

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 210**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2012 E 12306029 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2703498**

54 Título: **Inhibidores de micro-ARN para uso para prevenir y/o atenuar el envejecimiento cutáneo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2015

73 Titular/es:

**CHANEL PARFUMS BEAUTÉ (100.0%)
135 avenue Charles de Gaulle
92200 Neuilly-sur-Seine, FR**

72 Inventor/es:

**CANDI, ELEONORA;
MELINO, GERRY;
SAINTIGNY, GAËLLE y
MAHE, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 534 210 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

Inhibidores de micro-ARN para uso para prevenir y/o atenuar el envejecimiento cutáneo

5 **Sector de la técnica**

La divulgación se refiere a la identificación y el uso de compuestos que inhiben la expresión o la actividad de los microARN para prevenir y/o atenuación del envejecimiento cutáneo.

10 **Estado de la técnica**

La senescencia celular es una forma de parada irreversible del crecimiento, descrita originalmente para células en cultivo que se encuentran en la etapa final de la proliferación, pero que se sabe que se estimulan con distintos estímulos, tales como lesiones del ADN, estrés oxidativo, quimioterapia y exceso de estímulos mitóticos tales como la activación oncogénica (Serrano *et al.* 1997; Campisi 2001; Schmitt *et al.* 2002). Las células entran en una etapa de parada irreversible, mostrando rasgos distintivos, que incluyen aumento de la actividad de la beta-galactosidasa y aumento de la expresión de mediadores fundamentales incluyendo la proteína de la leucemia promielocítica, p53 (PML), p16INK4a y p19Arf (Serrano *et al.*, 1997, Narita *et al.*, 2003; Sharpless *et al.*, 2004). Aunque se ha estudiado principalmente *in vitro*, la senescencia celular mantiene una relación correlativa con el proceso del envejecimiento a nivel de animal en su conjunto, lo que implica de este modo muchos de los factores que regulan la senescencia ya que contribuyen al envejecimiento del organismo (Sharpless y DePinho, 2004, Campisi, 2005).

Todas las células senescentes experimentan profundos cambios en la expresión genética. La formación de perfiles de expresión genética exhaustiva ha identificado genes en el ciclo celular, factor de crecimiento de insulina, interferón, MAP quinasa y rutas de estrés oxidativo como desreguladas de forma coherente durante la senescencia celular. La expresión del gen alterado da lugar al fenotipo senescente, y está bien establecida como parte de los mecanismos y las rutas que activan el programa de senescencia en las células. Sin embargo, los factores responsables de las alteraciones de la expresión genética durante la senescencia siguen siendo difíciles de alcanzar.

Los microARN (miARN) son moduladores fundamentales de la expresión genética en diversos procesos biológicos y patológicos. Los cambios en los niveles de expresión de miARN se producen en la senescencia celular y en el envejecimiento del organismo (Grillari *et al.* 2010; Hackl *et al.* 2010), y se han relacionado con cambios en los niveles de los mARN que son supuestas dianas de los miARN específicos (Lafferty *et al.* 2009; He *et al.* 2007; Maes *et al.* 2009). Varios estudios han identificado conjuntos específicos de miARN regulados de forma positiva en senescencia replicativa de fibroblastos (Faraonio *et al.* 2012; Dhahbi *et al.* 2011; Yong Wang *et al.* 2010).

Por lo tanto, es deseable e importante proporcionar productos o agentes activos que eviten, reduzcan o incluso inhiban la senescencia celular, en particular la senescencia de fibroblastos.

40 **Objeto de la invención**

La presente divulgación proporciona de este modo un método para identificar tales agentes útiles.

45 La presente divulgación por lo tanto se refiere a un método *in vitro* para identificar sistemáticamente compuestos candidatos para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, que comprende las siguientes etapas:

- a. poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una muestra de fibroblastos;
- 50 b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 en dichos fibroblastos;
- c. seleccionar los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos tratados en a. en comparación con los fibroblastos sin tratar.

55 Preferentemente, los fibroblastos son fibroblastos presenescentes. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para identificar sistemáticamente compuestos candidatos para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, que comprende las siguientes etapas:

- 60 a. poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una muestra de fibroblastos presenescentes;
- b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 en dichos fibroblastos presenescentes;
- 65 c. seleccionar los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos presenescentes tratados en a. en comparación con los fibroblastos presenescentes sin tratar.

Por "fibroblastos presenescentes", se hace referencia a células que expresan p16 a un nivel detectable (este nivel se puede determinar por transferencia de Western). Estas células proliferan de forma más lenta que los fibroblastos jóvenes.

De acuerdo con una primera realización, la etapa b. se realiza antes y después de la etapa a. En este caso, la expresión o la actividad del microARN (elegido entre miR-134 y miR-152) medida en los fibroblastos, preferentemente presenescentes, antes de la etapa a. corresponde al valor de control (es decir fibroblastos sin tratar, preferentemente presenescentes). Por lo tanto, la etapa c. comprende la selección de los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos, preferentemente presenescentes, tratados en a. en comparación con los mismos fibroblastos, preferentemente presenescentes, antes de la etapa a.

De acuerdo con otra realización, el método comprende una primera etapa a'. de preparación de muestras de fibroblastos, preferentemente presenescentes. Por lo tanto, preferentemente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar sistemáticamente compuestos candidatos para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, que comprende las siguientes etapas:

a'. preparar al menos dos muestras de fibroblastos, preferentemente presenescentes;
 a. poner una de las muestras en contacto con al menos un compuesto de ensayo; a continuación
 b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 en dichas muestras; y
 c. seleccionar los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos, preferentemente presenescentes, tratados en a. en comparación con la muestra de fibroblastos sin tratar, preferentemente presenescentes.

En esta segunda realización, la expresión o actividad del microARN elegido entre miR-134 y miR-152 medida en la muestra de fibroblastos, preferentemente presenescentes, y no sometida a la etapa a., corresponde al valor del control (es decir fibroblastos sin tratar, preferentemente presenescentes).

Mediante la expresión "envejecimiento de la piel" se hace referencia a cualquier cambio en el aspecto externo de la piel debido al envejecimiento, aunque éste sea cronobiológico y/o foto-inducido, tal como, por ejemplo, arrugas y líneas finas, piel debilitada, piel flácida, piel adelgazada, y piel carente de elasticidad y/o tono, y también cualquier cambio interno en la piel que no se refleja de forma sistemática mediante un aspecto externo cambiado, tal como, por ejemplo, cualquier degradación interna de la piel, en particular del colágeno, después de la exposición a la radiación ultravioleta.

Los miR de interés de acuerdo con la invención se eligen entre miR-134 y miR-152.
 El miR-134 maduro tiene la SEC ID N° 1 (ugugacugguugaccagagggg). Es la secuencia HGNC:31519;
 El miR-152 maduro tiene la SEC ID N°: 2 (UCAGUGCAUGACAGAACUUGG). Es la secuencia HGNC: 31538.

Estas secuencias provienen de la base de datos de HGNC.

La función de miR-134 se desconoce, aunque miR-152 se ha descrito como supresor tumoral en el cáncer de endometrio (Tsuruta *et al.* 2011) y en carcinomas hepatocelulares (Huang *et al.* 2010), en el último, tiene como objetivo la ADN metiltransferasa 1, causando metilación anómala del ADN. Sin quedar ligado por teoría alguna, los ejemplos muestran que ambos miARN tienen como dianas la integrina alfa 9 (ITGA9), aunque miR-152 tiene como objetivo a ITGA5. Las integrinas son glicoproteínas de membrana integral heterodiméricas formadas por una cadena alfa y una cadena beta que media la adherencia celular-célula y célula-matriz. La proteína codificada por ITGA9, cuando se une a la cadena beta 1, forma una integrina que es un receptor de VCAM1, citotactina, osteopontina y fibronectina-EIIIA (FN-EIIIA, también denominada EDA) en la matriz extracelular. En general, los receptores de adherencia de célula-matriz tales como integrinas desempeñan papeles esenciales en procesos de desarrollo que implican interacciones próximas entre las células y su matriz extracelular circundante (ECM). Además de mediar la unión a sus respectivos ligando o ligandos de ECM, las integrinas tienen funciones de señalización especializadas y pueden regular la expresión genética así como la forma, migración, proliferación, y supervivencia celular. Además, la integrina que se vulnera ECM no solamente es necesaria para señales de transducción de la matriz a células, sino que esta interacción también comienza respuestas que permiten que las células organicen y remodelen la matriz (Leiss *et al.* 2008); esta característica está muy limitada en tejidos envejecidos y en particular en la piel envejecida. Estudios recientes han mostrado que la integrina $\alpha 9 \beta 1$ (ITAG9) aumenta la expresión de proteasas que degradan la matriz (Roy *et al.* 2011), que degradan colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular que comprenden el tejido conectivo dérmico durante el envejecimiento (Quan *et al.* 2009).

Los compuestos de ensayos sometidos a ensayo pueden ser de cualquier tipo. Pueden ser de origen natural o se

pueden haber producido por síntesis química. Esto puede implicar una biblioteca de compuestos químicos definidos estructuralmente, compuestos o sustancias sin caracterizar, o una mezcla de compuestos.

5 Los compuestos naturales incluyen compuestos de origen vegetal, como plantas y animales. Preferentemente, los compuestos de ensayo son vegetales, elegidos preferentemente entre extractos botánicos.

10 Los fibroblastos presenescentes usados en las etapas a' y a. mencionadas anteriormente son un modelo celular de senescencia replicativa. Estos fibroblastos presenescentes se obtienen después de 70 duplicaciones de la población en condiciones de cultivo clásicas. Las condiciones de cultivo clásicas comprenden un cultivo de los fibroblastos en medio 106 al que se añaden suplementos de crecimiento de LSGS, mantenidos constantemente en un estado de subconfluencia.

Preferentemente, se obtienen gracias al siguiente proceso:

15 Se cultivan Fibroblastos Dérmicos Primarios Humanos Neonatales en un medio apropiado. Dicho medio puede ser medio 106 al que se añaden suplementos de crecimiento de LSGS. Se mantienen constantemente en subconfluencia. Las células se pasan en periodos de tiempo apropiados, normalmente una vez a la semana.

20 En cada pasaje, una parte de las células se recoge y se analiza para medir las duplicaciones de la población, tiempo de duplicación de la población, marcadores bioquímicos de senescencia y ciclo celular.

25 Preferentemente, las duplicaciones de la población de fibroblastos humanos primarios se mide durante aproximadamente 100 días de cultivo. El análisis del marcador senescente (p16) sugiere que aún que el marcador de proliferación (p1) disminuye, las células no se están diferenciando. El porcentaje de células en proliferación disminuye durante la senescencia.

De acuerdo con la etapa a., el compuesto de ensayo se pone en contacto con una muestra de fibroblastos, preferentemente presenescentes.

30 De acuerdo con la etapa b., la expresión y/o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 se mide en dichos fibroblastos, preferentemente presenescentes.

La expresión "expresión de un microARN" pretende indicar la cantidad de microARN producido.

35 La expresión "actividad de un microARN" pretende indicar la capacidad de dicho microARN para inhibir el nivel del mRNA al que hibrida.

