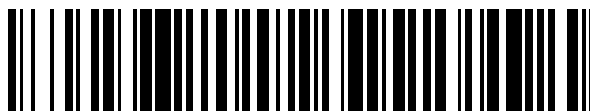


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 540**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010** **E 10787115 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2510112**

54 Título: **Método para seleccionar agentes activos que estimulan la expresión de CERT para mejorar las funciones de barrera de la piel**

30 Prioridad:

07.12.2009 US 267152 P

07.12.2009 US 267150 P

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

13.01.2015

73 Titular/es:

CHANEL PARFUMS BEAUTÉ (100.0%)

135 avenue Charles de Gaulle

92200 Neuilly-sur-Seine, FR

72 Inventor/es:

D'ARCANGELIS, ALEXANDRA y

FEDOROVA, ELENA

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

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

ES 2 526 540 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para seleccionar agentes activos que estimulan la expresión de CERT para mejorar las funciones de barrera de la piel

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para la selección de un agente activo destinado a prevenir o combatir los signos cutáneos producto del deterioro no patológico de la función de barrera, que comprende la selección de agentes activos que estimulan la expresión de la proteína de transporte de ceramida CERT en queratinocitos humanos cultivados.

Estado de la técnica

La piel está constituida principalmente por tres capas, en concreto, partiendo desde la capa más externa, la epidermis, la dermis y la hipodermis.

La epidermis, en particular, está constituida por queratinocitos (predominantemente), melanocitos (involucrados en la pigmentación de la piel) y células de Langerhans. Su función es proteger al cuerpo del ambiente externo y garantizar su integridad, y en particular detener la penetración de microorganismos o sustancias químicas, impedir la evaporación del agua contenida en la piel y constituir una barrera contra ataques externos y en particular contra los rayos ultravioletas (UV).

Para ello, los queratinocitos experimentan un proceso de proliferación y maduración dirigida continua durante la cual los queratinocitos localizados en la capa basal de la epidermis forman, en la fase final de su diferenciación, corneocitos, que son células muertas totalmente queratinizadas en forma de vainas córneas constituidas por proteínas y lípidos tales como ceramidas epidérmicas. Durante este proceso de diferenciación, también se forman lípidos epidérmicos intercorneocitarios y a continuación se organizan en forma de bicapas (lamelas) en el estrato córneo, y participan, con las vainas córneas anteriormente mencionadas, en la función de barrera de la epidermis.

El contenido de lípidos del estrato córneo consta aproximadamente del 50 % de ceramidas, el 25 % de colesterol, y el 15 % de ácidos grasos libres. Los queratinocitos sintetizan las ceramidas epidérmicas en una cascada de reacciones complejas de varias etapas que comienza en el retículo endoplasmático (RE). Las ceramidas son transportadas desde el RE al aparato de Golgi para su posterior modificación en esfingomielina mediante el transporte vesicular o no vesicular. El transporte no vesicular es el mecanismo principal. A continuación la esfingomielina es transportada a los cuerpos lamelares y excretada de los queratinocitos para su procesamiento posterior en el estrato córneo, durante la diferenciación terminal, en algunas de las ceramidas epidérmicas que a continuación se incorporan a las estructuras de la membrana lamelar que favorecen la permeabilidad de la barrera para la pérdida de agua (Y. Uchida y col., Journal of Lipid Research, Vol. 41, 2071-2082, 2000).

No obstante, la función de barrera de la epidermis puede verse perturbada en ciertas condiciones climáticas (por ejemplo, bajo los efectos del frío y/o el viento) o bajo los efectos de tensión o fatiga en particular, promoviendo así la penetración de alérgenos, irritantes o microorganismos. Estos factores externos pueden dar lugar a sequedad de la piel (la piel pierde su permeabilidad, se deshidrata y su pérdida de agua transepidérmica se incrementa), y a sensaciones de calor o enrojecimiento, y también deterioran el brillo del cutis y la flexibilidad de la piel. El deterioro de la barrera cutánea también puede promover la aparición de microgrietas o microfisuras.

