo tisular se define como capaz de ser un modelo de secuencia conectiva, denominada dermis en el caso de la piel y denominada corión en el caso de una membrana mucosa, que contiene principalmente células estromales, un modelo epitelial constituido principalmente de células epiteliales, un modelo de epidermis constituido principalmente por queratinocitos, un modelo de piel constituido por una epidermis y por una dermis, un modelo de membrana mucosa constituida por un epitelio y un corión, un modelo de biopsias (o explantes) mantenidas viables, así como los modelos en monocapa, o en suspensión, haciendo uso de las células presentes en los modelos descritos anteriormente.

En estos modelos pueden usarse células normales, sanas o patológicas, o células procedentes de líneas celulares; estas células pueden ser de origen humano o de origen animal.

Los modelos tisulares definidos anteriormente se usan, al final del cultivo, para hacer análisis genómicos y proteómicos, lo cual permite en particular, la selección, la identificación y la caracterización de dianas potenciales para luchar contra los efectos del estrés.

Las dianas potenciales se corresponden con los parámetros biológicos que han de revertirse o cuya modificación ha de prevenirse.

Tras la definición de las dianas, estos mismos modelos y procedimientos de detección puede ser usados para la selección de principios activos cosméticos o farmacéuticos. Estos mismos modelos y procedimientos de detección puede usarse para demostrar la eficacia de formulaciones cosméticas o farmacéuticas que contengan, o no, los activos.

Estos modelos y procedimientos de detección pueden también usarse para demostrar la toxicidad de activos, cosmético o farmacéutico, o de formulaciones cosméticas o farmacéuticas, esta toxicidad es inducida por un estrés, en particular, por fototoxicidad.

Entre las técnicas analíticas usadas pueden citarse, en particular, las siguientes:

- para el análisis del perfil proteómico: electroforesis bidimensional y/o secuencias de proteínas y/o citoquinas, y/o determinaciones de ELISA combinadas,
- para el análisis del perfil genómico: secuencias de ADN, y/o reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR-multiplex), y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y/o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR tiempo real),
- para el análisis del perfil transcriptómico: secuencias de ARN, secuencias de ADNc y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa múltiplex (RT-PCR-multiplex) y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real).

Descripción detallada de una realización preferida

Un procedimiento de identificación de una modificación final de al menos un parámetro biológico comprende el análisis de proteómica comparada y/o transcriptómica comparada y/o genómica comparada:

- a) de células vivas que están sujetas a estrés, denominadas células sometidas a estrés,
- b) de células vivas que no están sujetas a ese mismo estrés, denominadas células de referencia,
- c) siendo usadas al menos una de estas dos clases de células en un modelo tisular tridimensional que permite finalmente identificar al menos un parámetro que se modifica tras dicho estrés.

Un procedimiento de identificación de una modificación final de al menos un parámetro biológico, comprende:

- a) el análisis proteómico y/o transcriptómico y/o genómico, parcial o completo, de células vivas que están sujetas a un estrés, denominadas células sometidas a estrés, sembradas en un modelo tisular;

ES 2 331 165 B2

b) comparar el análisis llevado a cabo en a) con el análisis proteómico y/o transcriptómico y/o genómico, parcial o completo, de células vivas que no estén sujetas a dicho estrés, denominadas células de referencia;

5 c) finalmente identificar al menos un parámetro biológico que se modifica después de dicho estrés.

De forma ventajosa, se usan las células de referencia y las células sometidas a estrés en un modelo tisular tridimensional.

10 De forma ventajosa, dicho parámetro biológico, que se modifica durante un estrés, se define por al menos una diferencia entre el metabolismo de las células denominadas células sometidas a estrés y el metabolismo de las células denominadas células de referencia.

Según una forma de realización ventajosa, el paso a) citado anteriormente comprende las siguientes etapas:

15 a1) exponer uno o más tipos de células a un estrés, de este modo las células serán llamadas células sometidas a estrés:

20 a2) usar estas células sometidas a estrés, en un modelo celular, es decir, en una monocapa, o en suspensión, y/o modelo tisular, es decir, tridimensional. Células que se someten a un estrés físico, este estrés es seleccionado entre los estreses: UVB, y/o luz solar.

25 Según una forma de realización ventajosa, las células de referencia son células obtenidas de biopsias que no están muy sometidas a estrés por la radiación solar como la mama, el abdomen, el prepucio, o células que no están sometidas a estrés por un estrés tal como estrés físico por UVB y/o radiación solar tipo.

De forma ventajosa, dichas células sometidas a estrés son células de al menos un ser humano o de al menos un animal.

30 De forma ventajosa, dicho estudio comprende al menos un análisis seleccionado entre los siguientes procedimientos de análisis:

- para el análisis del perfil proteómico: electroforesis bidimensional y/o secuencias de proteínas y/o secuencias de citoquinas, y/o determinaciones de ELISA combinadas,

35 - para el análisis del perfil genómico: secuencias de ADN, y/o reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR-multiplex), y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y/o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR tiempo real),

40 - para el análisis del perfil transcriptómico: secuencias de ARN, secuencias de ADNc y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (RT-PCR-multiplex) y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y/o transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real).

45 De forma ventajosa, dicho modelo tisular se cultiva y/o conserva bajo condiciones que mantengan, al menos parcialmente, el metabolismo celular.

De forma ventajosa, dicho modelo tisular comprende por lo menos fibroblastos o queratinocitos.

50 De forma ventajosa, dicho modelo comprende: células normales, sanas o patológicas, o células procedentes de líneas celulares, siendo estas células preferiblemente de origen humano o animal.

55 De forma ventajosa, dicho modelo tisular se selecciona entre los siguientes modelos: un modelo de secuencia conectiva, denominada dermis en el caso de la piel o denominada corión en el caso de una membrana mucosa, que contenga principalmente células estromales; un modelo de epitelio constituido principalmente por células epiteliales, un modelo de epidermis constituido principalmente por queratinocitos, un modelo de piel constituido por una epidermis y una dermis, un modelo de membrana mucosa constituida por un epitelio y un corión.

60 De forma ventajosa, dicho modelo es un modelo tisular de secuencia conectiva (dermis o corión) que comprende un soporte de secuencia preferiblemente seleccionado a partir de:

- un soporte inerte seleccionado entre el grupo consistentes en una membrana sintética semipermeable, en particular, una membrana de nitrocelulosa semipermeable, una membrana de nilón semipermeable, una membrana de teflón o una esponja de teflón, una membrana semipermeable de policarbonato o polietileno, polipropileno, tereftalato de polietileno (PET), una membrana semipermeable inorgánica Anopore, una membrana de acetato de celulosa o de éster de celulosa (HATF), una membrana semipermeable Biopore-CM, una membrana semipermeable de poliéster, una membrana o una película de ácido poliglicólico. En este grupo, se encuentran por ejemplo los modelos dérmico Skin^{2TM} modelo ZX1100 y Dermagraft[®] y Transcyte[®] (Advanced Tissue Sciences);

ES 2 331 165 B2

- un plástico para cultivo celular tratado (formación de una hoja dérmica: Michel M. y col. en *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Aminal* (1999) 35: 318-326);
- un gel o membrana compuesta por ácido hialurónico (Hyalograft® 3D-Fidia Advanced Biopolymers) y/o en colágeno y/o en fibronectina y/o en fibrina; en este grupo se puede encontrar por ejemplo el modelo dérmico Vitrix^R (Organogenesis);
- una membrana porosa, revestida o no revestida, hecha de colágeno capaz de contener uno o más glicosaminoglicanos y/o, finalmente, chitosan (EP 0 296 078 A1 de CNRS, WO 01/911821 y WO 01/92322 de Coletica); en este grupo, se encuentra el modelo dérmico Mimederm® (Coletica), por ejemplo, estas secuencias de soporte contienen células estromales, fibroblastos en concreto.

De forma ventajosa, dicho modelo tisular es un modelo tisular de epidermis o modelo tisular de epitelio que comprende un soporte de secuencia seleccionado preferiblemente de entre:

- un soporte inerte seleccionado entre el grupo consistente en una membrana sintética semipermeable, en concreto una membrana semipermeable de nitrocelulosa, una membrana semipermeable de nilón, una membrana de teflón o una esponja de teflón, una membrana semipermeable de policarbonato o polietileno, polipropileno, de tereftalato de polietileno (PET), una membrana semipermeable inorgánica Anopore, una membrana de acetato de celulosa o de éster de celulosa (HATF), una membrana semipermeable Biopore-CM, una membrana semipermeable de poliéster; en este grupo se encuentran los modelos de epidermis y epitelio reconstruidos (Skinethic®) así como los modelos EpiDerm®, EpiAirway®, EpiOcular® (Mattek Corporation);
- una película o una membrana compuesta por ácido hialurónico y/o en colágeno y/o en fibronectina y/o en fibrina. En este grupo, podemos citar, en particular, los modelos Mimetop® (Coletica), Laserskin® (Fidia Advanced Biopolymers), Episkin® (L'Oreal).