40 Los expertos en la materia están familiarizados con las técnicas para la detección cuantitativa o semicuantitativa del mRNA al que dicho microARN hibrida, y por lo tanto, con la determinación de dicha actividad de microARN. Las técnicas basadas en la hibridación del mRNA con sondas de nucleótido específicas son las más comunes, como transferencia de Northern, RT-PCR (transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

45 Los expertos en la materia también están familiarizados con las técnicas para la detección cuantitativa o semicuantitativa del microARN, o el mRNA al que hibrida dicho microARN. En particular, la expresión del microARN se puede medir con PCR en tiempo real. La actividad del microARN se puede medir con PCR en tiempo real en las dianas de mRNA, o mediante la evaluación del nivel de proteína de la diana por transferencia de Western. Como alternativa, si se desconoce la diana, la actividad del microARN se puede someter a ensayo por evaluación del efecto biológico del microARN en sí mismo, tal como un efecto en la tinción de beta-gal o en la proliferación.

50 Preferentemente, la expresión del microARN se mide con PCR en tiempo real.

55 La expresión o actividad del microARN después del tratamiento con el compuesto de ensayo se compara a continuación con valor de control, es decir un valor obtenido en los mismos fibroblastos (preferentemente presenescentes) antes del tratamiento, o un valor obtenido en otra muestra de fibroblastos (preferentemente presenescentes) que está sin tratar.

60 De acuerdo con la etapa c., los contextos útiles son aquéllos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos tratados, preferentemente presenescentes, en comparación con fibroblastos sin tratar, preferentemente presenescentes. Preferentemente, la inhibición de la expresión o de la actividad de dicho microARN es de al menos un 50 %, preferentemente de al menos un 60 %.

65 Los compuestos seleccionados por medio de los métodos de identificación sistemática que se definen en el presente documento se pueden someter a ensayo posteriormente en otros modelos *in vitro* y/o modelos *in vivo* para sus efectos sobre el envejecimiento cutáneo. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención son inhibidores del

microARN a que se dirigen, es decir se eligen entre miR-134 y miR-152.

Un objeto de la divulgación también es el uso cosmético de un inhibidor de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152, identificándose dicho inhibidor de acuerdo con el método que se ha descrito anteriormente, para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel.

De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la presente divulgación es el uso de al menos un inhibidor de microARN, identificándose dicho inhibidor de acuerdo con el método que se ha descrito anteriormente, para preparar una composición terapéutica para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel. La presente divulgación por lo tanto también se refiere al uso de al menos un inhibidor de microARN, identificándose dicha inhibidor de acuerdo con el método que sea descrito anteriormente, para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel.

El inhibidor se refiere a un compuesto que elimina o básicamente reduce la expresión o actividad del microARN elegido entre miR-134 y miR-152. El término "básicamente" se refiere a una reducción de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, preferentemente de al menos un 50 %, y más preferentemente de al menos un 60 %.

El inhibidor de microARN se puede usar en una proporción de un 0,001 a un 10 % en peso, preferentemente en una proporción de un 0,01 a un 5 % en peso de la composición.

El inhibidor puede ser un polinucleótido de ADN o ARN anti sentido o un siARN. Preferentemente, los inhibidores de microARN (miR) son anti-miR.

Los anti-miR son inhibidores de miR que inhiben de forma específica a los miR endógenos. Los anti-miR son ácidos nucleicos monocatenarios diseñados para unirse de forma específica al e inhibir moléculas endógenas de microARN. Los anti-miR tienen secuencias de ácidos nucleicos complementarias a la secuencia del miR diana. Estos inhibidores listos para usar se pueden introducir en células usando parámetros de transfección o de electroporación similares a los usados para los siARN, y permiten el estudio detallado de los efectos biológicos de miR. El uso del anti-miR permite el análisis funcional de miR por regulación negativa de la actividad de miR.

Los anti-miR están disponibles en el mercado; se pueden obtener, por ejemplo, en Ambion o Applied Biosystems.

En base a la bibliografía, es posible que una inhibición de un 70 % de la expresión de miR tenga un efecto en la inducción/inhibición de la senescencia en células normales humanas (Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, VasaNicotera M, Ippoliti A, Novelli G, Melino G Lauro R, Federici M., MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1, Circulation. 2009; 120 (15): 1524-32).

Los inhibidores de los miR identificados gracias al procedimiento de identificación sistemática que se ha descrito anteriormente se pueden formular dentro de una composición, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable, preferentemente un medio cosméticamente aceptable, es decir, un medio que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin ningún riesgo de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad o respuesta alérgica, y en especial que no causa ninguna sensación de malestar (eritema, irritación, escozor, etc) que sean inaceptables para el usuario. Estas composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral o por vía tópica. Preferentemente, la composición se aplica por vía tópica. Para la administración oral, la composición puede estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos revestidos con azúcar, jarabes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas para la liberación controlada. Para la administración tópica, la composición es más en particular para uso para el tratamiento la piel y las membranas mucosas, y puede estar en forma de bálsamos, cremas, leches, pomadas, polvos, almohadillas impregnadas, soluciones, geles, pulverizadores, lociones o suspensiones. También puede estar en forma de suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas o parches poliméricos o hidrogeles para la liberación controlada. Esta composición para aplicación tópica puede estar en forma anhidra, en forma acuosa o en forma de una emulsión. La composición para aplicación tópica puede estar en forma de una emulsión de aceite en agua, de agua en aceite o múltiple (W/O/W u O/W/O), que pueden ser opcionalmente microemulsiones o nanoemulsiones, o en forma de una dispersión acuosa, una solución, un gel acuoso o un polvo. En una variante preferente, la composición está en forma de un gel, de una crema o de una loción.

El vehículo fisiológicamente aceptable de la composición por lo general comprende agua y opcionalmente otros disolventes tales como etanol.

Esta composición se usa preferentemente como un producto de cuidado y/o limpieza para la piel facial y/o corporal y puede estar especialmente en forma de un fluido, un gel o una espuma, acondicionado, por ejemplo, en una botella con bomba dispensadora, un aerosol o un tubo, o en forma de una crema acondicionada, por ejemplo, en un tarro. Como una variante, puede estar en forma de un producto de maquillaje y en particular una base o un polvo suelto o compacto.

Puede comprender diversos adyuvantes, tales como al menos un compuesto elegido entre:

- aceites, que se pueden elegir especialmente entre: aceites de silicona volátiles o no volátiles, cíclicos o lineales, tales como polidimetilsiloxanos (dimeticonas), polialquilciclosiloxanos (ciclometiconas) y polialquilfenilsiloxanos (fenildimeticonas); aceites sintéticos tales como aceites fluorados, alquilbenzoatos e hidrocarburos ramificados tales como polisobutileno; aceites vegetales y especialmente aceite de soja o aceite de yoyoba; y aceites minerales tales como vaselina líquida;
- ceras tal como ozoquerita, cera de polietileno, cera de abeja o cera de carnaúba;
- elastómeros de silicona obtenidos especialmente al hacer reaccionar, en presencia de un catalizador, un polisiloxano que contiene al menos un grupo reactivo (en especial hidrógeno o vinilo) y que lleva al menos un grupo alquilo (en especial metilo) o fenilo, en una posición lateral y/o terminal, con una organosilicona tal como un organohidrogenopolisiloxano;
- tensioactivos, preferentemente tensioactivos emulsionantes, bien no aniónicos, aniónicos, catiónicos o anfóteros, y en particular ésteres de ácido graso de polioles tales como ésteres de ácido graso y glicerol, ésteres de ácido graso y sorbitán, ésteres de ácido graso de polietilenglicol y ésteres de ácido graso de sacarosa; éteres de alquilo graso de polietilenglicol; alquilpoliglucósidos; poliéteres modificados con polisiloxano; betaína y derivados de la misma; policuaternios; sales de sulfato de alquilo graso etoxiladas; sulfosuccinatos; sarcosinatos; fosfatos de alquilo y dialquilo; y sales de los mismos; y jabones de ácidos grasos.
- cotensioactivos tales como alcoholes grasos lineales y, en particular, alcohol cetílico y alcohol estearílico;
- agentes espesantes y/o gelificantes, y en particular homopolímeros y copolímeros hidrófilos o anfifílicos reticulados o no reticulados, de ácido acrilometilpropanosulfónico (AMPS) y/o de acrilamida y/o de ácido acrílico y/o de sales o ésteres de ácido acrílico; goma de xantano o goma guar; derivados de celulosa; y gomias de silicona (dimeticonol);
- agentes de identificación sistemática orgánicos, tales como derivados de dibenzoilmetano (que incluyen butilmetoxidibenzoilmetano), derivados del ácido cinámico (que incluyen metoxicinamato de etilhexilo), salicilatos, ácidos para-aminobenzoicos, acrilatos de β,β' -difenilo, benzofenonas, derivados de bencilidenalcanfor, fenilbencimidazoles, triazinas, fenilbenzotriazoles y derivados antranílicos;
- agentes de identificación sistemática inorgánicos, formados por óxidos minerales en forma de pigmentos o nanopigmentos revestidos o sin revestir, y en particular los formados por dióxido de titanio u óxido de cinc;
- colorantes;
- agentes conservantes;
- agentes quelantes tales como sales de EDTA;
- fragancias;
- y mezclas de los mismos, sin que esta lista sea limitante.

Ejemplos de tales adyuvantes se mencionan especialmente en el diccionario de CTFA (International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook publicado por The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 11ª edición, 2006), que describe una amplia variedad, sin limitación, de ingredientes cosméticos y farmacéuticos usados normalmente en la industria del cuidado de la piel, que son idóneos para uso como ingredientes adicionales en las composiciones de acuerdo con la presente invención.

La composición también puede comprender al menos un compuesto con un efecto óptico tal como cargas, pigmentos, nácares, agentes tensores y polímeros de efecto mate, y mezclas de los mismos.

El término "cargas" se debería entender como que se refiere a partículas incoloras o de color blanco, minerales o sintéticas, laminares o no laminares adecuadas para dar cuerpo o rigidez y/o suavidad a la composición, un efecto mate y uniformidad inmediatamente cuando se aplica. Las cargas que se pueden mencionar especialmente incluyen talco, mica, sílice, caolín, polvos de Nylon® tales como Nylon-12 (Orgasol® comercializado por la compañía Atochem), polvos de polietileno, polvos de poliuretano, polvos de poliestireno, polvos de poliéster, almidón opcionalmente modificado, microperlas de resina de silicona tales como las comercializadas por la compañía Toshiba con el nombre comercial Tospearl®, hidroxapatita, y microesferas de sílice huecas (Silica Beads® de la compañía Maprecos).

El término "pigmentos" se debería entender que se refiere a partículas de color blanco o coloreadas, minerales u orgánicas que son insolubles en el medio, que están destinadas a colorear y/o dar opacidad a la composición. Pueden ser de tamaño estándar o nanométrico. Entre los pigmentos minerales que se pueden mencionar se encuentran el dióxido de titanio, dióxido de circonio y dióxido de cerio, y también óxido de cinc, óxido de hierro y óxido de cromo.