Además, una barrera mal formada, como resultado de procesos de proliferación y diferenciación alterados, deja de proteger la piel frente a la radiación UV o cualquier otro tipo de ataque externo. Los rayos UV que penetran en la piel entonces pueden producir radicales libres que pueden tener un efecto perjudicial sobre diversas dianas, tales como la activación de collagenasas y elastasas que son responsables de la degradación del colágeno y la elastina, respectivamente, y de este modo de la reducción en la elasticidad y firmeza de la piel y la formación de arrugas.

Para prevenir o corregir este fenómeno, la práctica conocida es aplicar composiciones cosméticas a la piel que contienen agentes higroscópicos, tales como azúcares o polioles, que están destinados a captar el agua presente en la piel y de esta forma impedir su evaporación. Habitualmente también se han usado sustancias grasas que permiten la formación de una película oclusiva sobre la piel, que contribuye a impedir la evaporación de agua. Además, estas composiciones con frecuencia incorporan agentes activos que actúan sobre una o más de las diversas dianas biológicas involucradas en los procesos de renovación de la piel, en particular en la diferenciación de queratinocitos, la síntesis de lípidos epidérmicos y la cohesión de corneocitos, o en la síntesis endógena de constituyentes del factor humectante natural (NMF), en particular en la síntesis de proteoglicanos.

Ejemplos de dichos agentes activos son, en particular, α - y β -hidroxiácidos, especialmente, ácido láctico, ácido glicólico y ácido salicílico; urea; y compuestos aminosulfónicos.

También es práctica conocida la mejora de la función de barrera de la piel aplicando sobre la piel un intermedio de

las vías sintéticas, o un precursor, para ceramidas seleccionadas entre las bases esfingarina y esfingosina, tales como 6-hidroxil-4-esfingenina (documento FR 2.811.556).

De forma similar, también se ha propuesto actuar sobre algunas dianas biológicas que incrementan el contenido de ceramida de los lípidos de la piel, con el fin de mejorar la función de barrera de la piel. Entre estas dianas se pueden mencionar las β -glucosidasas, de las que se ha demostrado que son estimuladas por carbohidratos tales como O-octanoil-6'-maltosa (documento WO 02/38110). El documento WO 2009/077995 enseña el uso de un agente que modula la expresión de ceramidasa ácida para prevenir o tratar los signos del envejecimiento de la piel, así como un método de selección de dichos agentes. El documento WO 2008/151891 enseña un método de selección de agentes activos cosméticos que estimulan el nivel de expresión de FN3K, y el uso de dichos agentes para prevenir o combatir los signos cutáneos del deterioro de la función de barrera de la piel. No obstante, siempre existe la necesidad de proponer nuevos agentes activos cosméticos para reforzar la función de barrera de la piel con el fin de prevenir y/o reducir las sensaciones de molestia, escozor, tirantez, picor cutáneos, sensaciones de calor o enrojecimiento y/o la aparición de microgrietas o microfisuras y/o la pérdida de tersura del cutis, o cutis apagado y/o la pérdida de flexibilidad de la piel y/o para mejorar la protección de la epidermis frente a los rayos UV.

Además, dada la búsqueda incesante por los consumidores de productos naturales que contengan la menor cantidad posible de ingredientes sintéticos, y las restricciones normativas cada vez más rigurosas sobre compuestos derivados de la industria química, sería deseable que estos agentes activos cosméticos fuesen de origen vegetal.

Ahora, el Solicitante ha demostrado de forma inesperada que es posible actuar sobre una nueva diana biológica, en concreto el transportador de ceramida CERT, estimulando la expresión de esta proteína, con el fin de combatir el deterioro de la función de barrera. El Solicitante también ha desarrollado en su haber un ensayo de selección adecuado para seleccionar agentes activos tales como extractos vegetales que actúan sobre esta diana, posibilitando de esta forma satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas.

La proteína transportadora de ceramida CERT descubierta recientemente ha dilucidado una nueva vía para la introducción de ceramidas sintetizadas en el RE hacia el Golgi para su transformación en esfingomielina (Hanada y col. Nature 426:803-809). La proteína es idéntica en secuencia, aunque no en la función propuesta, a la variante de procesamiento alternativo GPBP Δ 26 de la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP). La mutación de CERT da lugar a células con un contenido de esfingomielina significativamente reducido. En células de *D. melanogaster*, la mutación de CERT produjo cambios en la fluidez de la membrana celular que dieron lugar a mayores daños por estrés oxidativo y redujeron la esperanza de vida del organismo (Rao y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 104:11364-11369). La exposición de queratinocitos cultivados o piel de ratón *ex vivo* a UVB incapacitó al CERT para transportar eficazmente la ceramida y además produjo un incremento de la muerte celular (Charruyer y col. J. Biol. Chem. 283: 16682-16692).

