

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 259**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/64** (2006.01)

**A61K 8/97** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2012** **E 12192675 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2732806**

54 Título: **Composición cosmética para aumentar la síntesis de ácido hialurónico en la piel y su uso para reparar arrugas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.09.2015**

73 Titular/es:

**COTY GERMANY GMBH (100.0%)**  
**Rheinstrasse 4E**  
**55116 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**PUJOS, MURIEL;**  
**BERNINI, DOROTHÉE;**  
**ROBERT, CÉCILE y**  
**DOUCET, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 546 259 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).

## Composición cosmética para aumentar la síntesis de ácido hialurónico en la piel y su uso para reparar arrugas

### DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a una composición para la piel que tiene un efecto excelente sobre el alisamiento o la reparación de arrugas. La composición comprende palmitoil tripéptido-38 (palmitoil-lisil-dioximetionil-lisina) y extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta), combinación que se ha encontrado que produce un efecto sinérgico sobre la expresión del ARNm de hialuronano sintasa 1 (HAS1) en fibroblastos humanos. La hialuronano sintasa es responsable de la síntesis del hialuronano (ácido hialurónico) en la piel. El ácido hialurónico es un constituyente de la matriz extracelular de la piel y responsable del llenado de espacios, reparación de tejido y retención de humedad.

10 El problema de la presente invención fue proporcionar una composición anti-arrugas con efecto reparador de las arrugas superior.

15 Se encontró por los inventores de la presente solicitud que este problema puede resolverse con una composición cosmética que comprende como sustancias activas 0,000025 al 0,001 % en peso de palmitoil-lisil-dioximetionil-lisina, 0,00105 al 0,063 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta), agua y auxiliares cosméticamente aceptables, en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la composición.

20 Se conoce en la técnica que la palmitoil-lisil-dioximetionil-lisina, cuyo nombre INCI es palmitoil tripéptido-38, estimula la síntesis de moléculas de la matriz de la piel tales como el colágeno de la dermis y el ácido hialurónico epidérmico y ayuda a llenar las arrugas. Un producto comercialmente disponible que comprende este tripéptido es Matrixyl<sup>®</sup>Synthe'6<sup>™</sup> (Sederma, Francia). El nombre INCI de Matrixyl<sup>®</sup>Synthe'6<sup>™</sup> es glicerina (y) agua (e) hidroxipropilciclodextrina (y) palmitoil tripéptido-38. El producto comprende 0,025 % en peso de palmitoil tripéptido-38, 78,975 % en peso de glicerina, 1,0 % en peso de hidroxipropilciclodextrina y el resto hasta el 100 % en peso de agua.

25 El documento WO2010082175 desvela el tripéptido palmitoil-lisil-dioximetionil-lisina, también llamado Pal-KMO2K-OH, INCI: palmitoil tripéptido 38 y comercializado como Matrixyl synthe 6. Se desvela su capacidad para estimular la síntesis del ácido hialurónico en la dermis y la epidermis. Se desvela una combinación sinérgica de Pal-KMO2K-OH con el extracto de planta *Portulaca pilosa*.

30 En otra realización de la invención, la composición cosmética comprende 0,000125 al 0,00075 % en peso de palmitoil tripéptido-38 relacionado con el peso total de la composición, preferentemente 0,00025 al 0,00075 % en peso.

35 Se describe en la materia que el extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta) se obtiene de bayas de pimienta negra pulverizándolas y sometiendo la disolución acuosa del polvo a hidrólisis enzimática. Es rico en polisacáridos, glucanos y ramnogalacturonanos. Un producto comercialmente disponible que comprende este extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta) es Retilactyl D<sup>®</sup> (Silab, Francia). Este producto comprende 2,1 % en peso extracto de semilla de *Piper nigrum*, estabilizador, conservante y 97,2 % en peso de agua (INCI: agua (y) extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta)). Retilactyl D<sup>®</sup> se diseñó para ayudar a mitigar los efectos del fotoenvejecimiento sobre fibroblastos reticulares.

40 En otra realización de la invención, la composición cosmética comprende 0,0021 al 0,0315 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta) relacionado con el peso total de la composición, preferentemente 0,0042 al 0,021 % en peso.

45 El documento WO 2011/110793 desvela el uso de extracto de semilla de *Piper nigrum* contra el envejecimiento de la piel.