El término "nácares" se debería entender que se refiere a partículas iridiscentes que reflejan la luz. Entre los nácares que se pueden contemplar, se puede hacer mención a madreperla natural, mica revestida con óxido de titanio, con óxido de hierro, con pigmento natural o con oxiclورو de bismuto, y también mica coloreada con titanio.

La concentración de la masa en la fase acuosa de estas cargas y/o pigmentos y/o nácares por los generales de un 0,1 % a un 20 % y preferentemente de un 0,2 % a un 7 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La expresión "agente tensor" se debería entender que se refiere a un compuesto adecuado para dar firmeza a la piel y, por medio de este efecto de tensión, suavizar la piel y reducir o incluso eliminar inmediatamente arrugas y líneas

finas de la misma. Los agentes tensores que se pueden mencionar incluyen polímeros de origen natural. La expresión "polímero de origen natural" se refiere a polímeros de origen vegetal, polímeros derivados de tegumentos, proteínas de huevo o látex de origen natural. Estos polímeros son preferentemente hidrófilos. Los polímeros de origen vegetal que se pueden mencionar en especial incluyen proteínas e hidrolizados de proteína, y más particularmente extractos de cereales, de legumbres y de plantas que producen aceite, tales como extractos de maíz, de centeno, de trigo, de trigo sarraceno, de sésamo, de espelta, de guisante, de judía, de lenteja, de abades soja y altramuz. Los polímeros sintéticos generalmente se presentan en forma de un látex o un pseudolátex y pueden ser de tipo policondensado o se pueden obtener mediante polimerización de radicales libres. Se puede hacer mención en especial a las dispersiones de poliéster/poliuretano y de poliéter/poliuretano. Preferentemente, el agente tensor es un copolímero de PVP/acrilato de dimeticonilo y de poliuretano hidrófilo (Aquamere S-2001® de la compañía Hydromer).

La expresión "polímeros de efecto mate" en el presente documento hace referencia a cualquier polímero en solución, en dispersión o en forma de partículas, que reduce el brillo de la piel y que unifica la complejión. Ejemplos que se pueden mencionar incluyen elastómeros de silicona; partículas de resina; y mezclas de los mismos. Ejemplos de elastómeros de silicona que se pueden mencionar incluyen los productos comercializados con el nombre KSG® de la compañía Shin-Etsu, con el nombre comercial Trefil®, BY29® o EPSX® de la compañía Dow Corning o con el nombre comercial Gransil® de la compañía Grant Industries.

La composición usada de acuerdo con la invención también puede comprender agentes activos distintos del inhibidor de micro-ARN, y en particular al menos un agente activo elegido entre: agentes que estimulan la producción de factores de crecimiento; agentes de antiglicación o desglucación; agentes que aumentan la síntesis de colágena o que impiden su degradación (agentes anticologenasa y especialmente inhibidores de la metaloproteasa de la matriz); agentes que aumentan la síntesis de elastina coinciden su degradación (agentes antielastasa); agentes que estimulan la síntesis de la integrina o de componentes de adhesión focal tales como tensina; agentes que aumentan la síntesis de glicosaminoglicanos o proteoglicanos o que impiden su degradación (agentes antiproteoglicanasa); agentes que aumentan la proliferación de fibroblastos; agentes de despigmentación o antipigmentación; antioxidantes o neutralizantes de radicales libres o agentes antipolución; y mezclas de los mismos, sin que esta lista sea limitante.

Ejemplos de tales agentes son en especial: extractos vegetales y en particular extractos de *Chondrus crispus*, de *Thermus thermophilus*, de *Pisum sativum* (Proteasyl® TP LS), de *Centella asiatica*, de *Scenedesmus*, de *Moringa pterygosperma*, de avellano, de *Castanea sativa*, de *Hibiscus sabdriffa*, de *Polianthes tuberosa*, de *Argania spinosa*, de *Aloe vera*, de *Narcissus tazetta*, o de regaliz; un aceite esencial de *Citrus aurantium* (Neroli); α -hidroxiácidos tales como ácido glicólico, ácido láctico y ácido cítrico, y ésteres de los mismos; β -hidroxiácidos tales como ácido salicílico y derivados de los mismos; hidrolizados de proteínas vegetales (en especial de soja o de avellana); oligopéptidos acilados (comercializados en especial por la compañía Sederma con los nombres comerciales Maxilip®, Matrixyl® 3000, Biopeptide® CL o Biopeptide® EL); extractos de levadura y en particular de *Saccharomyces cerevisiae*; extractos de algas y en particular de laminaria; vitaminas y derivados de las mismas tales como palmitato de retinilpoco, ácido ascórbico, glucósido de ascorbilo, fosfato de ascorbilo y de magnesio o sodio, palmitato de ascorbilo, tetraisopalmitato de ascorbilo, sorbato de ascorbilo, tocoferol, acetato de tocoferilo y sorbato de tocoferilo; arbutina; ácido kójico; ácido elágico; y mezclas de los mismos.

Como una variante o además, la composición usada de acuerdo con la invención puede comprender al menos un inhibidor de la elastasa (anti-elastasa), tal como un extracto de semillas de *Pisum sativum* que se comercializa especialmente en la compañía Laboratoires Sérobiologiques/Cognis France con el nombre comercial Proteasyl TP LS®.

La composición también puede contener aditivos inertes o combinaciones de estos aditivos, tales como agentes humectantes, estabilizantes, reguladores de la humedad, reguladores del pH, modificadores de la presión osmótica, o filtros de UV-A y UV-B.

Descripción de las figuras

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar el alcance de la misma. Estos ejemplos se basan en las figuras que se indican a continuación:

Figura 1

Inducción de senescencia replicativa en fibroblastos dérmicos humanos. (A) Duplicaciones de la población de fibroblastos humanos primarios durante 103 días de cultivo. Después de 70 duplicaciones de la población, la curva de crecimiento presenta una meseta, que muestra que las células dejan de dividirse y están alcanzando el estado senescente. (B) Transferencias de Western realizadas en extractos de proteínas de fibroblastos humanos en el pasaje 1(p1), p4, p8 y p16 que muestran el análisis de algunos marcadores de senescencia, tales como sirt1 y p16. Se usó β -actina como control de carga. (C) Los fibroblastos humanos en p1, p4, p8 y p16 se sometieron a un pulso de BrdU de 3 h, se recogieron, se tiñeron con yoduro de propidio (PI), y se analizaron citometría de flujo. Las células positivas para BrdU se indican como población fluorescente en fase S y se

evalúan mediante tinción con PI del contenido de ADN de 2n o 4n (fijado a valores de 250 y 400 en las representaciones). (D y E) Tinción y cuantificación de la SA- β -galactosidasa mediante célula azul/campo de fibroblastos en p1, p4, p8 y p12.

5 **Figura 2**
Expresión de miR-134 en senescencia replicativa de fibroblastos. La cuantificación relativa de miR-134 mediante PCR en Tiempo Real se realizó en los ARN totales recogidos de fibroblastos p1 en proliferación, p11 presenescentes y p16 senescentes.

10 **Figura 3**
Expresión de miR-152 en senescencia replicativa de fibroblastos. La cuantificación relativa de miR-134 mediante PCR en Tiempo Real se realizó en los ARN totales recogidos de fibroblastos p1 en proliferación, p11 presenescentes y p16 senescentes.

15 **Figura 4**
MiR-134 y miR-152 reducen la proliferación en fibroblastos después de la transfección en fibroblastos en proliferación/jóvenes.

(A) Noventa y seis horas después de la transfección de fibroblastos con las secuencias de miR-134 o miR-152, un control negativo, las células se sometieron a un pulso de BrdU de 3 h, se recogieron, se tiñeron con PI, y se analizaron mediante citometría de flujo tal como se describe en la Figura 1.

20 (B) Cuantificación de fibroblastos positivos para BrdU después de la transfección con las secuencias de miR-134 y miR-152, control negativo.

25 **Figura 5**
MiR-134 y miR-152 inducen la senescencia en fibroblastos después de la transfección en fibroblastos en proliferación/jóvenes.

(A y B) Tinción y cuantificación de la SA- β -galactosidasa mediante célula azul/campo de fibroblastos noventa y seis horas después de la transfección con las secuencias de miR-134 y miR-152, de control negativo.

30 **Figura 6**
ITGA9 es una supuesta diana de miR-134 y miR-152 y disminuye en la senescencia replicativa de fibroblastos. (A) Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de mRNA de ITGA9 en p1 y p16, (B) Se identificaron los sitios diana predichos de miR-134 y miR-152 en 3'UTR de ITGA9 con el software 6.1 de TargetScan. (C) Transferencias de Western realizadas en extractos de proteínas de fibroblastos en p1 y p16 que muestran el nivel de proteínas de ITGA9. Se usó β -Actina como control de carga.

35 **Figura 7**
El mRNA de ITGA9 está regulado de forma negativa después de la transfección de miR-134 y miR-152 en fibroblastos. Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de mRNA de ITGA9 de fibroblastos noventa y seis horas después de la transfección con las secuencias de miR-134 y miR-152, de control negativo.

40 **Figura 8**
ITGA5 es una supuesta diana de miR-152 y disminuye en la senescencia replicativa de fibroblastos. (A) Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de ARNm de ITGA5 RNA en p1 y p16. (B) Se identificaron los sitios diana predichos de miR-152 en 3'UTR de ITGA con el software 6.1 de TargetScan. (C) Transferencias de Western realizadas en extractos de proteínas de fibroblastos en p1 y p16 que muestran el nivel de proteínas de ITGA5. Se usó β -Actina como control de carga.

45 **Figura 9**
ITGA5 está regulado de forma negativa después de la transfección de miR-152 en fibroblastos. (A) Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de ARNm de ITGA5 de fibroblastos noventa y seis horas después de la transfección con control negativo y secuencias de miR-152. (B) Transferencias de Western realizadas en extractos de proteína de fibroblastos noventa y seis horas después de la transfección con control negativo, secuencias de miR-152 y anti-miR 152 que muestran el nivel de proteína de ITGA5. Se usó β -actina como control de carga.

50 **Figura 10**
Inhibición de miR-134 usando antagomiR específico en fibroblastos. Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de miR-134 noventa y seis horas después de la transfección de fibroblastos con control negativo y secuencias de anti-miR-134.

55 **Figura 11**
Inhibición de miR-152 usando antagomiR específico en fibroblastos. Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de miR-152 noventa y seis horas después de la transfección de fibroblastos con control negativo y secuencias de anti-miR-152.

Figura 12

Inhibición de miR-134 por el compuesto 4 y 5. Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de miR-134 cuarenta y ocho horas después del tratamiento de fibroblastos con control negativo y los compuestos 4 o 5 en diferentes concentraciones.

Figura 13

Inhibición de miR-152 por los compuestos 2, 4 y 8. Cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de miR-152 cuarenta y ocho horas después del tratamiento de fibroblastos con control negativo y los compuestos 2, 4 o 8 en diferentes concentraciones.

Descripción detallada de la invención**Ejemplo 1****Materiales y métodos****Cultivo celular y Transfección**

Fibroblastos Dérmicos Primarios Humanos Neonatales (HDFn, Cascade, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) se cultivaron en medio 106 al que se añaden suplementos de crecimiento de LSGS (Cascade). Las células se pasaban normalmente una vez a la semana, en cada pasaje se registraba el número de células cosechadas y el número de células sembradas con el fin de calcular las duplicaciones de la población producidas entre pasajes y el tiempo de duplicación de la población. En cada pasaje, se cosecharon diferentes alícuotas de las células para extraer ARN por triplicado y proteínas y una alícuota se sometió a tinción de β -galactosidasa activada por senescencia para someter a ensayo el estado de senescencia o de no senescencia de las células.