Para mejorar el transporte de ceramida, en el documento EP 1.652.530 se ha propuesto administrar composiciones que comprenden un fármaco que es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de CERT. Este fármaco se puede usar como agente antitumoral, como agente antiinflamatorio, agente de órgano-regénesis, agente antiinfeccioso, o agente que promueve la distribución usado para cosméticos. En este último caso, el fármaco se puede aplicar sobre la piel para así mejorar su retención de agua.

No obstante, hasta donde sabe el Solicitante, nunca se han desvelado agentes activos cosméticos que estimulen la expresión de CERT.

Por otra parte, nunca se ha sugerido que la expresión de CERT se pudiese estimular en queratinocitos en vistas a mejorar la función de barrera epidérmica.

Además, el Solicitante ha demostrado que la expresión de CERT se reduce con la edad. Por tanto, los compuestos que estimulan la expresión de CERT también podrían ser útiles para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento de la piel.

Objeto de la invención

Así, un objeto de la presente invención es un método para la selección de agentes activos, que sean capaces de prevenir o combatir los signos cutáneos producto del deterioro no patológico de la función de barrera, que comprende las siguientes etapas:

- a) el tratamiento de una muestra de queratinocitos cultivados de un donante humano con un agente activo, tal como un extracto botánico;
- b) la cuantificación de la expresión de CERT en dicha muestra tratada, con respecto a la misma muestra de células que no haya sido tratada;
- c) la selección de los agentes que proporcionan un incremento en la expresión de CERT con respecto a la muestra no tratada.

En este método, la cuantificación de la expresión de CERT se puede realizar en RT-PCR en tiempo real sobre queratinocitos cultivados. En esta situación, la etapa c) preferentemente comprende la selección de los agentes activos que proporcionen un incremento de al menos 1,7 veces en el nivel de expresión génica de CERT, en comparación con la muestra no tratada.

De manera alternativa, la cuantificación de la expresión de CERT se puede realizar mediante transferencia de Western sobre queratinocitos cultivados. En ese caso, la etapa c) comprende la selección de manera ventajosa de los agentes activos que proporcionen un nivel de proteína de CERT que sea al menos el 120 % del expresado por la muestra no tratada.

No obstante, para cuantificar la expresión de CERT se puede usar cualquier otro medio sin apartarse de la invención, por ejemplo cuantificando la producción de ARN mensajero de CERT o de la proteína CERT.

Los agentes activos que se pueden seleccionar de acuerdo con la invención son de manera ventajosa extractos botánicos, es decir, agentes activos obtenidos mediante extracción, usando cualquier tipo de disolvente, de cualquier parte de la planta tal como, por ejemplo, la corteza, madera, raíces, rizomas, tallos, hojas, frutos o flores.

En general, la extracción se puede realizar sobre partes frescas o secas de la planta, opcionalmente picadas o trituradas, de la forma habitual. La extracción generalmente se realiza sumergiendo o agitando suavemente en uno o más disolventes polares o apolares o en una de sus mezclas, a temperaturas que oscilan, por ejemplo, de temperatura ambiente a 100 °C y de manera ventajosa de 30 a 70 °C, durante un periodo de 30 minutos aproximadamente a 12 horas y preferentemente de 1 a 8 horas. A continuación, la solución resultante preferentemente se filtra para así retirar las sustancias insolubles de la planta. Cuando sea apropiado, el disolvente también se retira si se trata de un disolvente volátil, por ejemplo etanol, metanol o isopropanol.

De manera alternativa, el extracto botánico se puede preparar por extracción usando un fluido supercrítico tal como dióxido de carbono.