Estos modelos se siembran de antemano con células estromales, en particular, con fibroblastos, y luego con células epiteliales y en particular, con queratinocitos.

De forma ventajosa, en la parte epitelial además de las células epiteliales se introducen células pigmentarias, células inmunocompetentes, células nerviosas, siendo las células inmunocompetentes, preferiblemente, células de Langerhans.

De forma ventajosa, dicho modelo tisular es una piel reconstruida o un modelo tisular de membrana mucosa que comprende un soporte de secuencia dérmica o coriónica preferiblemente seleccionadas de:

- un soporte inerte seleccionada entre el grupo consistente en una membrana sintética semipermeable, en particular, una membrana de nitrocelulosa semipermeable, una membrana de nilón semipermeable, una membrana de teflón o una esponja de teflón, una membrana semipermeable de policarbonato o polietileno, polipropileno, tereftalato de polietileno (PET), una membrana semipermeable inorgánica Anopore, una membrana de acetato de celulosa o de éster de celulosa (HATF), una membrana semipermeable Biopore-CM, una membrana semipermeable de poliéster, conteniendo dicho soporte inerte células estromales, en particular, fibroblastos,
- un gel compuesto de colágeno y/o de ácido hialurónico y/o de fibronectina y/o de fibrina que comprenda células estromales, en particular, fibroblastos,
- una secuencia porosa, revestida o no revestida, hecha de colágeno capaz de contener uno o más glicosaminoglicanos y/o, finalmente, chitosan, integrando estas secuencias porosas células estromales, en particular, fibroblastos,
- una dermis desepidermizada o dermis muerta, humana o animal.

En este grupo pueden citarse, en particular, los modelos Mimeskin® (Coletica), Apligraf® (Organogenesis), ATS-2000 (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb), así como Skin²™ (ZX1200-1300-2000 -Advanced Tissue Science).

Además, existen otros modelos dedicados a la terapia tisular que pueden ser objeto de estos estudios. Pueden citarse los modelos Epidex™ (Modex Therapeutiques), Epibase® (Laboratoire Genevrier), Epicell™ (Genzyme), Autoderm™ y Transderm™ (Innogenetics).

Entonces, el soporte de secuencia se siembra con células epiteliales con el fin de obtener una membrana mucosa reconstruida o con queratinocitos con el fin de obtener una piel reconstruida.

De forma ventajosa, dicho modelo tisular usado comprende un modelo en el que al menos se incorpora un tipo celular adicional, preferiblemente células endoteliales (CE) y/o células inmunes como linfocitos, macrófagos, células dendríticas y/o células adiposas y/o apéndices de la piel tales como vello, pelo, glándulas sebáceas.

ES 2 331 165 B2

Un procedimiento definido anteriormente permite llevar a cabo la selección de al menos una sustancia potencialmente activa capaz de revertir al menos un parámetro biológico que se modifique durante un estrés según se ha definido antes.

5 La invención trata del uso de al menos una sustancia potencialmente activa capaz de proporcionar una prevención de la modificación de al menos un parámetro biológico que se modifique durante un estrés como se ha definido antes.

10 La invención trata del uso de una sustancia activa seleccionada por un procedimiento como se define anteriormente, para preparar al menos una composición cosmética y/o farmacéutica.

Según otro aspecto, la invención trata de una sustancia que es activa en el campo de la cosmética o de la farmacia y que se seleccione por un procedimiento definido anteriormente.

15 Según otro aspecto, la invención trata de una sustancia activa capaz de revertir un parámetro biológico que se identifica como modificado durante un estrés físico, químico o biológico, y/o de prevenir la modificación consecuen- te, siendo identificado este parámetro por medio de estudios comparativos entre los modelos celulares que usan las células denominadas “células sometidas a estrés” y los modelos celulares que usan las células denominadas “célu- las de referencia”; siendo al menos uno de estos modelos un modelo tisular que comprende al menos fibroblastos o queratinocitos.

Otros objetivos, características y ventajas de la invención saldrán claramente a la luz en la descripción explicativa que sigue y que se hace en referencia a los ejemplos que se dan simplemente como ilustración y que de ninguna manera limita el alcance de la invención. Los ejemplos constituyen una parte integral de la presente invención, y cualquier característica nueva que aparezca con respecto al cualquier estado actual del tema se reclama como una parte integral de la invención en su función y en su generalidad. En los ejemplos todos los porcentajes se dan por peso, la temperatura se da en grados Celsius, la presión es presión atmosférica, a menos que se indique lo contrario.

30 Ejemplo 1

Extracción y cultivo de células denominadas “células sometidas a estrés” o de células denominadas “células de referencia”

35 Las células que se denominan “células de referencia” son:

- células extraídas de biopsias, de donantes de edad variable, cuyas biopsias no están sometidas a estrés por el sol y obtenidas preferiblemente por cirugía plástica abdominal y mamaria o, finalmente, gingival o vaginal.

40 Las células que se denominan “células sometidas a estrés” son:

- células extraídas de biopsias, de donantes de edad variable, cuyas biopsias se obtienen por cirugía plástica de áreas sometidas a estrés solar (cara, cuello, mano).

45 Los tipos de células obtenidas pueden ser fibroblastos extraídos por la técnica de explantes o por digestión enzi- mática, por ejemplo, con colagenasa, queratinocitos o melanocitos extraídos tras la disociación enzimática dermoepi- dérmica, en particular, con dispasa, termolisina o tripsina-EDTA.

50 Tras la extracción, los fibroblastos se amplifican en medio DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco)/Ham F- 12 glutamax 50/50 volumen/volumen, complementado con un 10% de suero de ternera, con penicilina a una concentra- ción final de 100 UI/mililitro, con gentamicina a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro. Los fibroblastos se amplifican por tripsinización tan pronto como se obtiene una confluencia del 90%.

55 Tras la extracción, los queratinocitos se amplifican en medio K-SFM (Medio sin suero para queratinocitos-Invi- trogen) que contiene extracto de glándula pituitaria bovina complementado con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitros, con gentamicina a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro. Los queratinocitos se amplifican por tripsinización tan pronto como se obtiene una confluencia del 90%.

60 Tras la extracción, los melanocitos se amplifican en medio MMK2 (kit de Medio para Melanocitos-Sigma) com- plementado con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con gentamicina a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro y con geneticina a razón de 100 microgramos/mililitro durante 3 días hasta eliminar los queratinocitos residuales. El cultivo se continua entonces en el mismo medio a excepción de la geneticina. Los melanocitos se amplifican por tripsinización tan pronto como se obtiene una confluencia del 90%.

ES 2 331 165 B2

Ejemplo 2

Preparación de dermis reconstruida a partir de células denominadas “células sometidas a estrés” y a partir de células denominadas “células de referencia”

5 Se siembran 500.000 fibroblastos obtenidos a partir de una mezcla de tres biopsias de referencia (biopsia mamaria), que se amplificaron según se describe en el ejemplo 1, en un sustrato dérmico compuesto de colágeno que se entrecruza con difenilfosforil azida, en un medio DMEM-glutamax complementado con un 10% de suero de ternera, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor de crecimiento epidérmico a una
10 concentración final de 10 nanogramos/mililitro, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con gentamicina a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro durante un periodo de 21 días.

15 Ejemplo 3

Cuantificación de citoquinas en dermis reconstruidas sembradas de antemano con células denominadas “células sometidas a estrés” o con células denominadas “células de referencia”, siendo el estrés una irradiación con UVA

20 Se siembran 500.000 fibroblastos originados a partir de una biopsia de referencia (biopsia mamaria), que se amplifican como se describe en el ejemplo 1, en un sustrato dérmico compuesto por colágeno entrecruzado con difenilfosforil azida, en un medio DMEM-glutamax complementado con un 10% de suero de ternera, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor de crecimiento epidérmico a una concentración final de 10
25 nanogramos/mililitro, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con gentamicina a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, durante un periodo de 15 días. Entonces se cultivan durante una semana más en medio sin suero (FBM, Medio Basal para Fibroblastos-Promocell).

30 Al final del experimento, las dermis reconstruidas se lavan con tampón fosfato (PBS) pH 7,4 y entonces se ponen en placas de Petri pequeñas que contengan 1 ml de PBS a pH 7,4. Algunas muestras se conservan a temperatura ambiente (dermis reconstruidas denominadas “dermis de referencia”), y otras se irradian con dosis crecientes (0-5-10-15-20-25-30-30 J/cm²) de UVA (365 nm).