50 Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la combinación de palmitoil tripéptido-38 y extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta) tiene un efecto sinérgico sobre la síntesis de ARNm de HAS1 en fibroblastos humanos normales. De esta forma, el nivel del ácido hialurónico de la dermis en la piel aumenta eficazmente. Usando, por ejemplo, el 2 % en peso de Matrixyl<sup>®</sup>Synthe'6<sup>™</sup> (que se corresponde con el 0,0005 % en peso de palmitoil tripéptido-38) y el 0,5 % en peso de Retilactyl D<sup>®</sup> (que se corresponde con el 0,0105 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum*), la expresión del ARNm de HAS1 aumentó al 377 %, mientras que la expresión del ARNm de HAS1 de Matrixyl<sup>®</sup>Synthe'6<sup>™</sup> solo fue del 127 % y la de Retilactyl D<sup>®</sup> solo fue del 60 % (véanse el Ejemplo 4 y la Figura 1).

55 Se ha revelado que la composición anti-arrugas de la presente invención puede mejorarse adicionalmente añadiendo extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno) y/o extracto del fruto de *Kigelia africana*. Añadiendo ambos activos la expresión del ARNm de HAS1 podría mejorarse adicionalmente al 401 % (véase la Figura 1).

60 Se describe en la materia que el extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno) se obtiene sometiendo la disolución acuosa de copos de centeno a hidrólisis enzimática. Un producto comercialmente disponible que comprende este