De acuerdo con otro aspecto adicional, se puede obtener mediante hidro-destilación, es decir, según un método que incluye una etapa para la extracción de residuos de destilación en estado de vapor, después de la eliminación de los aceites esenciales, usando un disolvente orgánico polar que tiene un índice de polaridad superior a 3,5, opcionalmente mezclado con un disolvente orgánico apolar que tiene un índice de polaridad inferior a 1.

Todos estos métodos de extracción son habituales en el ámbito de los extractos vegetales y el experto en la materia es capaz de ajustar sus parámetros de reacción en base a su conocimiento general.

Después de esta etapa de extracción, se obtiene un extracto botánico, que a continuación se puede someter a una etapa de decoloración, en particular usando carbón activo en presencia de un disolvente. El peso de carbón activo preferentemente es del 0,5 % al 50 % del peso del extracto. En particular se pueden usar uno o más disolventes seleccionados entre agua, alcoholes C₁-C₄ tales como metanol, etanol o isopropanol, disolventes orgánicos polares tales como propilenglicol o dipropilenglicol, o cualquier otro disolvente que sea habitual en la materia. A continuación los disolventes volátiles se pueden retirar a presión reducida.

El experto en la materia será capaz de preparar diversos extractos botánicos, por ejemplo, modificando las plantas y disolventes usados. De manera alternativa, en esta invención se pueden usar extractos vegetales disponibles en el mercado. A continuación, estos extractos se deben someter a ensayos de selección como se ha descrito anteriormente y en los siguientes ejemplos, para así determinar si alguno de estos extractos botánicos proporciona un incremento en el nivel de expresión génica o de proteínas de CERT y por tanto es seleccionable de acuerdo con esta invención.

Cuando supera el (los) ensayo(s) de selección anterior(es), el agente activo seleccionado de acuerdo con la invención se puede usar para fines cosméticos, para prevenir o combatir los signos cutáneos producto del deterioro no patológico de la función de barrera. Así, el método anteriormente mencionado se puede usar para seleccionar agentes capaces de proteger la piel frente a signos de sequedad tales como: aspereza de la piel, la pérdida de brillo del cutis y/o la pérdida de flexibilidad de la piel; para proteger la piel del ambiente externo, especialmente de los efectos dañinos de los rayos UV o de la penetración de toxinas, fármacos y sustancias químicas; y para reducir la carga oxidante en la piel, cuando se aplica por vía tópica a piel humana.

La integridad de la barrera se puede medir en particular mediante corneometría, según técnicas habituales muy conocidas por los expertos en la materia.

Como alternativa, el método de selección de esta divulgación se puede usar para seleccionar agentes capaces de prevenir el fotoenvejecimiento de la piel, cuando se aplica por vía tópica a piel humana. El agente activo seleccionado de acuerdo con la divulgación, o la composición que lo contiene, preferentemente se aplican a piel seca y/o piel envejecida no patológica. De forma ventajosa se pueden aplicar a la piel de la cara, el cuello y opcionalmente el escote o, como alternativa, a cualquier parte del cuerpo.

En este aspecto, el agente activo está incluido en la composición cosmética, por ejemplo en una proporción del 0,00001 % al 10 % en peso, preferentemente en una proporción del 0,0001 % al 5 % en peso y más preferentemente en una proporción del 0,001 % al 1 % en peso con respecto al peso total de la composición.

5 La composición que contiene este agente activo se puede aplicar por la mañana y/o por la noche, a toda la cara, el cuello y opcionalmente el escote o incluso el cuerpo.

10 Esta composición generalmente comprende, aparte del agente activo descrito previamente, un medio fisiológicamente aceptable y de forma preferente cosméticamente aceptable, es decir, un medio que sea adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin riesgo de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad o respuesta alérgica y en particular que no provoque sensación de incomodidad (enrojecimiento, tirantez, picor, etc.) inaceptable para el usuario.

15 Este medio en general contiene agua y opcionalmente otros disolventes tales como etanol.

La composición que contiene el agente activo seleccionado de acuerdo con la divulgación puede estar en cualquier forma adecuada para su aplicación tópica sobre la piel y en particular en forma de emulsión de aceite en agua, agua en aceite o emulsión múltiple (W/O/W o O/W/O), que opcionalmente pueden ser microemulsiones o nanoemulsiones, o en forma de dispersión acuosa, solución, gel acuoso o composición anhidra. Es preferible que esta composición esté en forma de emulsión de aceite en agua.