35 Entonces, las dermis reconstruidas que comprenden las células denominadas “células sometidas a estrés” o “células de referencia” se incuban en un medio sin suero (FBM, Promocell) durante 24 horas. La viabilidad de las células en las secuencias se evalúa mediante una prueba con MTT (metiltiazoltetrazolio) y se expresa como porcentaje del control no irradiado. Los medios son recogidos, centrifugados y el contenido en citoquinas se determina por el kit MAP Fluoroquina (R&B Systems). Brevemente, 50 μ l de los estándar o de las muestras se pipetea dentro de pocillos
40 identificados. Se añaden en los pocillos 50 μ l de anticuerpos específicos de las distintas citoquinas inmovilizados en micropartículas en función de un plan de placa predefinido. Tras una hora de incubación con agitación orbital, y la eliminación por lavado de las sustancias no fijadas, se añaden en los pocillos anticuerpos marcados específicos de las diferentes citoquinas y se incuban durante 2 horas con agitación orbital. Tras lavar, las micropartículas se resuspenden en tampón de lavado, se agitan durante 1 hora con agitación orbital. Inmediatamente se lleva a cabo la lectura en un Analizador Luminex 100 (R&D Systems). El contenido de las diferentes citoquinas presentes en los medios analizados
45 se determina en virtud de curvas de calibrado hechas con citoquinas humanas recombinantes altamente purificadas. Esta técnica permite hacer un experimento para analizar la secreción celular de varias citoquinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , GM-CSF, G-CSF, VEGF, bFGF, G-CSF, IFN γ).

50 TABLA I

Citoquina (pg/ml)	Células no sometidas a estrés	Células sometidas a estrés por UVA: 20 J/cm ²
MTT	100%	72%
IL1 beta (pg/ml)	24 \pm 10	56 \pm 19
IL6 (pg/ml)	570 \pm 142	1210 \pm 342
IL8 (pg/ml)	122 \pm 17	173 \pm 23
65 TNF alfa (pg/ml)	18 \pm 6	110 \pm 42

ES 2 331 165 B2

Los procedimientos de la invención permiten ver como el estrés (aquí una radiación UVA), inducen un descenso de la viabilidad celular, así como un aumento de la síntesis de interleuquinas proinflamatorias: puede ser interesante, por tanto, reducir estos aumentos de la síntesis usando principios activos correctamente seleccionados.

5

Ejemplo 4

10 *Cuantificación de citoquinas en epidermis reconstruidas que comprenden células denominadas “células sometidas a estrés” o células denominadas “células de referencia”, para identificar las modulaciones finales de las citoquinas, siendo el estrés por ejemplo una exposición a radiaciones UVB*

Se siembran $4 \cdot 10^6$ queratinocitos de referencia, que aquí no han sido expuestos a la radiación UVB (biopsia mamaria), y que se amplifican según se ha descrito en el ejemplo 1 hasta el pase 1 (primera amplificación por tripsinización), en insertos tipo cámara de Boyden (membrana de porosidad $0,4 \mu\text{M}$ y 25 mm de diámetro), las cuales han sido sembradas de antemano con una subcapa nutritiva de fibroblastos, en un medio de cultivo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementada con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor epidérmico de crecimiento a una concentración final de 10 ng/mL, con hidrocortisona a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitros, con umulina a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de $2 \cdot 10^{-9}$ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 microgramos/mililitros, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/ml, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y durante un periodo de cultivo por inmersión de 3 a 8 días.

25 Entonces los cultivos de queratinocitos se colocan en la interfase aire-líquido durante 12 a 18 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo en inmersión, excepto por el suero de ternera, la hidrocortisona, el isuprel, la triiodotironina y la umulina.

Al final del cultivo, 6 muestras no sufrieron tratamiento (modelo que comprende las células de referencia = control).

Se pueden inducir diferentes estreses en un total de 6 epidermis reconstruidas. Por ejemplo se pueden usar diferentes protocolos, para cada tipo de estrés seleccionados de entre la siguiente lista:

35 *Estrés químico:* se aplican distintos agentes a las epidermis reconstruidas de 10 minutos a una hora y se eliminan por lavado con PBS, pH 7,4, así por ejemplo: lauril sulfato sódico (SLS) al 2%, tretionina al 0,05%, peróxido de hidrógeno (3 a $300 \mu\text{M}$), óxido nítrico (NO) (MAHMA nonoato, 0,1 a $1 \mu\text{M}$), hipoxia por saturación con CO_2 y por humo de cigarrillo.

40 *Estrés biológico:* Se aplican varios agentes a las epidermis reconstruidas durante una hora y después se eliminan por lavado con PBS, pH 7,4, así por ejemplo: $\text{TGF}\beta$ (5-10 ng/ml), $\text{TNF}\alpha$ (50-100-200 UI/ml), IL1 (5-10 ng/ml), LPS (lipopolisacárido 5-10 ng/ml).

45 *Estrés mecánico:* las epidermis reconstruidas se cortan o se comprimen durante 1 hora.

Estrés térmico: las epidermis reconstruidas se colocan durante 1 hora a 37°C , 40°C y 43°C .

50 *Campos magnéticos:* las epidermis reconstruidas se colocan durante una hora bajo un campo magnético, por ejemplo, de 835 MHz/0,6 W y 1.800 MHz/0,125 W (radiofrecuencia de los teléfonos móviles).

Microondas: las epidermis reconstruidas se someten a microondas: frecuencias 2,45 y 7,7 GHz y 30 mW/cm² de poder.

55 *Radiaciones ionizantes:* las epidermis reconstruidas se someten a dosis de 0,2 a 10 mGy de Rayos X.

Estrés UV: UVA (0-60 J/cm²), UVB (0-100 mJ/cm²), luz solar (0-3.500 kJ/m²).

En este experimento, hemos elegido llevar a cabo una irradiación de tipo UVB. Para esto, se elimina el medio de cultivo y se reemplaza por PBS pH 7,4 y algunas epidermis reconstruidas presentes en los insertos se irradian con dosis crecientes de UVB (312 nm) de 0 a 100 mJ/cm². Otras se reservan bajo las mismas condiciones sin irradiación (epidermis denominadas “epidermis de referencias no sometidas a estrés”). Las epidermis reconstruidas tratadas así se incuban entonces durante 24 horas más en medio de emersión. La determinación de las citoquinas se lleva a cabo por MAP Floroquina como se ha descrito en el ejemplo 3. La viabilidad celular se evalúa por determinación de proteínas (kit del ácido bicinoninico para determinación de proteínas-Sigma St Louis, USA) o por cualquier otra prueba de viabilidad celular que permita la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (incubación durante 2 horas a 37°C en una solución que contenga 5 mM de p-nitrofenil fosfato, 0,1 M de acetato sódico, 0,1% de Triton X100 pH 5 y, entonces, la neutralización con 10% de NaOH 1 N y se lee la absorbancia a 405 nm).

ES 2 331 165 B2

En la siguiente tabla se expresan los resultados como porcentajes del control no irradiado:

TABLA II

Citoquina (pg/ml)	Células no sometidas a estrés	Células sometidas a estrés por UVB: 21 J/cm ²
BCA	100%	58%
IL1 beta (pg/ml)	25±8	137±39
IL6 (pg/ml)	120±30	702±29
IL8 (pg/ml)	352±57	473±72
TNF alfa (pg/ml)	17±11	125±42

Los procedimientos de la invención permiten ver que el estrés (aquí una irradiación UVB), induce una disminución significativa de la viabilidad celular, así como un aumento de la síntesis de interleuquinas proinflamatorias: puede ser interesante, por tanto, reducir estos aumentos de la síntesis y limitar la mortalidad celular usando correctamente los principios activos seleccionados.

Ejemplo 5

Preparación de membrana epitelial gingival reconstruida que comprende células denominadas "células sometidas a estrés" o células denominadas "células de referencia" mediante cuantificación de los ARNm de citoquinas, quimiocinas y factores inmunomoduladores

Se siembran de 1 a 2,10⁶ células de la membrana mucosa gingival denominadas "células epiteliales de referencia de la membrana mucosa gingival" (biopsia gingival, pase 3 (3^a amplificación por tripsinización)), extraídas como se ha descrito en el ejemplo 1, en insertos tipo cámara de Boyden (membrana de porosidad 0.4 μm y 10 mm de diámetro -subcapa nutritiva de fibroblastos), en medio de cultivo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementada con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF a una concentración final de 10 ng/mL, con hidrocortisona a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitros, con umulina a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de 2,10⁻⁹ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 microgramos/mililitros, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/ml, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y durante un periodo de cultivo de 3 a 8 días por inmersión.