Los fibroblastos primarios humanos se transfectaron con pre-miR 134, anti-miR-134, pre-miR-152, anti-miR-152 y secuencia de codificación, humanos, como control negativo (Ambion, Texas, USA) usando el reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos del fabricante. 24 horas después de la transfección, el medio se retiró y se sustituyó con medio recién preparado.

Se sembraron 400.000 fibroblastos primarios humanos en medio 106 al que se añadieron suplementos de crecimiento de LSGS y se trataron con compuestos de ensayo. Después de 24 y 48 horas las células se recogieron y el ARNm se extrajo siguiendo procedimientos convencionales. Se realizó PCR en tiempo real tal como se describe a continuación.

Extracción de ARN y análisis de PCR en Tiempo Real

Se aisló ARN total de células usando el Kit de Aislamiento mirVana mirRNA (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante para extracción de ARN total. El ARN total se cuantificó usando un Espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA) y la calidad del ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se transcribió de forma inversa usando el kit de Transcripción Inversa de MicroARN de TaqMan y se realizó qRT-PCR con mezcla maestra universal de TaqMan (Applied Biosystem) y se usaron cebadores específicos para miR-134 y miR-152, y se usó U18 como un control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y de miR se definió a partir del ciclo del umbral (Ct), y los niveles de expresión relativa se calcularon usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ después de normalización con referencia a la expresión del gen constitutivo U18.

Tinción de β -Galactosidasa Asociada a la Senescencia

Las células se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2 %/glutaraldehído al 0,2 % en PBS durante 5 minutos. Después de otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con solución de tinción de β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de $MgCl_2$, 5 mmol/l de ferricianuro potásico, 5 mmol/l de ferrocianuro potásico, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato sódico, pH 6,0, que contenía 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactosidasa [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo por sustitución de la solución de tinción con glicerol al 70 %.

Proliferación celular y análisis del ciclo celular

Los métodos usados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de timidina tales como 3H timidina o bromodesoxiuridina (BrdU) durante la síntesis del ADN. El kit de ensayo de citometría de flujo de EdU Click-iT™ es una nueva alternativa para el ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Este método sustituye la detección basada en anticuerpo del análogo de nucleósido, BrdU, con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo de nucleósido de timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. En resumen, las células se incubaron con EdU durante 4 h. Después de la incubación, las muestras se fijaron, se penalizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó usando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Se evaluaron quince mil sucesos usando

los programas Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

Bioinformática

- 5 Se realizaron análisis de sitios diana de miR-134 y miR-152 en 3'UTR de ITGA9 usando software 5.1 de TargetScan disponible en <http://www.targetscan.org/>

Transferencia de Western

- 10 Se resolvieron extractos celulares totales en un gel de poliacrilamida de SDS, se transfirieron a una membrana de PVDF de Hybond P (G&E Healthcare, UK). Las membranas se bloquearon con leche seca desnatada con PBST al 5 %, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a temperatura ambiente, se taparon y se hibridaron durante 1 h a temperatura ambiente usando el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante apropiado (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, USA). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia de ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Se usaron anti-Sirt1 (Abcam; dilución a 1:500), anti- β actina (Sigma, St Louis, Minnesota, USA; dilución a 1:5000), anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA; dilución a 1:1000), anti-ITGA9 (Sigma, St Louis, Minnesota, USA; dilución a 1:400).

Resultados

- 20 **1- Establecimiento de un modelo para senescencia replicativa en fibroblastos humanos primarios.** Los fibroblastos primarios humanos se cultivaron y se pasaron en serie hasta que alcanzaron el estado senescente. La Figura 1A muestra las duplicaciones de la población de fibroblastos humanos primarios durante 103 días de cultivo. Después de 70 duplicaciones de la población (pasaje 16 - p16) la curva de crecimiento tiene una meseta, lo que muestra que las células detienen la división y están alcanzando el estado senescente. Las células se recogieron en p1, p4, p8 y p16 para realizar análisis de transferencia de western de p16/INK4a y Sirt-1. La disminución de la expresión de Sirt-1 y los niveles crecientes de p16/INK4a muestran que las células están entrando en el estado de senescencia replicativa. Los niveles de proteína β -actina se informan como un control de carga (Figura 1A y 1B). El porcentaje de células en proliferación está disminuyendo durante la senescencia tal como se muestra con el porcentaje de fibroblastos humanos primarios positivos para BrdU en diferentes pasajes (Figura 1C). Los fibroblastos humanos primarios experimentan senescencia replicativa después del pasaje 16 en las 70 duplicaciones de la población. Las fotomicrografías de tinción de SA- β -galactosidasa en fibroblastos humanos primarios a diferentes pasajes muestran la expresión del marcador senescente en células de más tiempo. Las células que expresan SA- β -galactosidasa muestran una tinción de color azul oscuro (Figura 1D), la cuantificación de la tinción se muestra en la Figura 1E.

- 35 **2- Niveles de miR-134 en fibroblastos en senescencia.** En p1, p11 y p16, se recogieron células para realizar PCR en tiempo Real. La cuantificación relativa de los niveles de miR-134 entre p1 y p16 muestra un aumento significativo en la expresión de miR-134 en fibroblastos senescentes: en p16, la expresión de miR-134 es de aproximadamente 5,35 (\pm 0,08) más elevada que su expresión en p1 (que es igual a 1,00 \pm 0,05), Figura 2. Por lo tanto, el estado senescente de los fibroblastos, pero no el estado de proliferación de fibroblastos, está asociado con un aumento de la expresión de miR-134.

- 40 **3- Niveles de miR-152 en fibroblastos en senescencia.** En p1, p11 y p16, se recogieron células para realizar PCR en tiempo Real. La cuantificación relativa de los niveles de miR-152 entre p1 y p16 muestra un aumento significativo en la expresión de miR-152 en fibroblastos senescentes: en p16, la expresión de miR-152 es de aproximadamente 3,37 (\pm 0,09) más elevada que su expresión en p1 (que es igual a 1,00 \pm 0,07), Figura 3. Por lo tanto, el estado senescente de los fibroblastos, pero no el estado de proliferación de fibroblastos, está asociado con un aumento de la expresión de miR-152.

- 45 **4- miR-134 y miR-152 reducen la proliferación en fibroblastos después de la transfección en fibroblastos en proliferación/jóvenes.** Noventa y seis horas después de la transfección de fibroblastos dérmicos humanos con un control negativo, secuencias de miR-134 o miR-152, las células se sometieron a un pulso de BrdU de 3 h, se recogieron, se tiñeron con PI, y se analizaron mediante citometría de flujo tal como se describen los métodos. El porcentaje de células en proliferación disminuye después de la transfección de miR-134 y miR-152 tal como se muestra con el porcentaje positivo de BrdU de fibroblastos humanos primarios tras estados con control negativo (26 %), miR-134 (19 %) y miR-152 (18 %), Figura 4 A y 4B.

- 50 **5- miR-134 y miR-152 inducen senescencia en fibroblastos después de la transfección en fibroblastos en proliferación/jóvenes.** Después de la transfección con miR-134 y miR-152, la tinción de SA- β -galactosidasa aumento de forma significativa en fibroblastos, lo que demuestra que estos dos miARN son suficientes *per se* para inducir la senescencia (Figura 5A). la cuantificación de célula azul/campo de fibroblastos dérmicos humanos, noventa y seis horas después de transfección, indica que la tinción de SA- β -galactosidasa aumenta con un índice de 4-4,5 en comparación con el control negativo (Figura 5B).

- 55 **6- ITGA9 es una diana tanto de miR-134 como de miR-152.** Los inventores han realizado cuantificación

relativa mediante PCR en Tiempo Real de mRNA de ITGA9 usando células en p1 y p16 (Figura 6A), los datos obtenidos muestran claramente que el mRNA de ITGA9 se reduce fuertemente en fibroblastos senescentes (p16). De hecho, la cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de mRNA de ITGA9 de fibroblastos dérmicos humanos noventa y seis horas después de la transfección indica que ITGA9 se reduce un 20 % y un 40 %, respectivamente, después de la transfección de miR-134 y miR-152. Esto es menos evidente a nivel de la proteína (Figura 6C) en la misma condición experimental, probablemente para la estabilidad elevada de la proteína de ITGA9. Usando el software de 6.1 de targetScan, los inventores han identificado en 3'UTR de ITGA9 dos sitios diana predichos, para miR-134 y miR-152. El mRNA de ITGA9 está regulado de forma negativa después de la transfección de miR-134 y miR-152 en fibroblastos tal como se indica en la Figura 7.

7- ITGA5 es una diana de miR-152. Los inventores han realizado cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real de mRNA de ITGA5 usando células en p1 y p16 (Figura 8A), los datos obtenidos muestran claramente que el mRNA de ITGA5 se reduce en fibroblastos senescentes (p16). De hecho, la cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de mRNA de ITGA5 de fibroblastos dérmicos humanos noventa y seis horas después de la transfección indica que ITGA5 se reduce un 30 %, después de la transfección de miR-152. está menos evidente a nivel de la proteína (Figura 8C) en la misma condición experimental. Usando el software de 6.1 de targetScan, los inventores han identificado en 3'UTR de ITGA5 dos sitios diana predichos, para miR-152. Después de la transfección, ITGA5 está regulado de forma negativa por miR-152 en fibroblastos tal como se muestra mediante la cuantificación relativa mediante PCR en Tiempo Real del nivel de mRNA de ITGA5 de fibroblastos humanos. Las transferencias de Western realizadas en extractos de proteína de fibroblastos humanos después de la transfección de miR-152 y anti-miR-152 mostró una disminución significativa de ITGA5. Se usó β -actina como control de carga.

8- Modulación de miR-134 mediante anti-miR-134 sintético. Los anti-miARN son inhibidores de miARN que inhiben de forma específica los miARN endógenos. Los anti-miARN son ácidos nucleicos monocatenarios diseñados para unirse de forma específica a e inhibir las moléculas de microARN endógeno. Los anti-miARN tienen secuencias de ácidos nucleicos complementarias con la secuencia del miARN diana. Estos inhibidores listos para usar se pueden introducir en células usando parámetros de transfección o electroporación similares a los usados para los siARN, y permiten el estudio detallado de los efectos biológicos del miARN. El uso del anti-miARN permite el análisis funcional de miARN mediante regulación negativa de la actividad del miARN. Los anti-miARN están disponibles en el mercado; se pueden obtener por ejemplo en Ambion o Applied Biosystems. Los fibroblastos humanos primarios se trataron con un anti-miR-134 en diferentes concentraciones. Después de 96 horas, las células se cosecharon para la cuantificación relativa de los niveles de miR-134 usando PCR en tiempo Real. El anti-miR-134 está regulando de forma negativa significativamente los niveles de miR-134 con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-134 en células tratadas es solamente $0,184 \pm 0,022$ (mientras que es $1,00 \pm 0,01$ para la codificación) (Figura 10).