25 Preferentemente esta composición se usa como producto para el cuidado y/o de limpieza para la piel de la cara y/o del cuerpo y en particular puede estar en forma de fluido, gel o mus, acondicionada, por ejemplo, en un frasco con un dispensador de bomba, un aerosol o un tubo, o en forma de crema acondicionada, por ejemplo, en un tarro. Como alternativa, puede estar en forma de producto de maquillaje o en particular de base o de polvo suelto o compacto.

Puede contener diversos adyuvantes, tales como al menos un compuesto seleccionado entre:

- 30
- aceites, que se pueden seleccionar en particular entre: aceites de silicona lineales o cíclicos, volátiles o no volátiles, tales como polidimetilsiloxanos (dimeticonas), polialquilciclosiloxanos (ciclometiconas) y polialquilfenilsiloxanos (fenildimeticonas); aceites sintéticos tales como aceites fluorados, alquilbenzoatos e hidrocarburos ramificados tales como poliisobutileno; aceites vegetales y especialmente aceite de soja o aceite de jojoba; y aceites minerales tales como vaselina líquida;
 - 35 – ceras tales como ozoquerita, cera de polietileno, cera de abeja o cera de carnauba;
 - elastómeros de silicona obtenidos en particular mediante la reacción, en presencia de un catalizador, de un polisiloxano que contiene al menos un grupo reactivo (en particular hidrógeno o vinilo) y que tiene al menos un grupo alquilo (en particular metilo) o fenilo, en posición terminal y/o lateral, con una organosilicona tal como organohidrógeno-polisiloxano;
 - 40 – tensioactivos, preferentemente tensioactivos emulsionantes, ya sean no iónicos, aniónicos, catiónicos o anfóteros, y en particular ésteres de ácidos grasos de polioles tales como ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y ésteres de ácidos grasos de sacarosa; alquiléteres grasos de polietilenglicol; alquilpoliglucósidos; poliéteres modificados con polisiloxano;
 - 45 – betaína y sus derivados; policuaternios; sales de alquilsulfato graso etoxilado; sulfosuccinatos; sarcosinatos; alquil y dialquil fosfatos, y sus sales; y jabones de ácidos grasos;
 - co-tensioactivos tales como alcoholes grasos lineales y, en particular, alcohol cetílico y alcohol estearílico;
 - espesantes y/o agentes gelificantes, y en particular homopolímeros y copolímeros reticulados o no reticulados, hidrófilos o anfífilos, del ácido acrílico metilpropanosulfónico (AMPS) y/o de acrilamida y/o del ácido acrílico y/o de sales o ésteres del ácido acrílico; goma de xantano o goma de guar; derivados de celulosa; y gomas de silicona (dimeticonol);
 - 50 – agentes protectores orgánicos, tales como derivados de dibenzoilmetano (incluido butilmetoxidibenzoil-metano), derivados del ácido cinámico (incluido metoxycinamato de etilhexilo), salicilatos, ácidos para-aminobenzoicos, acrilatos de β,β' -difenilo, benzofenonas, derivados de bencilidenalcanfor, fenilbenzimidazoles, triazinas, fenilbenzotriazoles y derivados antranílicos;
 - 55 – agentes protectores inorgánicos, a base de óxidos minerales en forma de pigmentos o nanopigmentos revestidos o no revestidos, y en particular a base de dióxido de titanio u óxido de zinc;
 - colorantes;
 - agentes conservantes;
 - 60 – agentes de relleno, y, en particular, polvos con efecto de enfoque suave, que se pueden seleccionar especialmente entre poliamidas, sílice, talco, mica y fibras (en particular fibra de poliamida o fibras de celulosa);
 - sequestradores tales como sales de EDTA;
 - fragancias;
 - y sus mezclas, sin que esta lista sea limitante.
- 65

Se mencionan ejemplos de dichos adyuvantes en particular en el diccionario CTFA (International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook publicado por The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 11th edition, 2006), que describe sin limitación una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos usados habitualmente en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su uso como ingredientes adicionales en composiciones de acuerdo con la presente divulgación.