Entonces, los cultivos de células epiteliales se mantienen en inmersión durante 12 a 18 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo en inmersión, excepto porque el porcentaje de suero de ternera se reduce de 10% a 1%.

Al final del experimento, se elimina el medio y se reemplaza por PBS, pH 7,4 y los epitelios reconstruidos presentes en los insertos se someten a estrés por varios agentes potencialmente irritantes o sensibilizadores, a la proporción de 20 μl por epitelio y durante una hora: 5% de lauril sulfato sódico (SLS), lipopolisacáridos (LPS) a 1000 U/ml, un agente antiinflamatorio: la Prednisolona a 10 mM (Sigma) y un activo: Inhipasa[®] al 3% (extracto de raíces de Pueraria lobata, Coletica) también a una proporción de 20 μl por epitelio, durante una hora. Entonces los agentes aplicados sobre los epitelios reconstruidos se eliminan y los epitelios reconstruidos se incuban durante 24 horas más en medio de inmersión sin suero de ternera. Algunos epitelios reconstruidos se analizan en términos de viabilidad celular por la prueba con MTT (metiltiazoltetrazolio). Otros epitelios reconstruidos se raspan y se ponen en Tri Reagent[®] (T9424 Sigma, St. Louis USA) y, entonces, se extraen con cloroformo. Tras la centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C, los ARN aparecen en la capa superior.

ES 2 331 165 B2

La determinación de los ARNm de los epitelios se hace por Expression Array (RD System), según el protocolo definido por los proveedores. Los resultados se expresan como un factor de variación con respecto a los controles no sometidos a estrés: [(resultados de las células sometidas a estrés/resultados de las células no sometidas a estrés) x100].

TABLA III

Marcadores	Estrés con SLS	Estrés con LPSs	Efecto de Prednisolona	Efecto de Inhipasa®
PLA2	102	168	93	50
IL1 α	241	131	62	52
IL1 β	114	182	75	69
IL-1ra	82	75	112	98
IL-1R AcP	102	124	95	119
IL-1RI	154	254	83	107
IL-1RII	137	262	88	102
TNF α	213	134	67	72
IL6	163	342	81	135
IL7	127	201	102	109
IL8	183	287	105	92
IL10	75	72	152	148
IL11	112	125	101	108
IL12	132	178	67	66
IL15	147	189	99	108

Los procedimientos de la invención permiten ver como el estrés (aquí la aplicación de un agente de tipo irritante o sensibilizador) induce la modificación de varios marcadores de inflamación. Se demuestra la eficacia del principio activo Inhipase® en comparación con la referencia antiinflamatoria.

Ejemplo 6

Preparación de un modelo tisular de piel reconstruida y un estudio del estrés térmico en la síntesis de ARNm y comparación entre donantes jóvenes y viejos

Las células extraídas son aquellas obtenidas de una biopsia mamaria fotoprotegida.

Se siembran 400.000 fibroblastos denominados “fibroblastos jóvenes” (mezcla de tres donantes de menos de 35 años de edad) y “fibroblastos viejos” (mezcla de tres donantes de más de 55 años de edad) que se extraen y amplifican hasta el pase 5 (5ª amplificación por tripsinización) como se ha descrito en el ejemplo 1, en las dos caras de sustratos dérmicos revestidos.

ES 2 331 165 B2

Brevemente, los sustratos dérmicos se preparan según el siguiente protocolo:

- Secar a 25°C un gel de colágeno al 0,75% con el fin de que forme una película.
- 5 - Depositar la película de colágeno sobre un gel de colágeno al 0,75%.
- Liofilizar durante 24 h y entrecruzar con DPPA (difenílfosforil azida a 50 µl/g de colágeno en solvente dimetilformamida y tampón borato pH 8,9).
- 10 - Tras lavar con agua desmineralizada, los sustratos dérmicos revestidos se liofilizan una vez más.

15 El medio usado para el cultivo de los fibroblastos es un medio DMEM-Glutamax complementado con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor de crecimiento epidérmico a una concentración final de 10 ng/ml, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro. La obtención de dermis reconstruidas necesita un periodo de cultivo de 14 días.

20 Entonces, 400.000 queratinocitos denominados “queratinocitos jóvenes” (mezcla de tres donantes de menos de 35 años de edad) y “queratinocitos viejos” (mezcla de tres donantes de más de 55 años de edad), que se extraen y se amplifican hasta el pase 2 (2ª amplificación por tripsinización) como se describe en el ejemplo 1, se siembran en los equivalentes dérmicos revestidos, sobre el lado de la película de colágeno, en medio de cultivo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementada con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF a una concentración final de 10 ng/mL, con hidrocortisona a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitros, con umulina a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de 2,10⁻⁹ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 microgramos/mililitros, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/ml, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y durante un periodo de cultivo por inmersión de 7 días.

Entonces, los cultivos se sitúan en la interfase aire/líquido durante 14 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo por inmersión, excepto por el suero de ternera, la hidrocortisona, el isuprel, la triiodotironina y la umulina.

35 Al final del experimento, se elimina en medio y se sustituye con PBS a pH 7,4, y las pieles reconstruidas presentes en los insertos se incuban durante una hora a 37°C (modelo que comprende las células de referencia) y durante una hora a 43°C (modelo que comprende las células sometidas a estrés). Las epidermis reconstruidas tratadas de este modo se incuban entonces durante 24 horas más en medio de inmersión. Las muestras que comprenden a las “células sometidas a estrés” y las “células de referencia” con choque térmico se analizan por secuencia de ADNc.

40 - Brevemente, los ARN de las muestras se extraen (finalmente tras homogeneización en nitrógeno líquido con la ayuda de un biopulverizador) y se purifican según el protocolo del proveedor de Tri Reagent® (Sigma) para la total eliminación del ADN.

45 - Los ARN purificados se analizan cualitativa y cuantitativamente.

- La siguiente fase fue la purificación de las mezclas de ARN mensajeros (ARNm) por hibridación de los extremos poly(A) de los ARNm con cebadores oligo(dT) biotinilados y con la captura selectiva por bolas de estreptavidina, según el protocolo de Atlas Pure (Clontech). Las sondas de ADN se marcan repetidamente con ³²P mediante transcripción inversa de los ARNm unidos a las bolas de poly(dT), con la ayuda de un grupo de cebadores específicos de las secuencias inmovilizadas en las secuencias, en presencia de [α ³³P]-dATP. Las sondas marcadas se purifican en una columna cromatográfica de exclusión; la calidad y la equivalente de las sondas marcadas se evaluó por recuento con líquido de centelleo.

55 - Las membranas Custom ATLAS se pretratan y entonces, los ADNc inmovilizados en cada membrana se hibridan (68°C, una noche) con las correspondientes sondas marcadas; los filtros se lavan antes del análisis.

- Análisis por autorradiografía y cuantificación de la radioactividad de las manchas con ayuda de un Cyclone Phosphorimager (Packard Instrument; 3 horas y, entonces, 72 horas de adquisición) y del software QuantArray, Packard.

60 - Identificación de los genes de interés que varían entre las diferentes condiciones experimentales; donantes jóvenes frente a donantes que ha sufrido o no estrés térmico. Los resultados se expresan como porcentaje de variación entre el modelo de vejez y el modelo de juventud, en condiciones de no exposición a estrés y de exposición a estrés.