9- Modulación de miR-152 mediante anti-miR-152 sintético. Los anti-miARN son inhibidores de miARN que inhiben de forma específica los miARN endógenos. Los anti-miARN son ácidos nucleicos monocatenarios diseñados para unirse de forma específica a e inhibir las moléculas de microARN endógeno. Los anti-miARN tienen secuencias de ácidos nucleicos complementarias con la secuencia del miARN diana. Estos inhibidores listos para usar se pueden introducir en células usando parámetros de transfección o electroporación similares a los usados para los siARN, y permiten el estudio detallado de los efectos biológicos del miARN. El uso del anti-miARN permite el análisis funcional de miARN mediante regulación negativa de la actividad del miARN. Los anti-miARN están disponibles en el mercado; se pueden obtener por ejemplo en Ambion o Applied Biosystems. Los fibroblastos humanos primarios se trataron con un anti-miR-152 en diferentes concentraciones. Después de 96 horas, las células se cosecharon para la cuantificación relativa de los niveles de miR-152 usando PCR en tiempo Real. El anti-miR-152 está regulando de forma negativa significativamente los niveles de miR-152 con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-152 respecto a las células sin tratar; la expresión de $0,325 \pm 0,032$ (mientras que es $1,00 \pm 0,01$ para la codificación) (Figura 11).

10- Inhibición de miR-134 por los compuestos 4 y 5. Los fibroblastos humanos primarios se trataron con los compuestos 4 y 5, respectivamente Galato de Epigallocatequina y Verbascósido, en la concentración indicada en la Figura 12. Después de 48 horas las células se cosecharon para la cuantificación relativa de los niveles de miR-134 usando PCR en tiempo Real. Los compuestos 4 y 5 están regulando de forma negativa significativamente los niveles de miR-134 con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-134 en células sin tratar es solamente $0,603 \pm 0,03$ y $0,734 \pm 0,05$ (mientras que es $1,00 \pm 0,01$ para la codificación) (Figura 12).

11- Inhibición de miR-152 por los compuestos 2, 4 y 8. Los fibroblastos humanos primarios se trataron con los compuestos 2, 4 y que 8, respectivamente Hidrato de Catequina, Galato de Epigallocatequina y Bosque de Ángel PFA, en la concentración indicada en la Figura 13, Después de 48 horas las células se cosecharon para la cuantificación relativa de los niveles de miR-152 usando PCR en tiempo Real. Los compuestos 2, 4 y 8 están regulando de forma negativa significativamente los niveles de miR-152 con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-152 en células tratadas es solamente $0,769 \pm 0,03$, $0,804 \pm 0,05$ y $0,314 \pm 0,04$ (mientras que es $1,00 \pm 0,01$ para la codificación) (Figura 13).

Ejemplo 2: Composición cosmética (suero de O/W)

El experto en la materia puede preparar la siguiente composición de una manera clásica.

5 El agente activo se prepara como sigue a continuación:

10 La madera de *Andira coriacea* (es decir Bosque de Ángel) se extrajo con etanol, proporcionando 386 mg de extracto en bruto después de la evaporación a presión reducida. El extracto en bruto se purificó a continuación por HPLC preparativa en fase inversa (C18 Varian Pursuit XRS, 250 mm x 4,1 mm x 5 µm) usando un gradiente de H₂O + ácido fórmico al 0,1 % y MeOH (a partir de H₂O + FA/MeOH de 70:30 a 60:40 en 17 min a 60 ml.min⁻¹) para proporcionar Coatline A puro (12,3 mg) y Coatline B (40,2 mg).

Nombre INCI	% (p/p)
Agua	CSP 100,00
Agente de quelación	0,05
Equilibrio de pH	0,05
Conservantes	0,05
Glicol	3,25
ACRILILDIMETILTAURATO DE AMONIO/COPOLÍMERO DE VP	1,20
ACRILATOS/CROSPOLÍMERO DE ACRILATO DE ALQUILO C10-30	0,20
GLICERINA	3,00
GLICERILPOLIMETACRILATO	4,18
HIALURONATO SÓDICO ACETILADO	0,05
Aceite	10,00
ALCOHOL	8,00
PERFUMES	0,30
Líneas de revestimiento obtenidas como se ha descrito anteriormente	0,05

Referencias

- 15 Serrano *et al.* (1997), Cell 88: 593-562
 Campisi (2001), Trends Cell Biol 11: S27-S31
 Schmitt *et al.* (2002) Cell 109: 335-346
 Narita *et al.* (2003), Cell 113: 703-706
 20 Sharpless *et al.* (2004) J Clin Invest 113: 160-168
 Grillari *et al.* (2010) Exp Gerontol 45: 302-311
 Hackl *et al.* (2010) Aging Cell 9: 291-296
 Lafferty-Whyte K *et al.* (2009) Biochim Biophys Acta 1792: 341-352
 He L *et al.* (2007) Nature 447: 1130-1134
 25 Maes OC *et al.* (2009) J Cell Physiol 221: 109-119
 Faraonio R *et al.* (2012) Cell Death Differ. 19 (4): 713-21
 Dhahbi *et al.* (2011) PLoS One. 6 (5): e20509
 Tsuruta *et al.* (2011) Cancer Research. 71 (20): 6450-62
 Huang *et al.* (2010) Hepatology. 52 (1): 60-70
 30 Quan T *et al.* (2009) J Invest Dermatol Symp Proc. 14 (1): 20-4
 Roy S *et al.* (2011) J Oral Pathol Med. 40 (10): 755-61

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> CHANEL PARFUMS BEAUTE
- <120> INHIBIDORES DE MICRO-ARN PARA USO PARA PREVENIR Y/O ATENUAR EL ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO
- 40 <130> BEP120376EP

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 1

ugugacuggu ugaccagagg gg 22

<210> 2

<211> 21

15

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

20

ucagugcaug acagaacuug g 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para identificar sistemáticamente compuestos candidatos para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, que comprende las siguientes etapas:
- a. poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una muestra de fibroblastos;
 - b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 en dichos fibroblastos;
 - c. seleccionar los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos tratados en a. en comparación con los fibroblastos sin tratar.
- 10
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa b. se realiza antes y después de la etapa a.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
- a'. preparar al menos dos muestras de fibroblastos;
 - a. poner una de las muestras en contacto con al menos un compuesto de ensayo; a continuación
 - b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN elegido entre miR-134 y miR-152 en dichas muestras; y
 - c. seleccionar los compuestos para los que una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la expresión o una inhibición de al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de la actividad de al menos un microARN se mide en los fibroblastos tratados en a. en comparación con la muestra de fibroblastos sin tratar.
- 20
- 25
- 30 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dichos fibroblastos son fibroblastos presenescentes.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** los fibroblastos presenescentes se obtienen después de 70 duplicaciones de la población en condiciones de cultivo clásicas.
- 35 6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** las condiciones de cultivo clásicas comprenden un cultivo de los fibroblastos en medio 106 al que se añaden suplementos de crecimiento de LSGS, y se mantiene constantemente en un estado de subconfluencia.
- 40 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** los compuestos de ensayo se eligen entre extractos botánicos.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** la inhibición de la expresión o de la actividad del microARN medido en la etapa c. es de al menos un 50 %, preferentemente de al menos un 60 %.