- 5 extracto de semilla de centeno es Coheliss®Bio (Silab, Francia). El producto comprende 6 % en peso del extracto de semilla de centeno, 93,7 % en peso de agua y 0,3 % en peso de conservante (INCI: Agua y extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno)). La composición cosmética de la invención comprende 0,003 al 0,18 % en peso del extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno), relacionado con el peso total de la composición, preferentemente del 0,006 al 0,09 % en peso, más preferido del 0,006 al 0,06 % en peso.
- 10 El extracto del fruto de *Kigelia africana* se obtiene de los frutos del árbol *Kigelia africana* por extracción hidroglicólica. Un producto comercialmente disponible que comprende este extracto es Kigeline (Greentech, Francia). El producto comprende aproximadamente 1,08 % en peso del extracto del fruto de *Kigelia africana*, 39,0 al 39,9 % en peso de butilenglicol y el resto hasta el 100 % en peso de agua (INCI: Agua, butilenglicol, extracto del fruto de *Kigelia africana*). La composición cosmética de la invención comprende 0,000054 al 0,0324 % en peso del extracto del fruto de *Kigelia africana* relacionado con el peso total de la composición, preferentemente del 0,00108 al 0,0162 % en peso, más preferido del 0,00108 al 0,0108 % en peso.
- 15 La composición de la invención comprende sustancias auxiliares que están seleccionadas del grupo que comprende uno o más de emulsionantes, emolientes, humectantes, hidratantes, antioxidantes, gelificantes, agentes quelantes o complejantes, agentes moduladores de la viscosidad, opacificantes, conservantes, colorantes, fragancias, agentes de cuidado de la piel, agentes bronceadores, filtros de UV, tampones, disolventes y mezclas de los mismos.
- 20 La composición cosmética de la invención se formula como emulsión O/W o W/O. Los emulsionantes que pueden usarse para este fin son muy conocidos por el experto. Según la invención, ejemplos de emulsionantes que pueden usarse son: poliacrilamida (e) isoparafina C13-C14 (y) lauril éter-7 (nombre comercial: Sepigel 305), estearato de PEG-40 (Myrj S40), estearato de glicerilo (nombre comercial: Cutina GMS V), lauril glicol éter de PPG-1-PEG-9 (nombre comercial: Eumulgin L), PEG-60-aceite de ricino hidrogenado (nombre comercial: Cremophor CO 60), alcohol cetílico y estearato de glicerilo y estearato de PEG-75 y Ceteth-20 y Steareth-20 (nombre comercial: Emulium Delta), alcohol cetearílico (nombre comercial: Nafol 1618), copolímero de acrilato de hidroxietilo/acriloldimetiltaurato de sodio y agua y escualano y polisorbato 60 e isoestearato de sorbitano (nombre comercial: Simulgel NS).
- 25 La composición según la presente invención comprende 0,01 al 3,0 % en peso de antioxidantes, preferentemente 0,05 al 1,0 % en peso, más preferido 0,08 al 0,3 % en peso, en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la composición. Antioxidantes adecuados son, por ejemplo, vitamina C y sus derivados, por ejemplo, acetato de ascorbilo, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo, vitamina E, derivados de vitamina E, una mezcla de extractos vegetales que comprende extracto de raíz de *Angelica archangelica*, extracto de hojas de *Camellia sinensis*, extracto de semilla de *Pongamia pinnata* y extracto de grano de *Coffea arabica* (complejo de RPF), y mezclas de los mismos. Por ejemplo, Oxyxex K (Merck), que es una mezcla de tocoferol, palmitato de ascorbilo, ácido cítrico, ácido ascórbico y PEG puede incluirse en la presente composición.
- 30 El complejo de RPF que puede usarse en la composición cosmética de la invención incluye preferentemente extractos de granos de café verde, de hojas de té verde (*Camellia sinensis*), de semillas de *Pongamia pinnata*, de raíces de *Angelica archangelica* y de la cáscara de *Citrus aurantium* (naranja amarga). Los extractos se preparan por extracción con un alcohol monovalente o multivalente o una mezcla de tal(es) alcohol(es) con agua a temperatura ambiente (aproximadamente 15 - 30 °C). Los extractos se usan en forma líquida o secada. Una mezcla de extractos de planta especialmente preferida es una mezcla de extractos de plantas encapsuladas liposómicas del 1 - 4 % de extrajo de hojas de *Camellia sinensis*, 1 - 4 % de extracto de grano de café verde, 1 - 4 % de extracto de semilla de *Pongamia pinnata*, 1 - 4 % de extracto de raíz de *Angelica archangelica*, 1 - 4 % de extracto de cáscara de *Citrus aurantium*, 2 - 10 % de fosfolípidos en una suspensión acuosa-alcohólica en la que el contenido de alcohol está en el intervalo del 4 - 12 %, en la que todas las concentraciones están relacionadas con el peso de la mezcla de extractos de plantas.
- 35 Según la invención pueden añadirse emolientes para ablandar y suavizar la piel. Emolientes adecuados son, por ejemplo, triglicérido caprílico/cáprico, palmitato de etilhexilo, siliconas, tales como dimeticona, polisilicona-11, siloxanos, tales como ciclopentasiloxano/dimeticonol, ciclohexasiloxano; manteca (de karité) de *Butyrospermum parkii*. Emolientes adicionalmente adecuados son, por ejemplo, isononanoato de cetearilo, octildodecanol, palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, aceites minerales, isohexadecano, sebacato de diisopropilo, benzoato de alquilo C12-15, caprilato de propilheptilo, tetraisoestearato de pentaeritritilo, isononanoato de cetearilo, isononanoato de isononilo, hidroxistearato de etilhexilo, caprilato de fenoxietilo, cocoato de isoamilo.
- 40 En una realización ventajosa de la invención, la composición contiene sustancias humectantes en un intervalo del 0,1 al 10,0 % en peso. Hidratantes preferidos que pueden usarse son glicerina, propilenglicol y butilenglicol. Adicionalmente, pueden añadirse microesferas de ácido hialurónico (nombre comercial: Hyaluronic Filling Spheres™, BASF) del 0,01 al 2 % en peso, relacionados con el peso total de la composición, preferentemente del 0,01 al 0,2 % en peso, en la que las microesferas contienen el 0,2 % en peso de hialuronato de sodio.
- 45 La composición de la presente invención tiene un efecto corrector de arrugas excelente, principalmente basado en la elevada síntesis de ácido hialurónico de la dermis en la piel. Por tanto, es otro objetivo de la presente solicitud

proporcionar una composición para su uso en aumentar la síntesis del ácido hialurónico en la piel y proporcionar una composición para su uso en reparar o suavizar arrugas, preferentemente arrugas faciales. Todavía otro objetivo de la presente invención es un método para tratar arrugas sobre la piel, preferentemente arrugas faciales, aplicando la composición de la presente invención a áreas de la piel con arrugas que van a tratarse.

5 Las composiciones de la presente invención se preparan de un modo muy conocido para emulsiones O/W o W/O en las industrias cosméticas. Detalles de la preparación se dan en los ejemplos.

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar las composiciones cosméticas de la presente invención y su preparación. No pretenden ser limitantes en ningún respecto.