65

ES 2 331 165 B2

TABLA IV

Marcadores	Viejo/Joven No sometido a estrés	Viejo/Joven Sometido a estrés
Fosfolipasa A2, proteína 1 inhibidora de la protein quinasa C, factor de activación de la exoenzima S (FAS)	101	136
Antígeno 1 de pénfigo bulboso	232	187
Proteína núcleo del proteoglicano específico de cartílago	53	82
COL1A1	Nd	142
COL1A2	Nd	124
COL3A1	46	85
COL6A1	64	62
COL6A3	62	51
Precursor de la fibronectina	57	43
Hialuronano sintetasa	189	154
Involucrina	260	159
MMP1	68	125
MMP11	63	92
MMP16	135	195
TIMP1	74	86
TIMP3	173	152
SPARC	50	51

ES 2 331 165 B2

5	Precursor del factor de crecimiento de tejido conectivo	56	45
	Receptor endotelial tipo B	51	47
10	Factor promotor de axones derivado de la glia	53	69
	Proteína 2 quimiotáctica de granulocitos	562	489
15	Factor inhibidor del crecimiento, metalotioneina III	161	142
	Precursor de IL-1 alfa	162	398
20	IL-1R1	54	64
	IL-1R2	512	242
	IL-1RA	156	168
25	IL-3	75	52
	IL-6	84	121
	IL-8	737	917
30	IL-12B	81	91
	KGF	50	42
35	Calgranulina B, proteína 14 relacionada con el factor de inhibición de la migración, proteína S100 que une calcio A9	1981	1402
40			
45	Proteína 8 relacionada con el factor inhibitorio de migración, calgranulina A, proteína S100 que une calcio A8, antígeno de fibrosis cística	4593	2567
50			
55	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos, factor activador y quimiotáctico de monocitos, pequeña citoquina A2 inducida	289	425
60			
	Factores 1 y 2 de crecimiento de placenta	388	142
	Factor A de crecimiento derivado de plaquetas	397	152
65			
	Subunidad alfa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas	50	89

ES 2 331 165 B2

5	Precursor de pleiotropina, factores que unen heparina	49	58
	Proteína fácilmente inducida por TGF beta	48	102
10	Prostaglandina G/H sintetasa 1	113	158
	Prostaglandina G/H sintetasa 2	68	125
15	Proteína de choque térmico de 47 kDa, proteína 1 que une colágeno	84	289
	Proteína de choque térmico de 70 kDa	131	587
20	Proteína de choque térmico de 90 kDa	107	412
	Bax	104	158
	bcl2	Nd	Nd
25	Antígeno FAS ligando (FASL)	Nd	289
	Receptor del antígeno FAS ligando	Nd	452
30	Ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF (TRAIL)	Nd	197
35	Precusores de la tenacina, hexabraquión, citotactina	64	75

Los procedimientos de la invención permiten ver que el estrés (aquí un choque térmico), induce, por un lado, la modificación de numerosos marcadores y por otro lado, una respuesta diferente al estrés en función de la edad de los donantes. Este modelo permite, por tanto, definir dianas de acción que proporcionan un indicio del mismo o de cómo revertir el efecto de un choque térmico. Además, este modelo permite definir una estrategia diferente para desarrollar principios activos en función del grupo de edad en cuestión.

Ejemplo 7

Preparación de un modelo tisular de piel pluricelular reconstruida que contenga células de Langerhans, células dendríticas intersticiales, macrófagos y células endoteliales, un estudio de un estrés biológico que es una agresión bacteriana con lipopolisacárido bacteriano

Generación de células dendríticas indiferenciadas e inmaduras capaces de orientarse por sí mismas de forma preferente hacia la ruta de diferenciación de las células de Langerhans:

La sangre periférica circulante se recogió tomando una muestra de sangre venosa a partir de uno o más donantes humanos, en tubos de vacío complementados con productos anticoagulantes normales como la heparina de litio.

La separación de los monocitos (CD14⁺) a partir de esta sangre circulante puede hacerse de forma ventajosa según el protocolo descrito por Geissmann y col., en J. Exp. Med. Vol 187, N° 6, 16 de marzo de 1998, páginas 961-966 publicado por The Rockefeller University Press, de la siguiente forma:

- tras la centrifugación en un gradiente de Ficoll® (diatrizoato sódico/polisacarosa con densidad 1,077; Lymphoprep Abcys 1053980), se recuperan las células mononucleadas de la sangre circulante y se marcan de forma indirecta con una mezcla de anticuerpos (principalmente anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD45RA, anti-CD56 anti-IgE) unidos a bolas magnéticas.
- tras el paso por una columna magnética, sólo eluyen los monocitos no marcados magnéticamente.

ES 2 331 165 B2

Los monocitos CD14⁺ se recuperan del eludido usando cualquier procedimiento físico de separación bien conocido por la persona experta en la técnica y, sobre todo, por sedimentación o centrifugación, y se eluyen así para cultivos sucesivos.

5 Entonces los monocitos CD14⁺ se ponen en cultivo, a la proporción de aproximadamente 1 millón por mililitro, en medio de cultivo RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) complementado con 10% de suero fetal de ternera descomplementado, y que contiene inicialmente dos citoquinas, denominadas citoquina GM-CSF a una concentración de 400 UI/ml y citoquina TGFβ1 a una concentración de 10 ng/ml.

10 El cultivo se realiza a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua que contenga 5% de CO₂.

El medio de cultivo se complementa inicialmente con una tercera citoquina, denominada citoquina IL-13 a una concentración de 10 ng/ml. Antes de máximo 2 días de cultivo, se añade el mismo medio de cultivo pero sin que contenga la IL-13, hasta el 6º día de cultivo. Al 6º día, se generan células dendríticas indiferenciadas e inmaduras capaces de orientarse por sí mismas preferentemente hacia la ruta de diferenciación de las células de Langerhans:

- aproximadamente del 60% al 80% de las células dendríticas generadas *in vitro* expresan intracelularmente la langerina, y el CCR6 que es el receptor específico de MIP-3α;
- 20 - las células dendríticas generadas *in vitro* son fuertemente atraídas quimiotácticamente por MIP-3α, y esto demuestra la funcionalidad del receptor CCR6, las células dendríticas generadas *in vitro* son fuertemente atraídas de forma química por MIP-3α, y esto demuestra la funcionalidad del receptor CCR6,
- 25 - las células dendríticas generadas *in vitro* son inmaduras ya que no expresan los marcadores de madurez CD83, DC-LAMP y CCR7.

El modelo tisular se lleva a cabo entonces según el protocolo:

30 Doscientos mil fibroblasto extraídos de una biopsia abdominal, denominadas células de referencia, se amplifican, según se describe en el ejemplo 1, y entonces se siembran en un sustrato dérmico compuesto por colágeno-glicosaminoglicano-chitosan, en un medio de cultivo DMEM-Glutamax complementado con 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor de crecimiento epidérmico a una concentración final de 10 ng/ml, con penicilina a una concentración de 100 UI/mililitro, anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y por un periodo de cultivo de 21 días. El cultivo se continúa durante una semana más en el medio descrito excepto por el EGF.

40 Entonces, 2,10⁵ queratinocitos extraídos de una biopsia abdominal, que comprende las células denominadas “células de referencia” y amplificados hasta el pase 1 (1ª amplificación) según se ha descrito en el ejemplo 1, y de 1 a 3,10⁵ células dendríticas indiferenciadas generadas *in vitro* se siembran en los equivalentes dérmicos en un medio de cultivo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementada con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF a una concentración final de 10 ng/ml, con hidrocortisona a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitros, con umulin a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de 2,10⁻⁹ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 microgramos/mililitros, penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y durante un periodo de cultivo en inmersión de 7 días.

50 Los cultivos entonces se sitúan en la interfase aire/líquido durante 20 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo en inmersión, excepto por el suero de ternera, la hidrocortisona, el isuprel, la triiodotironina y la umulina.

55 En estas condiciones, las células de Langerhans se localizan en la epidermis, mientras que las células dendríticas intersticiales, los macrófagos y las células endoteliales lo hacen en la dermis.

60 Se añade o no el liposacárido bacteriano (LPS) a los medios sumergidos a una concentración de 10 ng/ml durante 6 y 24 horas.

Al final del experimento, las pieles reconstruidas inmunocompetentes se analizan por secuencia de ADNc según se describe en el ejemplo 6. Los medios de cultivos recogidos y congelados se analizan por Fluoroquina MAP según se ha descrito en el ejemplo 3. Los resultados se presentan en pg/ml, en particular, para la parte de regulación prematura por interleuquina 1 y TNFα y en porcentajes de la síntesis de citoquinas ((resultados de células sometidas a estrés/resultados de células no sometidas a estrés)x100) para la secuencia de ADN.