Figura 1

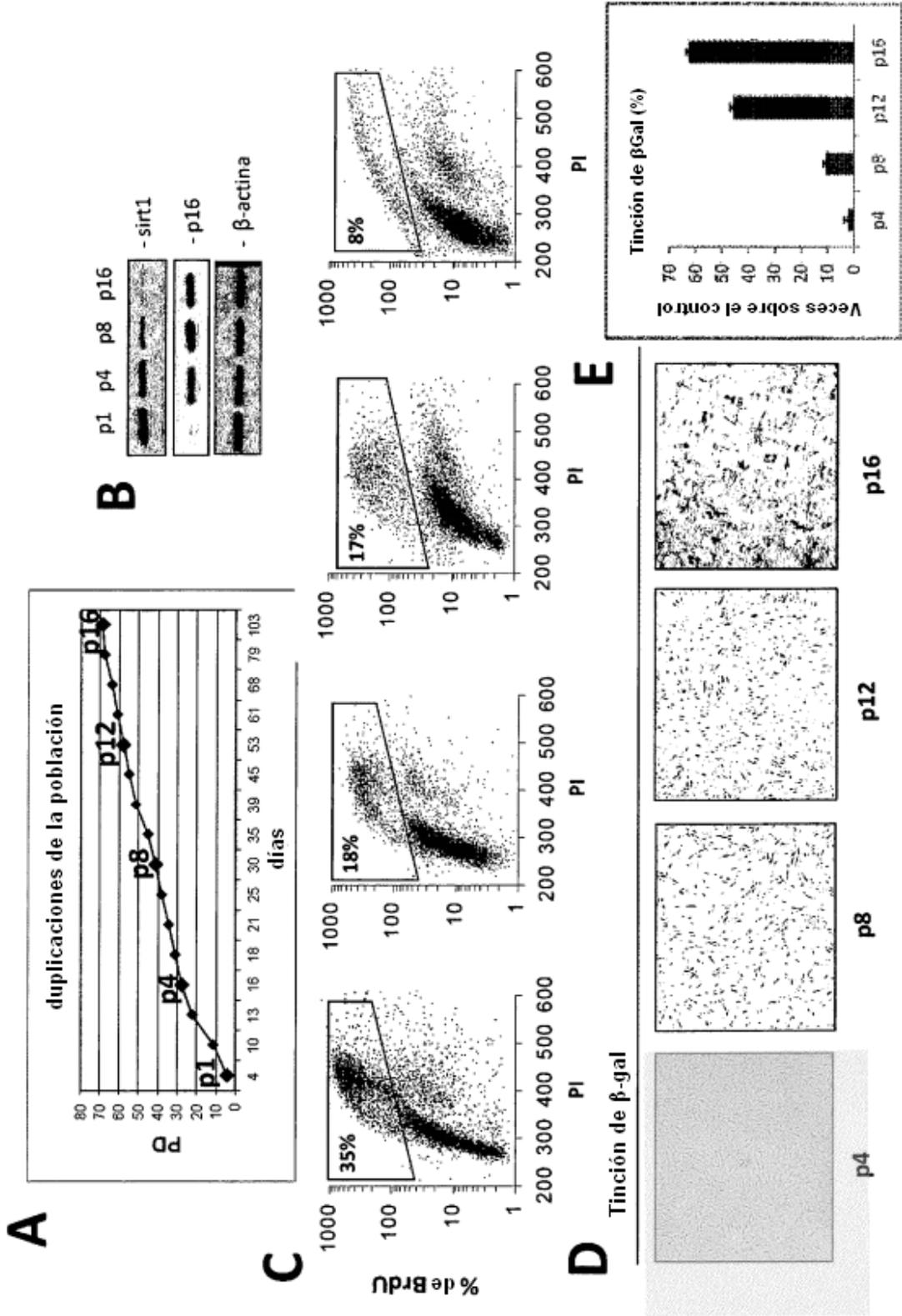


Figura 2

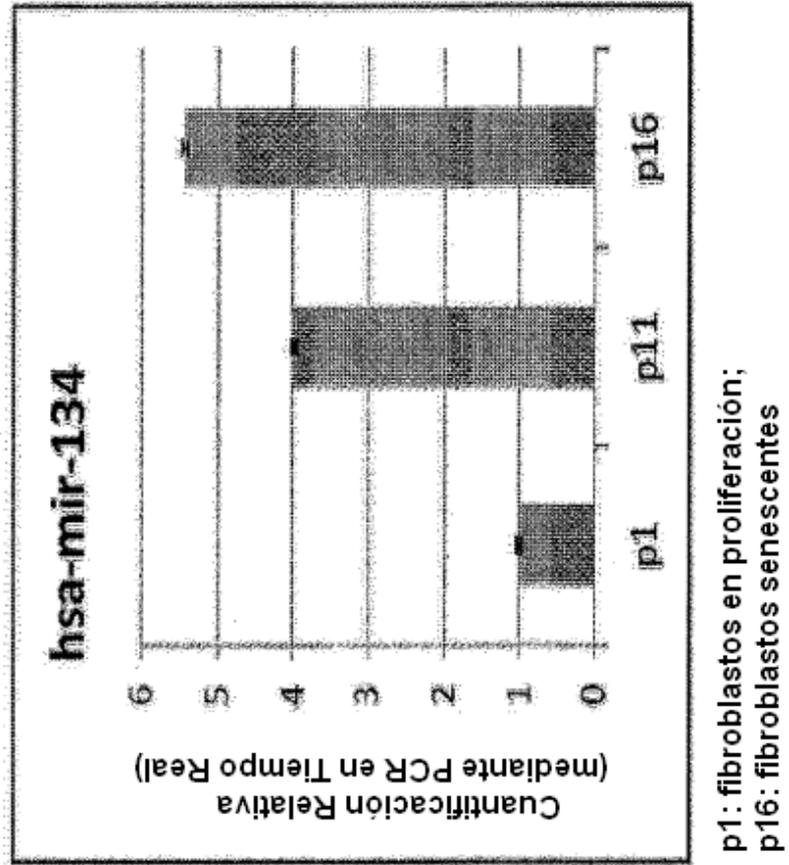


Figura 3

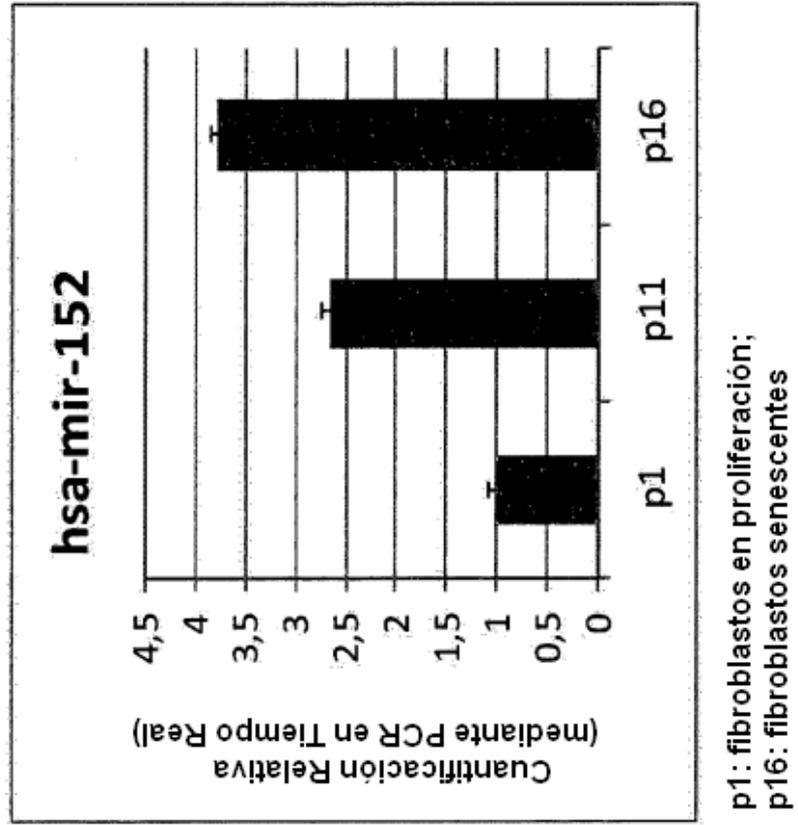


Figura 4

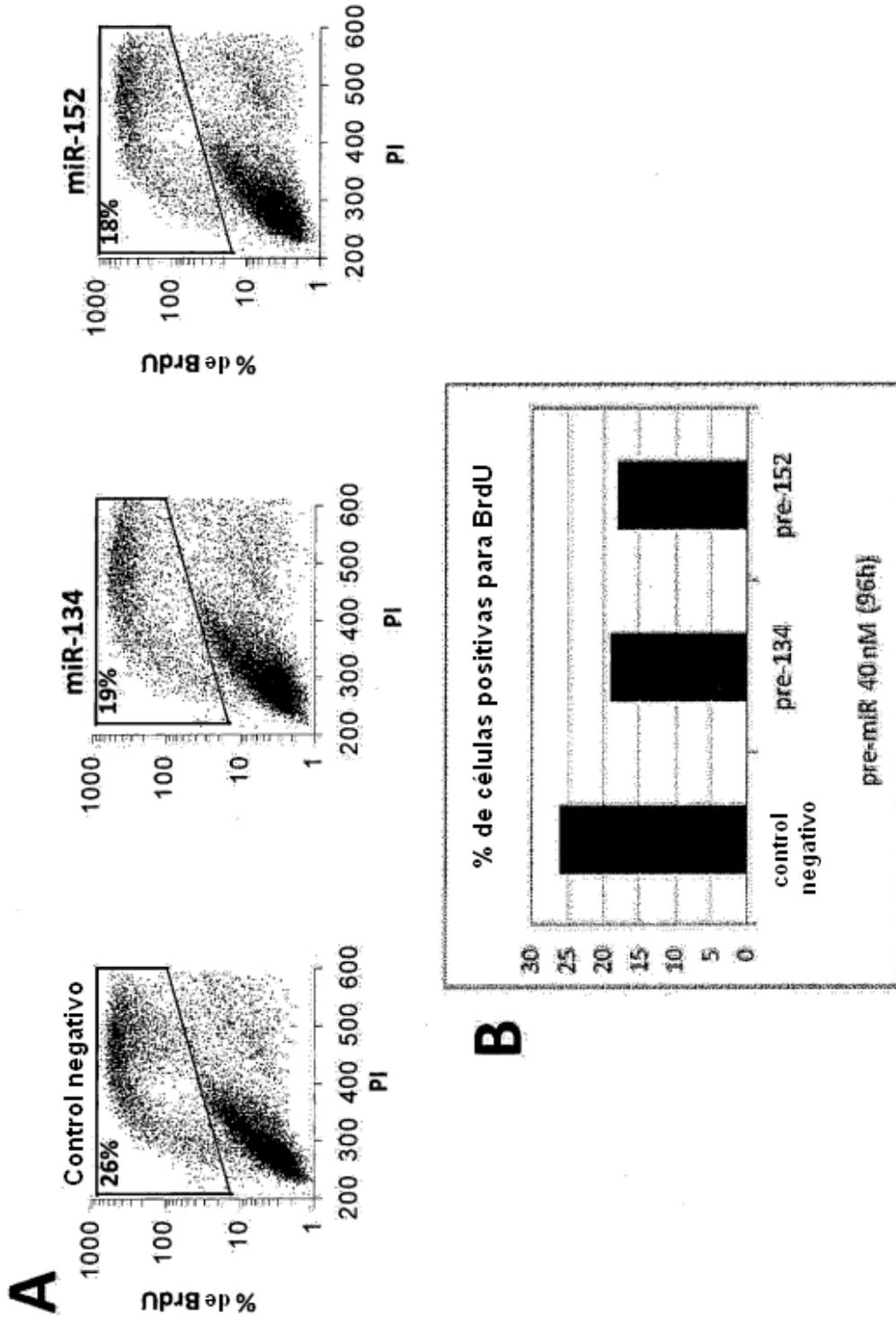


Figura 5

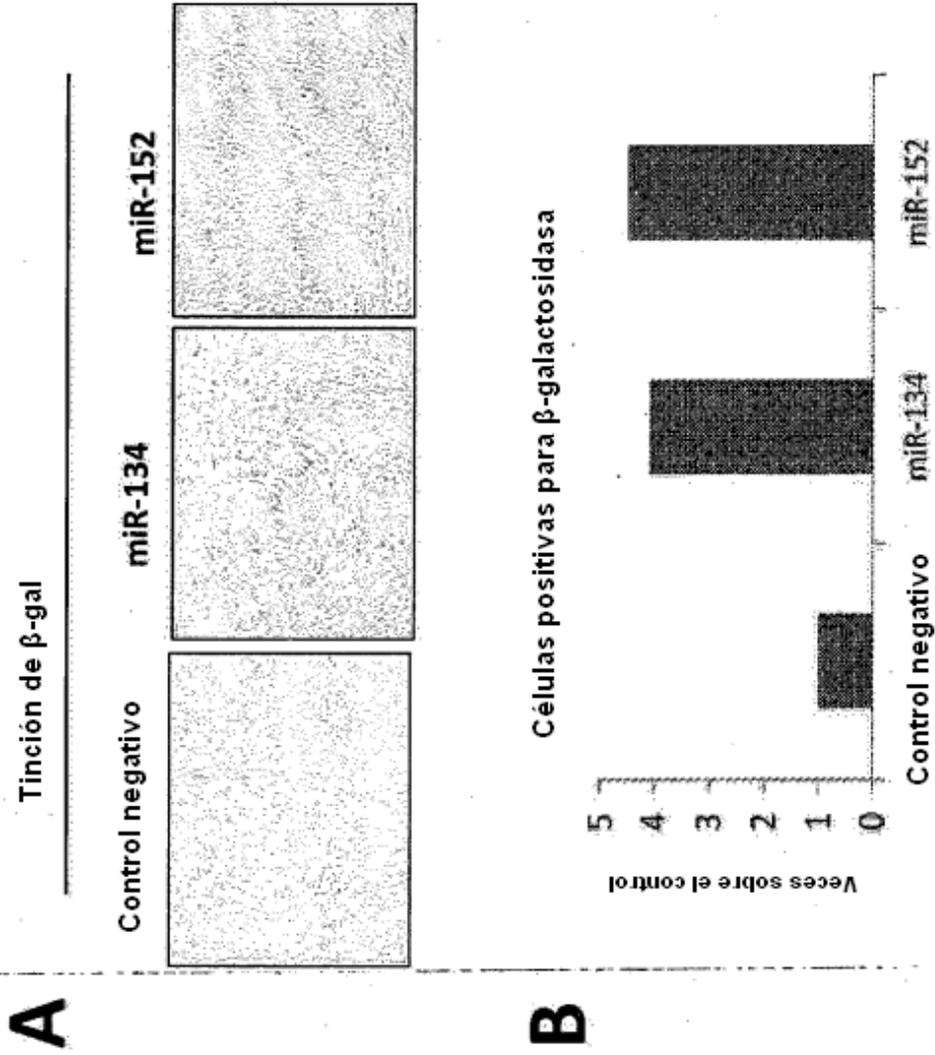


Figura 6

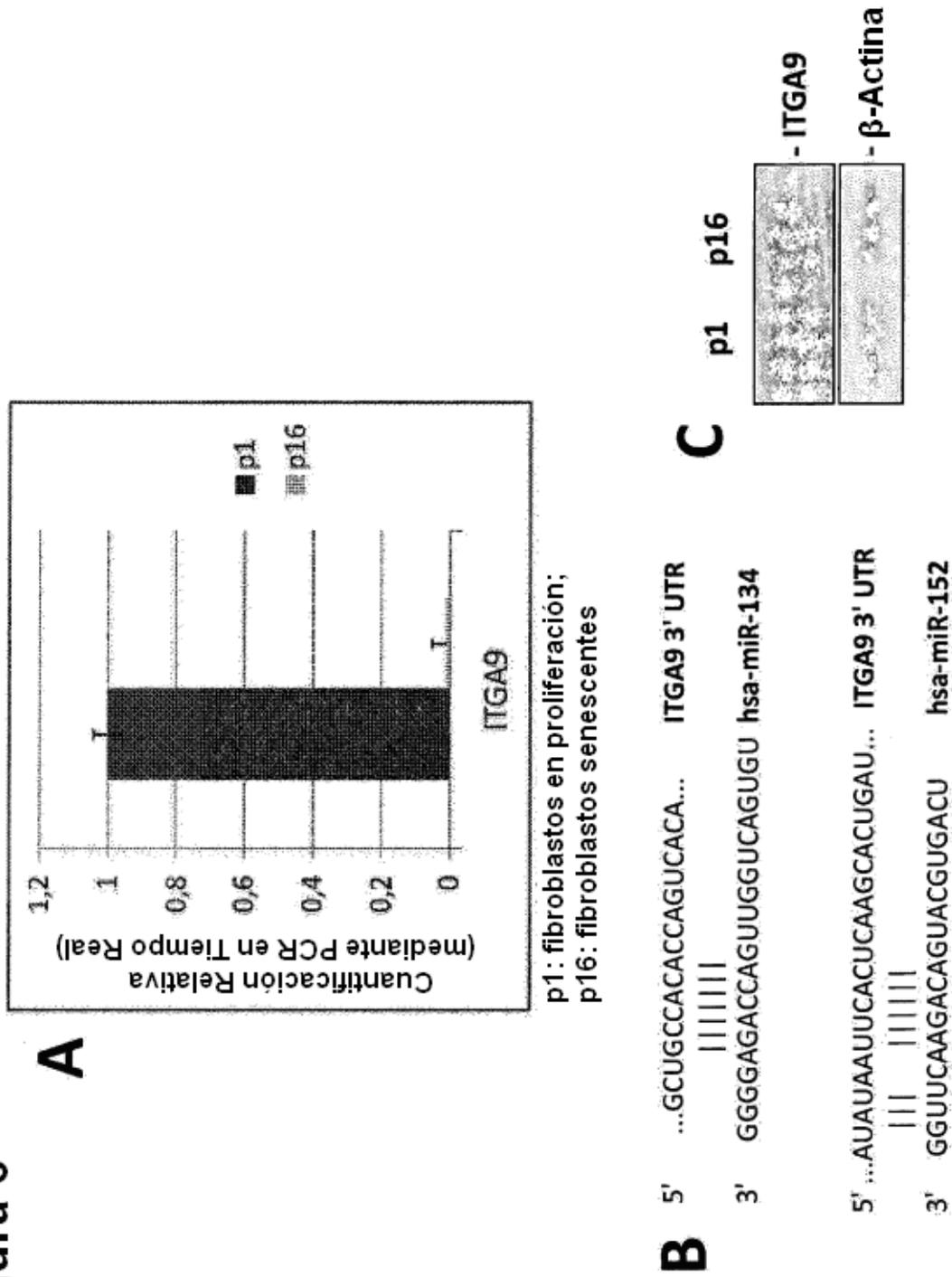


Figura 7

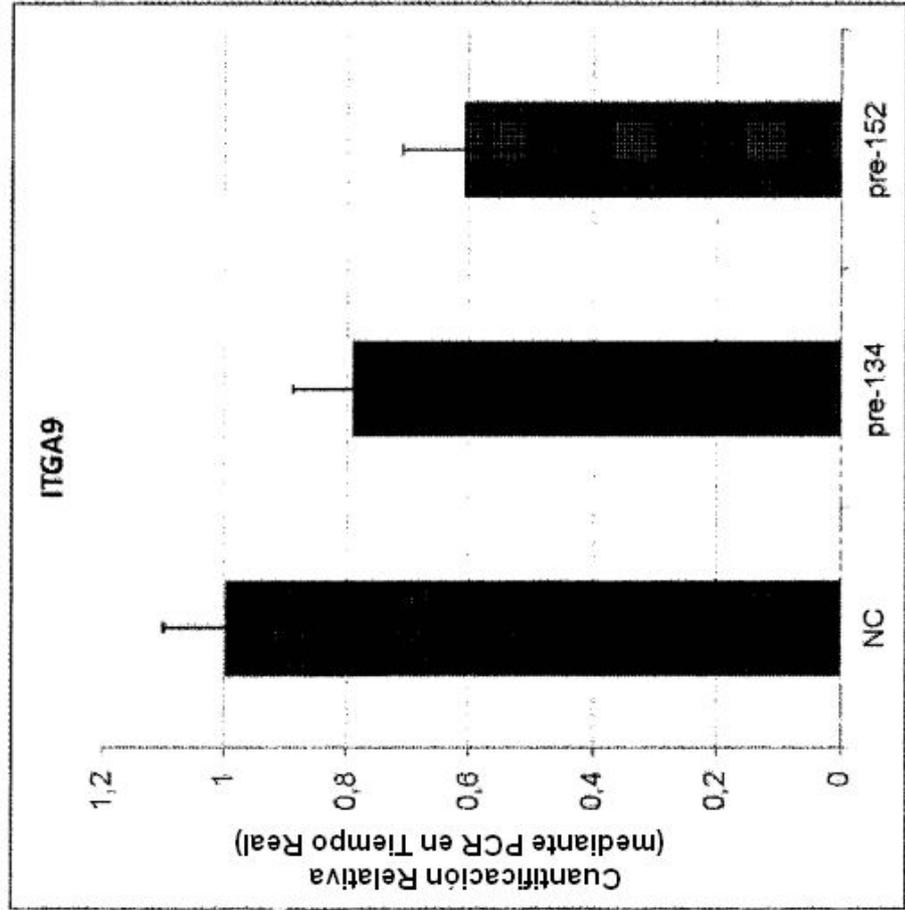


Figura 8