La composición que contiene el agente activo seleccionado de acuerdo con la divulgación también puede proporcionar beneficios adicionales, incluyendo una actividad calmante o antiinflamatoria, actividad blanqueante o despigmentante, actividad anti-envejecimiento y/o actividad limpiadora.

Esta composición también puede comprender agentes activos distintos de aquellos que estimulan la expresión de CERT, y en particular al menos un agente activo seleccionado entre: agentes queratolíticos y en particular α -hidroxiácidos tales como ácido glicólico, ácido láctico y ácido cítrico, y sus ésteres o sales; β -hidroxiácidos tales como ácido salicílico y sus derivados; agentes para incrementar la diferenciación y/o cornificación de queratinocitos, estimulando directa o indirectamente, por ejemplo, la producción de β -endorfina, tales como extractos de *Thermus thermophilus* o extractos de cáscaras de alubias de *Theobroma cacao*, extractos de maíz solubles en agua, extractos peptídicos de *Voandzeia subterranea* y niacinamida; lípidos epidérmicos y agentes para incrementar la síntesis de lípidos epidérmicos, directamente o mediante la estimulación de ciertas β -glucosidasas que modulan la desglicosilación de precursores lipídicos tales como glucosil ceramida en ceramidas, tales como fosfolípidos, ceramidas, hidrolizados de la proteína de lupino y derivados del ácido dihidroasmónico; humectantes, tales como polioles y, en particular glicerol, glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, azúcares y sus ésteres de alquilo, aminoácidos tales como glicina, arginina, histidina, alanina, treonina, lisina, ácido glutámico, taurina, prolina, serina y sus derivados, ácido pirrolidonicarboxílico (PCA) y sus sales, urea y sus derivados, ectoína, glucosamina, creatina, colina, betaína, sales minerales tales como sales de cloro, sodio, potasio, calcio, magnesio, cinc, manganeso o fosfato y polímeros sintéticos humectantes tales como homopolímeros y copolímeros de metacriloiloxietilfosforilcolina, y homopolímeros y copolímeros de (met)acrilato de glicerilo; antioxidantes y/o secuestradores de radicales libres y/o agentes anti-contaminantes, tales como tocoferol y sus ésteres, ácido ascórbico y sus ésteres de alquilo y fosforilo y ciertos extractos vegetales o de algas y en particular de *Thermus thermophilus*; y sus mezclas, sin que esta lista sea limitante.

La combinación de agentes activos que estimulan la expresión de CERT con uno o más de los agentes descritos anteriormente posibilita combinar de forma ventajosa en la misma fórmula los efectos de estos dos tipos de agentes activos y así obtener la máxima protección duradera de la piel.

Descripción detallada de la invención

Ahora se ilustrará la invención mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo para la selección de agentes activos mediante transferencia de Western

Protocolo:

Se preparó un extracto de *Vanilla planifolia* como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 2007/034042.

Se evaluó el efecto de un extracto botánico sobre la expresión de la proteína CERT en queratinocitos.

Se inocularon queratinocitos derivados de prepucios neonatales (Cascade Biologics/Invitrogen, Portland, OR, EE.UU.) en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo de crecimiento de queratinocitos (Epilife, Invitrogen, CA, EE.UU.), es decir, un medio de cultivo modificado suplementado con suplemento de crecimiento definido de Epilife (EDGS).

Después de cultivar durante 24 horas en una incubadora a 37 °C, las células casi en confluencia se lavaron con tampón PBS (Invitrogen) y se incubaron con un medio básico específico (Epilife, Invitrogen) que contiene el extracto a someter a ensayo, durante 24 horas y por triplicado, a concentraciones crecientes. La citotoxicidad del extracto se determinó antes de determinar su actividad.

Para cuantificar la expresión de proteína CERT en una muestra tratada con respecto a una muestra sin tratar, se usó transferencia de Western (WB). Las células incubadas como se ha descrito anteriormente se lisaron y las proteínas extraídas se separaron mediante SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que se sondeó con un anticuerpo dirigido contra CERT (Bethyl Laboratories, TX, EE.UU.). Los resultados se normalizaron a la cantidad de proteína total en cada muestra. Los resultados se expresan en términos de incremento del porcentaje (%) o reducción de la expresión de la proteína diana CERT en la muestra tratada frente al control sin tratar.