ES 2 331 165 B2

TABLA V

	MAP fluoroquina	Ausencia de estrés	Estrés/ referencia 6 horas	Estrés/ Referencia 24 horas
5				
10	IL1 beta (pg/ml)	76±17	125±28	207±59
	TNF alfa (pg/ml)	53±21	87±19	95±22
15	Secuencia de ADNc			
	Interleuquina-1 alfa (IL-1 alfa; IL1A); hematopoyetina-1		100	138
20	Interleuquina-1 beta (IL-1;IL1B); catabolina		117	198
25	Enzima que convierte Interleuquina-1 beta (IL1BCE)		100	125
30	Proteína antagonista del receptor de IL1 (IL-1RA; IRAP)		72	335
35	Receptor tipo I de la Interleuquina-1 (IL-1R1); IL-1R-alfa; p80; antígeno		119	164
40				
45				
50				
55				
60				
65				

ES 2 331 165 B2

	CDW121A		
5	Receptor tipo II de la Interleuquina-1 (IL-1R2); IL-1R-beta	100	103
10	Quinasa asociada al receptor de Interleuquina 1 (IRAK)	73	152
15	Factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa; TNFA); caquectina	152	287
20	Proteína 1 inducida por el factor alfa de necrosis tumoral, endotelial; proteína B12	123	100
25			
30	Receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) + receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2); proteína 2 que une el factor de necrosis tumoral (TBP2)	83	119
35			
40	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1); proteína 1 que une el factor de necrosis tumoral (TPB1); antígeno CD120A	108	176
45			
50	Proteína TSG-6 inducida por el factor de crecimiento; proteína que une hialuronato	100	129
55			
60	Enzima que convierte el TNF-alfa (TACE); dominio 17 de una desintegrina & metaloproteinasa (ADAM17)	74	124
65			
	Proteína ABC estimuladora de TNF-alfa (TSAP)	100	100
	Ligando que induce	96	98

5	apoptosis relacionada con TNF (TRAIL); ligando AP0-2 (APO2L)		
	Precursor de CD1a	82	52
10	Precursor del antígeno CD86	56	39
15	Precursor del antígeno CD40	89	45

20 Estos resultados demuestran una activación más o menos rápida de los genes que codifican para la regulación de la respuesta inflamatoria debida a interleuquina 1 y a TNF alfa. El descenso observado en el caso de los marcadores CD1a, CD40 y CD86 no es debido a un fenómeno de regulación génica sino más bien a la desaparición de las células dendríticas, inicialmente presentes en el modelo tridimensional, bajo el efecto del estrés debido al lipopolisacárido, seguido de su migración al medio de cultivo presente bajo en inserto.

25 Los procedimientos de la invención también permiten hacer una selección de principios activos capaces de proporcionar un indicio o de modular las diferentes modificaciones observadas tras el estrés generado.

30 Ejemplo 8

Preparación de pieles reconstruidas pigmentadas expuestas a un estrés definido por una irradiación solar repetida, y estudio de la eficacia de principios activos antioxidante

35 Las células extraídas se obtienen a partir de una biopsia mamaria no expuesta al estrés estudiado. Se siembran 400.000 fibroblastos, amplificados hasta el pase 5 (5ª amplificación por tripsinización) como se describe en el ejemplo 1, en sustratos dérmicos compuestos por esponjas recubiertas de colágeno, en un medio de cultivo DMEM-Glutamax complementado con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF o factor de crecimiento epidérmico a una concentración final de 10 ng/ml, con penicilina a una concentración final de 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y con gentamicina a una concentración final de 20 miligramos/mililitros, y por un periodo de cultivo de 14 días.

45 Entonces, se siembran 400.000 queratinocitos y 10.000 melanocitos, amplificados hasta el pase 2 (2ª amplificación por tripsinización) como se ha descrito en el ejemplo 1, se sembraron en los equivalentes dérmicos en medio de cultivo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementado con un 10% de suero de ternera de Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF a una concentración final de 10 ng/ml, con hidrocortisona a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de $2 \cdot 10^{-9}$ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 miligramos/mililitro, con penicilina a una concentración fina de 100 UI/ml, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y con gentamicina a una concentración fina de 20 microgramos/mililitro, y por un periodo de cultivo en inmersión de 7 días.

50 Los cultivos entonces se ponen en la interfase aire-líquido durante 14 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo en inmersión, excepto por el suero de ternera, la hidrocortisona, el isuprel, la triiodotironina y la umulina.

55 Dos veces por semana y durante dos semanas, el medio de inmersión se elimina y se cambia por PBS a pH 7,4. Algunas pieles reconstruidas pigmentadas presentes en los insertos se conservan a temperatura ambiente; este modelo comprende células denominadas "células de referencia". Otras pieles pigmentadas reconstruidas presente en los insertos se irradian a 561 KJ/m² (que corresponde con un promedio de una hora de exposición en Europa Central) con la ayuda de un irradiador solar Sunttest CPS+ (ATLAS); este modelo comprende células denominadas "células sometidas a estrés". Fuera de los periodos de irradiación, las pieles reconstruidas se cultivan a 37°C bajo un 5% de CO₂ en medio de inmersión.

65 Se aplican 8 µl de una formulación cosmética que contiene o no un activo antioxidante al 3%; por ejemplo, Flavagrum® (Laurato de hesperitina, Coletica), Flavenger® (Caprilato de quercitina, Coletica) en las pieles reconstruidas pigmentadas durante 10 días.

ES 2 331 165 B2

Al final del tratamiento, las pieles reconstruidas pigmentadas se sumergen durante 24 horas más en medio de inmersión, y entonces se evalúa la eficacia del tratamiento antioxidante mediante análisis de:

- La viabilidad celular (prueba con MTT-metiltiazoltetrazolio) en las pieles reconstruidas pigmentadas que comprenden las células “sometidas a estrés” o las células “de referencia”. Los resultados se expresan como porcentaje de variación con respecto al control no irradiado.
- La secreción de interleuquina cuantificada por el kit de Fluoroquina MAP en el medio de cultivo recogido según se describe en el ejemplo 3. Los resultados se expresan en picogramos/ml.

TABLA VI

	Células no sometidas a estrés	Células sometidas a estrés (Irradiación)	Irradiación + Flavagrum®	Irradiación + Flavenger®
MTT	100	76%	88%	92%
IL1 beta (pg/ml)	76	179	125	97
IL6 (pg/ml)	379	649	452	426
IL8 (pg/ml)	275	395	312	294
TNF alfa (pg/ml)	53	152	105	89

Los procedimientos de la invención permiten ver que el estrés (radiación solar aquí), induce un descenso de la viabilidad celular, así como un incremento en la síntesis de interleuquinas proinflamatorias: es interesante, por tanto, limitar la síntesis de moléculas proinflamatorias usando principios activos seleccionados correctamente. Entre los principios activos seleccionados, dos de ellos, Flavagrum® y Flavenger®, muestran una eficacia capaz de hacer que los niveles de referencia de esos dos parámetros tiendan a restablecerse.

Ejemplo 9

Estudio de un estrés físico definido por una irradiación con UVB, en una piel reconstruida, y estudio de la eficacia de un principio activo, realizándose el análisis mediante RT-PCR en tiempo real

Las pieles reconstruidas se hacen según el protocolo descrito en el ejemplo 6.

La mitad de las muestras que comprenden células “sometidas a estrés” se irradian con UVB a razón de 50 mJ/cm². Las otras muestras se conservan a temperatura ambiente bajo las mismas condiciones, y constituyen las muestras que comprende células “de referencia”. Las muestras se incuban entonces durante 24 horas más en presencia o no de un activo (1% y 3% de Flavenger®, es decir quercitina acilada, Coletica, Francia).

Al final del experimento, se evalúa por la técnica de RT-PCR en tiempo real el contenido del ARNm de la tropoelastina, colágeno de tipo I y colágeno de tipo III. Para ello, se usan parejas de cebadores que permiten la amplificación de fragmentos específicos de tropoelastina, de colágeno de tipo I y de colágeno de tipo III (sentido 18/antisentido 19 y sentido 18/antisentido 20, respectivamente) y cebadores para la secuencia de la actina (541 pares de bases). Después de la extracción con Tri Reagent® (Sigma) y la purificación de los ARN según el protocolo de los proveedores, se llevan a cabo las reacciones de RT-PCR (Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa) cuantificando la RT-PCR en tiempo real con la ayuda del sistema “Opticon” (MJ Research).

ES 2 331 165 B2

5	Cadena sentido para COLL1	CAGAGGGAAGCCGCAAGA
	Cadena antisentido para COLL1	CTGGCCGCCATACTCGAAC
10	Cadena sentido para COLL3	AAGGAGAGCCCGGACCAC
	Cadena antisentido para COLL3	GGACCTCCAGGGACGCCATC
15	Cadena sentido para ELASTINA	CCTTCCCCGCAGTTACCTTTC
	Cadena antisentido para ELASTINA	GCACGCCACCTGGGTATACAC
20	Cadena sentido para ACTINA	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
	Cadena antisentido para ACTINA	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC

25

La mezcla de reacción (50 μ l) introducida en el pocillo es la siguiente, para cada muestra:

30

- 10 μ l de ARN a una concentración de 5 ng/ μ l.
- Los cebadores de los distintos marcadores usados.
- Mezcla de reacción (Qiagen-25 μ l 2xQuantiTect SYBR Green RT-PCR mezcla original que contiene MgCl₂ 5 mM + 0,5 μ l de mezcla QuantiTect RT), el marcador SYBR Green I se inserta por sí mismo en la doble hélice de ADN durante la etapa de elongación).