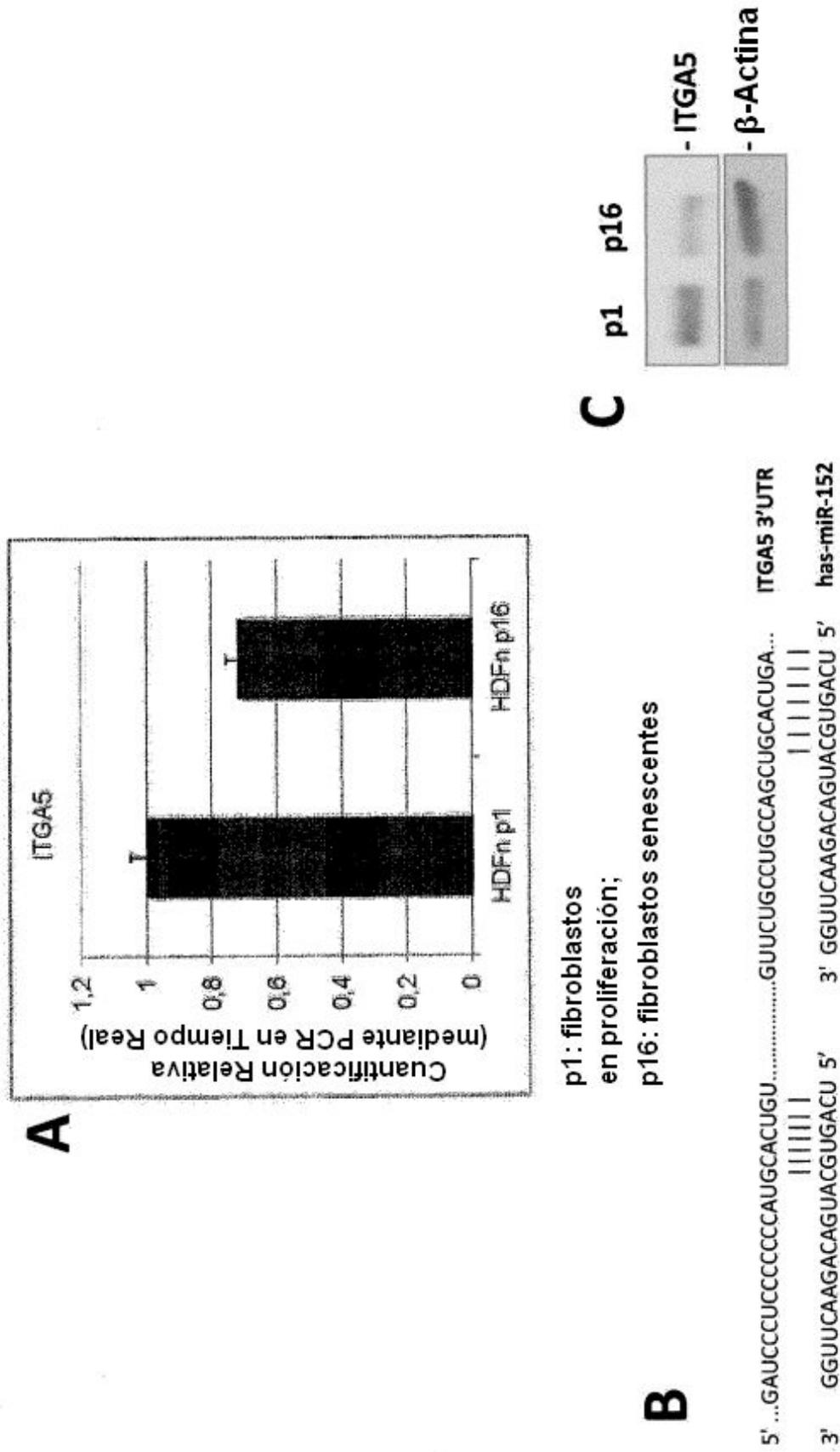


Figura 9

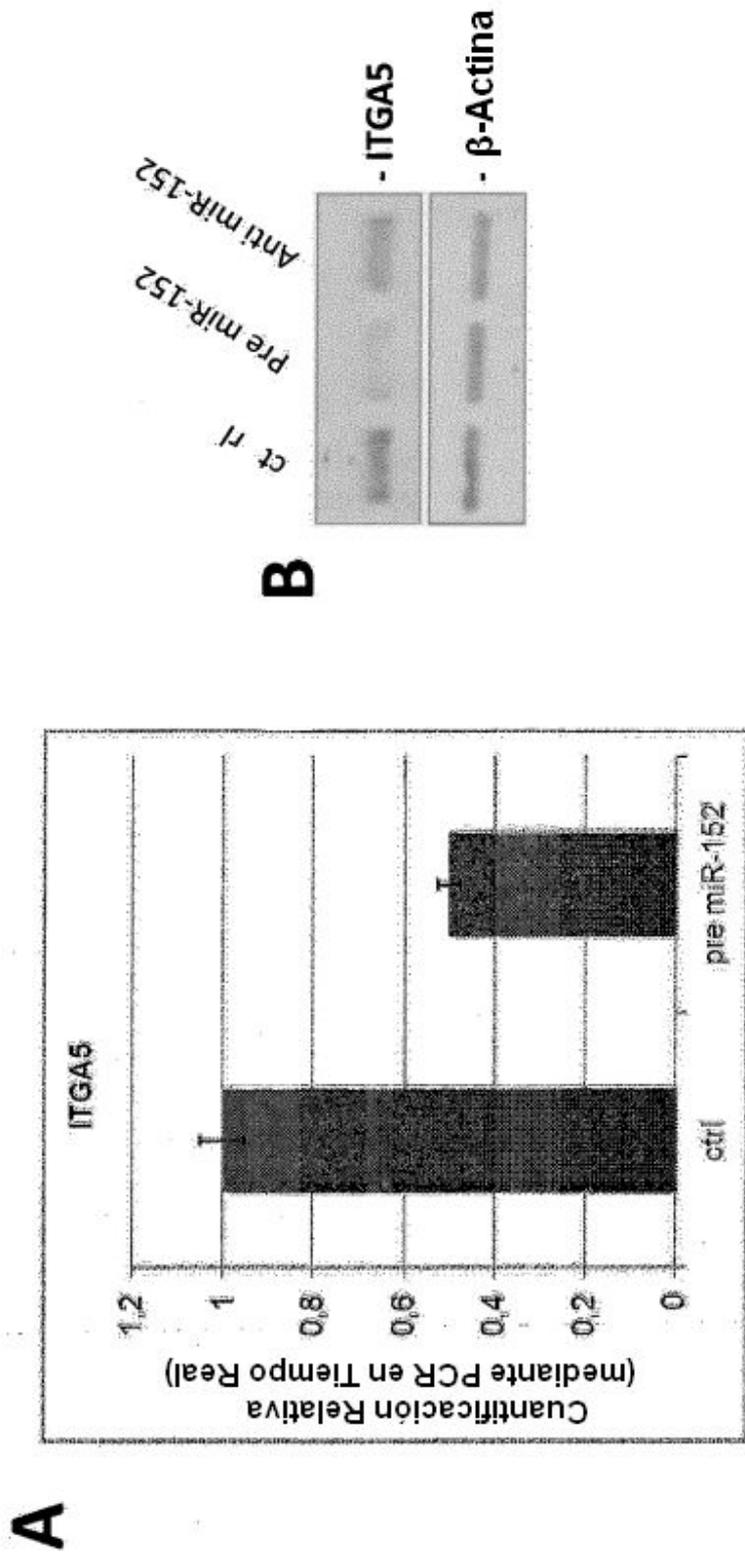


Figura 10

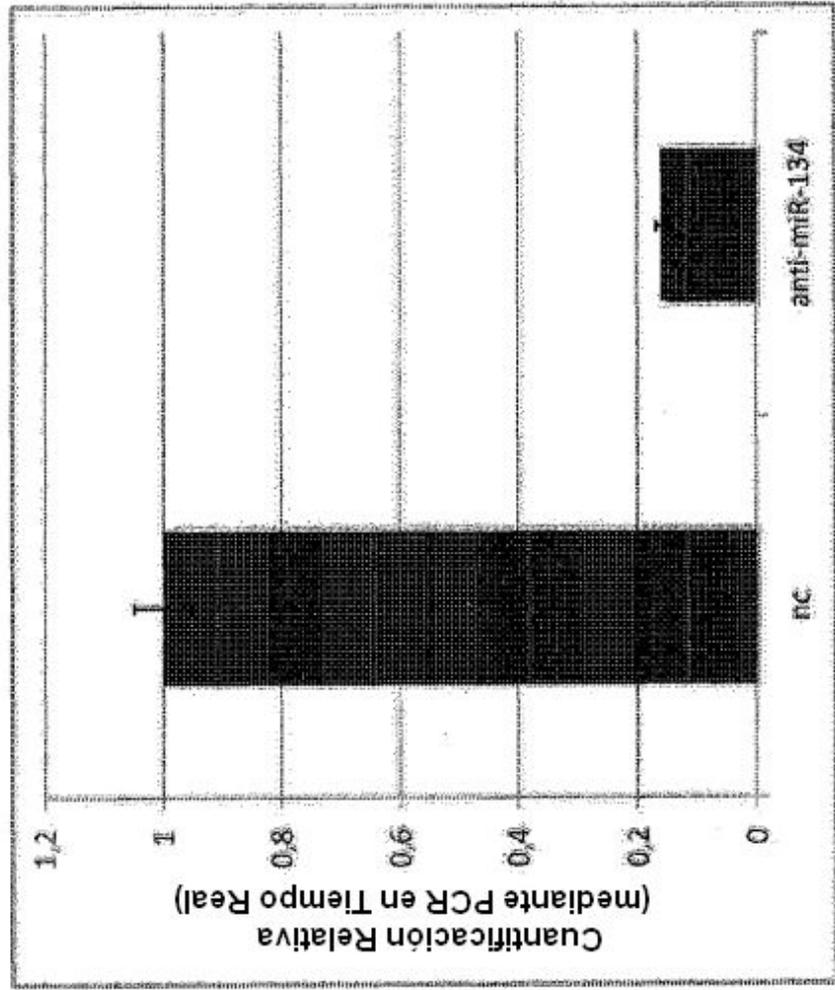


Figura 11

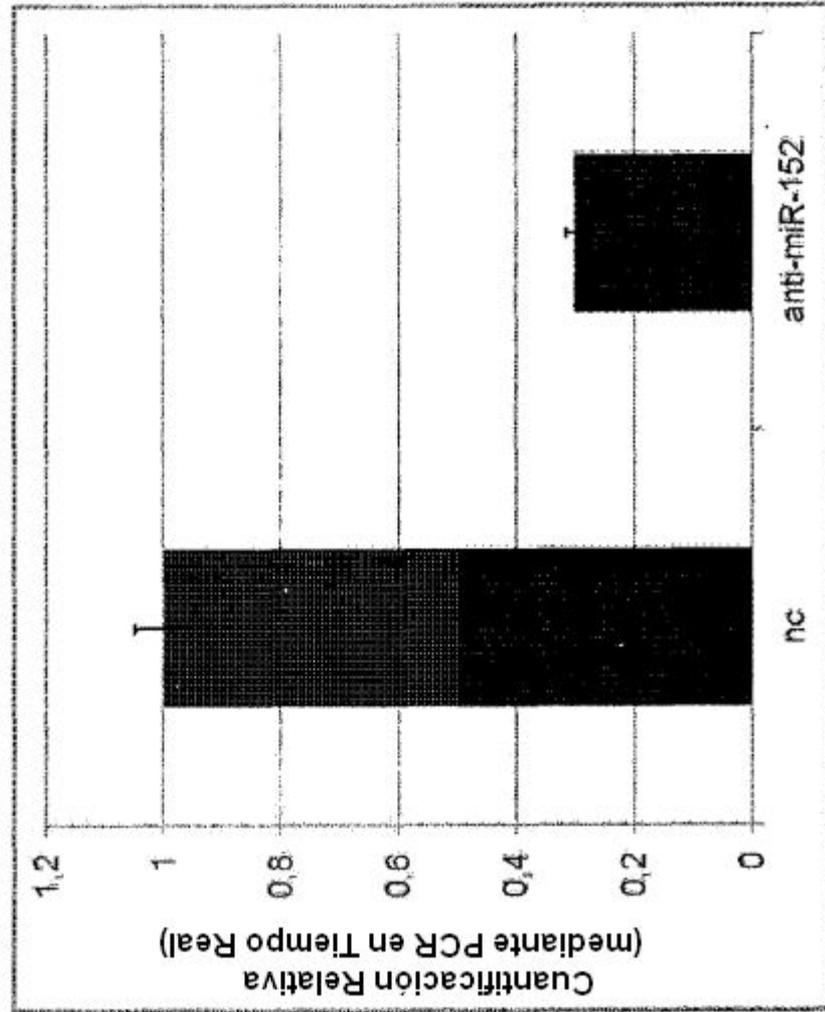


Figura 12

La expresión de miR-134 en fibroblastos se inhibe con los siguientes compuestos:

Compuesto	Concentración final (%)	Cambio de nombre
Galato de Epigallocatequina	0,01	Compuesto 4.1