El contenido de proteína total se cuantificó usando el kit MicroBCA (Thermo Scientific, IL, EE.UU.).

Los resultados positivos se confirmaron usando células de al menos dos donantes diferentes.

5 Resultados:

Los resultados se dan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

	Concentración	Estimulación de proteína CERT	Desviación media
Queratinocitos sin tratar	-	100,0 %	0,0 %
Extracto de <i>Vanilla planifolia</i>	0,02 %	130,3 %	5,0 %

De este ensayo se deriva que los extractos de *Vanilla planifolia* posibilitan estimular la expresión de proteína CERT en queratinocitos humanos normales y así se pueden usar para mejorar o restaurar la función de barrera de la piel.

15 Ejemplo 2: Ensayo para la selección de agentes activos mediante RT-PCR

Protocolo:

Se evaluó el efecto de dos agentes activos sobre la expresión del ARNm de CERT en queratinocitos.

Se inocularon queratinocitos derivados de prepucios neonatales (Cascade Biologics/Invitrogen, Portland, OR, EE.UU.) en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo de crecimiento de queratinocitos (Epilife, Invitrogen, CA, EE.UU.), es decir, un medio de cultivo modificado suplementado con EDGS.

Después de cultivar durante 24 horas en una incubadora a 37 °C, las células confluentes al 70 %-80 % se lavaron con tampón PBS (Invitrogen) y se incubaron con medio básico (Epilife, Invitrogen) que contiene el agente activo a someter a ensayo, durante 24 horas y por triplicado, a concentraciones crecientes. Después de estudiar la citotoxicidad del agente activo, se evaluó su actividad.

Para cuantificar la expresión del ARN mensajero de CERT en una muestra tratada con respecto a una muestra sin tratar, en primer lugar se aisló el ARN usando el kit reactivo RNeasy (Qiagen, CA, EE.UU.) y a continuación se cuantificó usando el kit Quantit (Invitrogen). Se realizaron transcripciones inversas usando el kit Amp RNA PCR (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La medición de la PCR en tiempo real se realizó usando el aparato iCYCLER IQ (Bio-Rad, CA, EE.UU.) con sondas Taqman. Los cebadores de PCR se obtuvieron en Applied Biosystems (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). En todos los ensayos, el ADNc se amplificó usando un programa estandarizado. Cada muestra se cargó con una mezcla maestra de Taqman, cebadores Taqman, y agua. La cantidad final de ADNc por reacción corresponde a 75 ng de ARN total usado para la transcripción inversa.

Los resultados se normalizaron con respecto a la expresión de un gen constitutivo en estas muestras y se corrigieron con respecto a las diferencias en la eficacia de la PCR. El gen constitutivo usado en este experimento fue RPLPO. La cuantificación relativa de la expresión del gen diana se realizó usando el modelo matemático de Pfaffl (Pfaffl, MW, Nucleic Acids Res. 29(9), p. E45, 2001). Los resultados se expresan en términos de incremento en el número de veces o reducción de la expresión del gen diana CERT en la muestra tratada.

Resultados:

Los resultados se dan en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2

	Concentración	Estimulación de ARNm de CERT	Desviación típica
Queratinocitos sin tratar	-	1,0	0,0
Ácido lipoico	0,0005 %	2,0	0,3
Resveratrol	0,0005 %	2,4	0,3

De este ensayo se deriva que los agentes activos sometidos a ensayo posibilitan estimular la expresión de proteína CERT en queratinocitos humanos normales y así se pueden usar para mejorar o restaurar la función de barrera de la piel.

Ejemplo 3: Evaluación de la expresión de CERT con la edadProtocolo:

5 La variación de la expresión de la proteína CERT se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHQ), sobre muestras de piel embebidas en parafina de donantes de diversos grupos de edad (Cybrdi, MD, EE.UU. y Tissue Array Networks, MD, EE.UU.). La tinción se realizó sobre secciones de 6 µm de donantes de 4 grupos de edad (20-30 semanas de edad, 28-35 años de edad, 39-49, y 50-69 años de edad), con anticuerpos dirigidos contra CERT (Bethyl Laboratories, TX, EE.UU.) y anticuerpos secundarios (Lab Vision, CA, EE.UU.). La tinción se visualizó usando el sistema AEC (Lab Vision). La tinción se evaluó sobre 2-6 imágenes cada una procedente de 3-6 donantes de cada grupo de edad realizando una evaluación visual ciega de la intensidad y grado de tinción usando una escala de 1 a 5 (1 = menos intenso, 5 = más intenso). Los valores promedio de las clasificaciones se compararon para su significación usando el ensayo t despareado.