35

Las condiciones de RT-PCR son las siguientes:

40

- Transcripción inversa: 30 min a 50°C.
- Reacciones de PCR: [15 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C], 50 ciclos.

45

La ausencia de contaminación y la pureza de los productos amplificados se verifica por las curvas de fusión de los productos de PCR amplificados. Se eliminan los productos que presentan un pico doble o una temperatura de fusión anormal.

50

Análisis y procedimiento de cálculo

La incorporación de fluorescencia al ADN amplificado se evalúa continuamente durante los ciclos de PCR. Este sistema permite obtener curvas de medida de fluorescencia en función del número de ciclos de PCR y de ese modo, evaluar una cantidad relativa de ADN amplificado.

55

Con el fin de tener en cuenta la población celular presente en las pieles reconstruidas, todos los resultados se atribuyen a la señal de la "actina", usado como gen constitutivo.

60

Según el experimento, el umbral de medida de C(U) (= ciclo umbral) se fija para U entre 0,05 y 0,01 y se calcula una unidad de medida arbitraria para cada gen según la fórmula:

$$S_{\text{gen "x"}} = 10^7 \times (1/2)^{C(U)_{\text{gene "x"}}$$

65

C(U)gen "x" significa el umbral de medida del C(U) (Ciclo Umbral) del gen "x".

ES 2 331 165 B2

Los valores de los genes que interesan se atribuyen a la señal de la actina calculando la proporción:

$$R = \text{Sgen}^{\text{"x"}} / \text{Sactina}$$

Se comparan estas proporciones entre las muestras tratadas y no tratadas.

TABLA VII

	Células no sometidas a estrés	Células sometidas a estrés (Irradiadas)	Irradiación + Flavenger® 1%	Irradiación + Flavenger® 3%
Colágeno I	0,86	1,08	0,94	0,92
Colágeno III	1,20	1,47	1,37	1,26
Elastina	4,20	5,2	4,87	4,61

Los procedimientos de la invención permiten ver que el estrés (aquí una irradiación con UVB), induce un incremento rápido de los ARN que codifican para la síntesis de moléculas de la secuencia extracelular tales como el colágeno de tipo I, de tipo III y la elastina. La aplicación de un principio activo Flavenger® permite limitar los efectos del estrés inducido por UVB reestableciendo, de una manera dosis-dependiente, la síntesis de estas moléculas.

Ejemplo 10

Estudio de un estrés físico definido por la irradiación solar sobre dermis reconstruidas y selección de principios activos, llevándose a cabo el análisis por RT-PCR multiplex en tiempo real

Las dermis reconstruidas se hacen según se describe en el ejemplo 3, durante 3 semanas.

Algunas dermis reconstruidas se mantienen a temperatura ambiente; este modelo comprende a las células denominadas "células de referencia". Otras dermis reconstruidas se irradian a 561 KJ/m² (que corresponde con un promedio de una hora de exposición en Europa Central) con la ayuda de un irradiador solar Suntest CPS+ (ATLAS); este modelo comprende células denominadas "células sometidas a estrés".

Las dermis reconstruidas se irradian en presencia o no de activo (3%) y entonces, se incuban durante 24 horas. Finalmente, los ARN se extraen según se describe en el ejemplo 5.

La expresión de los genes de TGF latente y de colágeno de tipo I (COL1) se analiza simultáneamente por RT-PCR multiplex en tiempo real tras una rigurosa selección de los cebadores (concentraciones de los componentes, parámetros de los ciclos, condiciones de detección de la fluorescencia).

Las sondas de hidrólisis de actina (20 a 30 mer) se marcan en el extremo 5' con el fluorescente JOE (excitación 520-emisión 548) y en el extremo 3' con el amortiguador TAMRA (Applied Biosystems-Foster City, CA).

Las sondas de hidrólisis de los genes analizados (20 a 30 mer) se marcan en el extremo 5' con el fluorescente FAM (Excitación 495-Emisión 520) y en el extremo 3' con el amortiguador TAMRA (excitación 555-emisión 576-Applied Biosystem).

ES 2 331 165 B2

Cadena sentido para TGF latente	AGCGGGAGGAGGGACGAG
Cadena antisentido para TGF latente	TGAGGGACGCCGTGTAGG
Cadena sentido para COL1	CAACATGGAGACTGGTGAGACCTGCGTGTA
Cadena antisentido para COL1	CTTGTCCTTGGGGTTCTTGCTGATGTA

Las condiciones de la RT-PCR son las siguientes:

Kit Superscript de RT-PCR en una etapa con Taq platinum (Invitrogen)

Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems)

Mezcla de reacción

10 µl de ARN a una concentración de 5 ng/µl.

25 µl de mezcla de reacción 2x.

2,5 µl de cebadores, cadenas sentido y antisentido, 10 µM.

1,8 µl de SO₄Mg 50 mM.

2 µl de dNTP 5 mM.

1 µl de la hidrólisis de cada pareja de genes (actina/TGFI y actina/colágeno I) 10 µM.

1 µl de RT/Taq mix.

agua qsq 50 µl.

Protocolo de RT-PCR

RT 48°C, 30 min

Desnaturalización de RT y activación de la polimerasa a 95°C, 5 minutos 50 ciclos de: 94°C 15 seg-60°C 30 seg-72°C 30 seg.

El análisis de los resultados (cálculo de la proporción $R = \frac{S_{gen} \cdot x}{S_{actina}}$) se lleva a cabo como se ha descrito en el ejemplo 10. El efecto de los activos se analiza en términos de potenciación de la activación de TGF latente inducido debida a la irradiación solar de los activos, así como en términos de efecto directo y/o efecto rebote (a través de la liberación de TGF-β1 activo) en el colágeno de tipo I. Los resultados de varios activos interesantes (extracto de trigo, Soft Roe®, Coletica) se presentan como porcentajes de la variación con respecto al control no irradiado y no tratado con el activo.

TABLA VIII

	TGF latente	COL 1
Células no sometidas a estrés	100	100
Células sometidas a estrés (irradiadas)	124	197

ES 2 331 165 B2

Los procedimientos de la invención permiten observar como el estrés (aquí una radiación UV), induce un aumento de la síntesis de TGF beta y de colágeno I: por tanto, puede ser interesante mimetizar estos aumentos de la síntesis usando principios activos correctamente seleccionados. De este modo, aquí están los resultados obtenidos para los dos extractos seleccionados:

TABLA IX

	TGF-latente		Colágeno I		
	Células sometidas a estrés	no a estrés	Células sometidas a estrés	Células sometidas a estrés	no a estrés
Extracto de trigo	129		187	153	213
Extracto de ISoft Roe	111		154	99	147

Ejemplo 11

Uso de epidermis reconstruidas y de cultivos en monocapa que comprenden células "sometidas a estrés" y células "de referencia" para la búsqueda de la modulación de las capacidades cutáneas antibacterianas

Los péptidos antibióticos son moléculas de pequeños tamaño (de 10 a 50 aminoácidos) capaces de destruir a microorganismos tales como bacterias, hongos o virus, volviendo la membrana celular permeable. La mayoría de los péptidos antibióticos se encuentran en los tejidos epiteliales de animales, donde juegan un papel preponderante como barrera inmune primaria (primera). Más en particular, se ha demostrado que en el hombre se encuentran en los sistemas gastrointestinal y respiratorio, así como en la piel y en las membranas mucosas. Las defensinas constituyen la clase de péptidos antimicrobianos más estudiada. Se distinguen dos clases de defensinas, las α -defensinas (6 representativas) y las β -defensinas presentes en tres formas: hBD1, hBD2 y hBD3 (β -defensina humana 1, 2 y 3).

Bajo un estrés que imita un ataque microbiano (lipopolisacárido o LPS, TNA alfa, Interferon gamma, etc), las células pueden sintetizar estas moléculas a manera de defensa.

Para demostrar esto, se preparan cultivos de queratinocitos en monocapa y en forma de epidermis reconstruida con células extraídas a partir de la misma biopsia de prepucio. Los queratinocitos humanos normales se cultivan en monocapa en placas de cultivo de 96 pocillos, en un medio definido sin suero y enriquecido en calcio (concentración final 1,7 mM).

Cuando se alcanza un 80% de confluencia, las células se ponen en contacto con un estrés químico, es decir, moléculas que mimetizan un ataque microbiano, como $TNF\alpha$ (100 ng/ml) o $IFN\gamma$ (100 ng/ml), durante 16 años. Los queratinocitos no sometidos a estrés, es decir no se ponen en contacto con las sustancias químicas que imitan un ataque microbiano, se usan en el modelo de epidermis reconstruida.