Ejemplo 1

CREMA DE DÍA

	<b>Nombre INCI / Descripción de ingredientes</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>B</b>
		%	%	%
Fase 1	AGUA	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
	COLORANTE ACID RED 27	0,00015	0,00025	0,0005
	COPOLÍMERO DE ESTIRENO / ACRILATOS (hidro)	0,8	1,40	1,80
	GLICERINA	2,0	4,0	6,0
	POLIACRILAMIDA, AGUA, ISOPARAFINA C13-14, LAURIL ÉTER 7	4,9	4,7	4,5
Fase 2	POLIISOBUTENO HIDROGENADO	4,0	2,7	1,5
	CICLOPENTASILOXANO Y DIMETICONOL	2,0	2,8	3,5
Fase 3	EXTRACTO DE SEMILLA DE SECALE CEREALE (CENTENO) (hidro) (Coheliss®Bio)	0,1	2,0	0,6
	EXTRACTO DEL FRUTO DE KIGELIA AFRICANA (hidroglicólico) (Kigeline)	0,15	2,5	0,6
	MICROESFERAS DE HIALURONATO DE SODIO (Hyaluronic Filling Spheres)	0,05	0,12	0,08
	INGREDIENTES ENCAPSULADOS DEL COMPLEJO DE RPF	0,35	0,25	0,15
	EXTRACTO DEL FRUTO DE CITRUS AURANTIUM DULCIS HIDROLIZADO (hidro)	1,5	1,0	0,7
	ACEITE DEL FRUTO DE MAURITIA FLEXUOSA	0,5	0,4	0,3
	LISADO DE FERMENTO DE BIFIDUS	0,1	2,0	0,6
	GLICERINA Y AGUA E HIDROXIPROPILCICLODEXTRINA Y PALMITOIL TRIPÉPTIDO-38 (Matrixyl®Synthe'6™)	0,3	3,5	2,0
	EXTRACTO DE SEMILLA DE PIPER NIGRUM (PIMIENTA) (hidro) (Retilactyl D®)	0,25	2,0	0,45
Fase 4	NILON-12	1,0	1,9	1,7
	PTFE	1,5	1,2	1,5
Fase 5	FRAGANCIA	0,1	0,25	0,4
	FENOXIETANOL	0,5	0,5	0,5
	1,2-HEXANODIOL, CAPRILILGLICOL	0,5	0,5	0,5
		100	100	100

**Preparación:**

15 Añadir por separado todos los ingredientes de la fase 1 al agua con agitación a temperatura ambiente.

Mezclar bien para obtener una fase homogénea.

20 Añadir los ingredientes de la fase 2 a la fase 1, homogeneizar bien con agitación.

Añadir por separado y lentamente todos los ingredientes de la fase 3 a la fase 1, 2.

Agitar bien hasta homogeneidad.

25 Continuar de la misma forma añadiendo la fase 4 y 5 a la fase 1, 2, 3.

Controlar la homogeneidad del producto final.

30

## ES 2 546 259 T3

### Ejemplo 2

CREMA PARA LOS OJOS		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
		Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Premezcla	Nombre INCI / Descripción de ingredientes	%	%	%
	GLICERINA	2,0	4,0	6,0
	GOMA XANTANA	0,1	0,15	0,2
Fase 1	AGUA	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
	COLORANTE ACID RED 27	0,0005	0,0007	0,0009
	FD & C YELLOW N°5	0,0005	0,001	0,0015
	EDTA DISÓDICO	0,035	0,040	0,0450
	CAFEÍNA	0,3	0,2	0,25
	PROPILENGLICOL	1,5	1,5	2,3
	CARBOMER	0,2	0,15	0,1
Fase 2	ESTEARATO DE GLICERILO	4,0	3,8	3,3
	ESTEARATO DE PEG-40	1,2	1,5	1,7
	CERA DE ABEJA SINTÉTICA	2,5	2,7	3,3
	POLIISOBUTENO HIDROGENADO	1,0	2,0	2,7
	MANTECA (DE KARITÉ) DE BUTYROSPERMUM PARKII	3,5	3,0	3,5
	ALCOHOL ESTEARÍLICO Y CETEARETH-20	4,3	4,6	4,8
Fase 3	CICLOPENTASILOXANO Y DIMETICONOL	1,5	3,5	2,5
	CICLOPENTASILOXANO Y CICLOHEXASILOXANO	2,5	1,5	2,5
Fase 4	CAOLÍN	0,7	1,0	1,5
	NILON-12	2,0	1,5	1,0
	MICA Y SÍLICE Y DIÓXIDO DE TITANIO	0,3	0,4	0,45
Fase 5	HIDRÓXIDO SÓDICO (hidro)	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
Fase 6	EXTRACTO DEL FRUTO DE KIGELIA AFRICANA (hidroglicólico) (Kigeline)	0,1	2,0	0,6
	EXTRACTO DE LA HOJA DE GINGKO BILOBA (hidroglicólico)	0,6	0,6	0,6
	EXTRACTO DE SEMILLA DE AESCULUS HIPPOCASTANUM (CASTAÑO DE INDIAS) (hidroglicerina)	0,4	0,4	0,4
	EXTRACTO DE SEMILLA DE SECALE CEREALE (CENTENO) (hidro) (Coheliss®Bio)	0,2	1,9	0,4
	MICROESFERAS DE HIALURONATO DE SODIO (Hyaluronic Filling Spheres)	0,05	0,12	0,08
	INGREDIENTES ENCAPSULADOS DEL COMPLEJO DE RPF	0,25	0,2	0,15
	ISOESTEARATO DE PEG-6 Y LAURATO DE HESPERETINA	0,2	0,2	0,2
	LISADO DE FERMENTO DE BIFIDUS	0,2	3,0	0,6
	GLICERINA Y AGUA	3,0	0,2	2,0
	HIDROXIPROPILCICLODEXTRINA Y PALMITOIL TRIPÉPTIDO-38 (Matrixyl®Synthe'6™)			
	EXTRACTO DE SEMILLA DE PIPER NIGRUM (PIMIENTA) (hidro) (Retilactyl D®)	0,25	2,0	0,45
Fase 7	FRAGANCIA	0,05	0,1	0,15
	FENOXIETANOL	0,5	0,5	0,5
	1,2-HEXANODIOL, CAPRILILGLICOL	0,5	0,5	0,5
	TOTAL	100	100	100