15 Resultados:

La evaluación de la tinción de CERT en la piel de adultos jóvenes (28-35 años de edad) mostraba una tinción citoplasmática intensa en la epidermis que se tradujo en una calificación de 4,63 ($\pm 0,5$) (Figura 1, barra gris oscura). La intensidad de la tinción se redujo visiblemente en secciones de donantes de piel de mayor edad (39-49) y especialmente en los de 50-69 años de edad, en los que la intensidad de la tinción obtuvo una calificación de 3,06 ($\pm 0,66$). Esto demuestra que la expresión de la proteína CERT se reduce significativamente con el aumento de la edad ($P < 0,0001$).

Ejemplo 4: Composición cosmética

25 La siguiente composición se puede preparar de forma convencional para los expertos en la materia. Las cantidades indicadas a continuación se expresan en forma de porcentajes en peso. Los ingredientes en mayúsculas se identifican de acuerdo con el nombre INCI.

EDTA tetrasódico	0,05 %
METACRILATO DE POLIGLICERIL Y PROPYLENGLICOL ⁽¹⁾	5,00 %
Glicerol	6,00 %
Agentes gelificantes en fase acuosa	5,50 %
Emulsionantes no iónicos	4,00 %
Alcohol cetearílico	2,00 %
Emolientes	17,00 %
Acetato de tocoferol	0,50 %
Agentes conservantes	2,20 %
Extracto botánico ⁽²⁾	0,05 %
Hialuronato sódico	5,00 %
Fragancia	cs
Colorantes	cs
Agua	cs hasta el 100,00 %

⁽¹⁾ Lubrajel MS[®] de Guardian Laboratories

⁽²⁾ obtenido mediante la selección de diversos extractos vegetales en el ensayo descrito en el Ejemplo 1 o 2

30 Esta composición, en forma de emulsión de aceite en agua, se puede aplicar diariamente, por la mañana y/o por la noche, en la piel de la cara para hidratarla y hacerla flexible, suave y luminosa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la selección de agentes activos, que son capaces de prevenir o combatir los signos cutáneos producto del deterioro no patológico de la función de barrera, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) tratar una muestra de queratinocitos cultivados de un donante humano con un agente activo, tal como un extracto botánico;
b) cuantificar la expresión de CERT en dicha muestra tratada, con respecto a la misma muestra de células que no haya sido tratada;
c) seleccionar los agentes que proporcionan un incremento de la expresión de CERT con respecto a la muestra no tratada.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la cuantificación de la expresión de CERT se realiza mediante RT-PCR.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la etapa c) comprende seleccionar los agentes activos que proporcionan un incremento de al menos 1,7 veces en el nivel de expresión génica de CERT, en comparación con una muestra sin tratar en la que la expresión es de 1.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la cuantificación de la expresión de CERT se realiza mediante transferencia de Western.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** la etapa c) comprende seleccionar los agentes activos que proporcionan un nivel de proteína CERT que es al menos el 120 % del expresado por la muestra sin tratar.
- 30 6. Uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para seleccionar agentes activos capaces de prevenir o combatir los signos cutáneos resultantes del deterioro no patológico de la función de barrera cuando se aplican por vía tópica a piel humana.
- 35 7. Uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para seleccionar agentes activos capaces de proteger la piel de los signos de sequedad, proteger la piel del ambiente externo, en particular de los efectos dañinos de los rayos UV o de la penetración de toxinas, fármacos, sustancias químicas, y reducir la carga oxidante de la piel, cuando se aplica por vía tópica a piel humana.
- 40 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** dichos signos se seleccionan entre: aspereza de la piel, pérdida de brillo del cutis y/o la pérdida de flexibilidad de la piel.
9. Uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para seleccionar agentes activos capaces de prevenir el fotoenvejecimiento de la piel cuando se aplican por vía tópica a piel humana.