Tras 16 horas, los sobrenadantes se recogen y las células se congelan en seco a $-80^{\circ}C$ tras un lavado con PBS.

El ARN total se extrae con la ayuda de kit de extracción fluo de 96 pocillos en columnas de silica y se determina a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de 96 pocillo. Los ARN se diluyen a 5 ng/ml.

La RT-PCR cualitativa en una etapa se realiza para actina, hBD2 y hBD3 con 50 ng de ARN (inicial) en 96 pocillo. Los cebadores se usan a $0,5 \mu M$ y provienen de la literatura: cadena sentido para hBD2: 5'-CCAGCCAT CAGCCATGAGGGT-3'; cadena antisentido para hBD2: 5'-GGAGCCCTTTC TGAATCCGCA-3' (Harder J. y col., A peptide antibiotic from human skin, Nature 1997; 387: 861); cadena sentido para hBD3: 5'-AGCCTAGCAGCTAT GAGGATC-3'; cadena antisentido para hBD3: 5'-CTTCGGCAGCATTTTCGGCCA-3', cadena sentido para actina: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', cadena antisentido para actina: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' (Harder J. y col., Isolation and characterization of hBD3, a novel human inducible peptide antibiotic, J. Biol. Chem. 2001; 276: 5707-5713).

ES 2 331 165 B2

Las muestras se sitúan en un termociclador y siguen un programa de amplificación: 50°C, 30 min; 94°C, 2 min; (94°C, 30 seg; 60°C, 30 seg; 68°C, 30 seg) 32 ciclos para las defensinas y 30 ciclos par la activa; 72°C, 10 min; 14°C, infinito.

5 Tras la amplificación, los productos se mezclan en una proporción de 3 μ l de productos de ampliación de activa + 6 μ l de productos de ampliación de hBD2 + 6 μ l de productos de amplificación de hBD3. Se añaden 5 μ l de una mezcla de tampón de relleno y agua (2/3) y los 20 μ l se depositan en un gel de agarosa al 2% vertido previamente. Las muestras se hacen migrar durante 30 minutos y las bandas se visualizan bajo una luz UV en una cámara oscura y se fotografían digitalmente.

10

Segunda etapa del método de selección

15 En insertos tipo cámara de Boyden (membrana de porosidad 0,4 μ m y 10 mm de diámetro) se siembran de 1 a 2,10⁶ queratinocitos del prepucio, extraídos según se ha descrito en el ejemplo 1, con una subcapa de fibroblastos nutritivos, en medio de cultivo DMEM-Glutamax/HAM F-13 (relación 3/1 v/v) complementado con un 10% de suero de ternera Hyclone II, con ácido ascórbico-2-fosfato a una concentración final de 1 milimolar, con EGF a una concentración final de 10 nanogramos/mililitro, con hidrocortisona a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con umulina a una concentración final de 0,12 UI/mililitro, con isuprel a una concentración final de 0,4 microgramos/mililitro, con triiodotironina a una concentración final de 2,10⁻⁹ molar, con adenina a una concentración final de 24,3 microgramos/mililitro, con penicilina a una concentración 100 UI/mililitro, con anfotericina B a una concentración final de 1 microgramo/mililitro, y con gentamicina a una concentración final de 20 microgramos/mililitro, y durante un periodo de cultivo en inmersión de 3 días.

25 Los cultivos de queratinocitos entonces se colocan en la interfase aire/líquido durante 11 días en el mismo medio de cultivo usado para el cultivo en inmersión, excepto por el suero de ternera, la hidrocortisona, el isuprel, la triiodotironina y la imulina.

Al final del experimento, la epidermis reconstruida se trataron de la siguiente manera:

30

- una muestra que no experimenta ningún tratamiento (modelo que comprende las células de referencia = control negativo).
- una muestra que no experimenta tratamiento con los activos pero sufre los distintos tratamientos al final del cultivo (modelo que comprende las células sometidas a estrés = control positivo), por ejemplo, incubación en presencia de TNF α a 100 ng/ml o IFN γ 100 ng/ml.
- una muestra que experimenta el tratamiento con el activo (1% en el medio de cultivo durante 24 horas) y luego un estrés (equivalente al control positivo).

40

Entonces la epidermis reconstruida se incuba durante 24 horas mas en presencia o no de los activos, se lava con PBS y se extrae el ARN total y se determina a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro para 96 pocillos. Los ARN se diluyen a 5 ng/ μ l y se tratan como ha sido descrito anteriormente.

45

Análisis

Las fotografías de los geles se analizan con un software de tratamiento de imagen que cuantifica la intensidad de las bandas. Se compara la relación de la intensidad de las bandas de hBD2/actina y hBD3/actina, por un lado, entre los modelo en monocapa y el modelo 3D (epidermis reconstruida) en condiciones de no-estrés, y, por otro lado, después del efecto del estrés (células tratadas con TNF β o IFN γ).

50

Expresión de hBD2 y hBD3 en monocapa, comparado con un modelo 3D de epidermis reconstruida, modelos con células de referencia no sometidas a estrés:

55

TABLA X

60

	hBD2	hBD3
Células no sometidas a estrés en monocapa	0,318	0
65 Células no sometidas a estrés en epidermis reconstruidas 3D	0,525	0,015

ES 2 331 165 B2

Efectos del estrés en la expresión de hBD2 y hBD3 en monocapa, comparada con modelos tridimensionales de epidermis reconstruida:

TABLA XI

	hBD2	hBD3
Células sometidas a estrés por $TNF\alpha$, en monocapa	1,240	0,266
Células sometidas a estrés por $TNF\alpha$, en epidermis reconstruida	1,617	0,546
Células sometidas a estrés por $IFN\gamma$, en monocapa	0,450	0,370
Células sometidas a estrés por $IFN\gamma$, en epidermis reconstruida	0,581	0,492

La respuesta de una síntesis de defensinas por las células de la piel, durante un estrés que imita un ataque microbiano es una respuesta de defensa que puede, por tanto, usarse para imitar en la búsqueda de principios activos que son capaces de estimularlas defensinas de la piel sin que tenga lugar una agresión química.

ES 2 331 165 B2

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de al menos un compuesto seleccionado de laurato de hesperitina y caprilato de quercetina para fabricar una composición cosmética o farmacéutica para aumentar la viabilidad celular y/o disminuir la síntesis de interleucinas proinflamatorias después de la exposición a la radiación solar y preferiblemente después de la exposición a una irradiación solar repetida.

10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que las interleucinas proinflamatorias son IL-1, IL-6, IL-8 o $TNF\alpha$.

3. Uso de quercitina adiada, particularmente de caprilato de quercitina para fabricar una composición cosmética o farmacéutica para disminuir la síntesis de moléculas de la matriz extracelular después de la exposición a la irradiación UVB.

15 4. Uso según la reivindicación 3, en el que las moléculas de la matriz extracelular son colágeno de tipo I, de tipo III y/o elastina.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición se aplica tópicamente.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 165

② Nº de solicitud: 200601448

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.05.2003

④ Fecha de prioridad: 19.11.2002

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BONINA F et al.: "Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 145, no. 1-2, 1996, páginas 87-94, todo el documento.	1-7
X	US 6426362 B1 (MILLER GUY) 30.07.2002, columna 17, líneas 1-5.	1-7
X	US 5718906 A1 (MARTIN et al.) 17.02.1998, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.12.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P, A61Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,HCAPLUS,BIOSIS,MEDLINE,EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BONINA F ET AL: "Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 145, no. 1-2, 1996, pages 87-94,	1996
D02	US 6426362 B1	30-07-2002
D03	US 5718906 A1	17-02-1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1.- NOVEDAD**

Las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Según el documento D01 la actividad antiinflamatoria de los flavonoides es conocida desde hace tiempo. D01 divulga un estudio realizado con la hesperitina y la quercitina para evaluar su efecto protector ante las radiaciones UV en liposomas de fosfaditilcolina. En este estudio también se ensaya in vitro la capacidad de permeación que tienen estos flavonoides en la piel. De acuerdo a los resultados obtenidos en sus experimentos los autores de D01 resaltan el potencial de estos flavonoides para ser usados tópicamente como agentes protectores en enfermedades de la piel, causadas, iniciadas o estimuladas por las radiaciones solares.

El documento D02 describe composiciones que contienen alfa-tocoferol, hesperitina o quercitina para tratar el estrés celular provocado entre otras causas por la exposición a radiaciones UV.

El documento D03 describe composiciones cosméticas cuyo realizadas con derivados de quercitina que protegen frente a las radiaciones UV.

A la vista de la información divulgada en los documentos citados anteriormente esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-7 carecen de actividad inventiva.