Verbascósido	0,001	Compuesto 5.1

Tratamiento: 48 horas

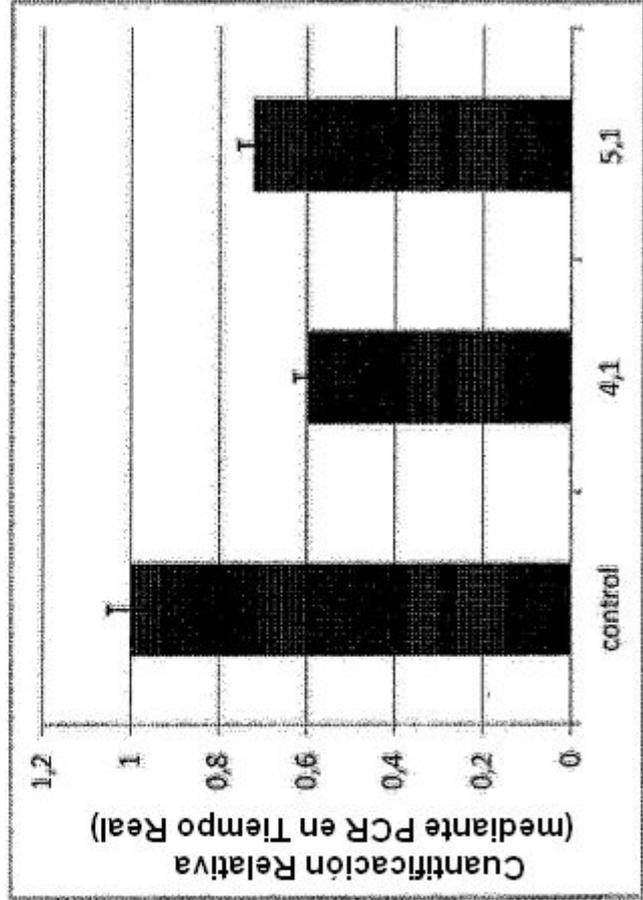


Figura 13

La expresión de miR-152 en fibroblastos se inhibe con los siguientes compuestos:

Compuesto	Concentración final (%)	Cambio de nombre
Hidrato de Catequina	2.10 ⁻⁴	Compuesto 2.2
Galato de Epigallocatequina	0.01	Compuesto 4.1
Bosque de Ángel PFA	4.10 ⁻⁴	Compuesto 8.2

Tratamiento: 48 horas