### **Preparación:**

5

Disolver los ingredientes de la fase 1 en el agua y calentar hasta aproximadamente 75 °C.

Calentar por separado la fase 2 a aproximadamente 75 °C

10

Preparar la premezcla hasta homogeneidad y añadirla a la fase 1, agitar bien.

## ES 2 546 259 T3

Poner la fase 2 en la fase 1 con agitación y homogeneizar.

Enfriar la fase 1, 2 de emulsión homogénea a 50 - 55 °C.

5 Añadir la fase 3 y 4 por separado a la fase 1, 2; continuar con la agitación.

Neutralizar la fase 1, 2, 3, 4 con la fase 5 con agitación.

Homogeneizar bien.

10 Enfriar con agitación suave a por debajo de 40 °C y continuar la adición de todos los ingredientes de la fase 6 a la fase 1, 2, 3, 4, 5, controlar la homogeneidad.

15 Enfriar de nuevo con agitación suave hasta 20-25 °C, añadir los ingredientes de la fase 7 a la fase 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Controlar la homogeneidad final.

### Ejemplo 3

CREMA DE NOCHE		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
		Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Premezcla	Nombre INCI / descripción de ingredientes	%	%	%
	GLICERINA	3,0	3,5	4,0
	GOMA XANTANA	0,6	0,5	0,65
Fase 1	AGUA	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
	COLORANTE ACID RED 27	0,0001	0,0002	0,0003
	BUTILENGLICOL	2,0	1,5	2,5
Fase 2	TRIGLICÉRIDO CAPRÍLICO / CÁPRICO	3,0	2,0	3,5
	ESTEARATO DE GLICERIL	2,5	2,2	1,85
	ALCOHOL CETÍLICO	4,0	3,5	4,3
	PALMITATO DE ETILHEXIL	3,0	4,0	2,5
	MANTECA (DE KARITÉ) DE BUTYROSPERMUM PARKII	3,0	3,5	4,5
	TRISTEARATO DE SORBITANO	0,2	0,2	0,2
Fase 3	CICLOPENTASILOXANO Y DIMETICONOL	5,0	2,0	4,0
Fase 4	POLÍMERO CRUZADO DE METACRILATO DE METILO NILON-12	1,7 1,0	3,0 1,5	2,5 2,0
Fase 5	EXTRACTO DEL FRUTO DE KIGELIA AFRICANA (hidroglicólico) (Kigeline)	0,2	3,0	0,6
	EXTRACTO DEL FRUTO DE CITRUS AURANTIUM DULCIS HIDROLIZADOS (hidro)	2,0	1,2	0,6
	ACEITE DEL FRUTO DE MAURITIA FLEXUOSA	0,2	0,25	0,3
	EXTRACTO DE SEMILLA DE SECALE CEREALE (CENTENO) (hidro) (Coheliss®Bio)	0,25	2,3	0,6
	INGREDIENTES ENCAPSULADOS DEL COMPLEJO DE RPF	0,25	0,2	0,15
	HCL DE DECARBOXICARNOSINA (hidroglicólico)	0,25	0,1	0,15
	LISADO DE FERMENTO DE BIFIDUS	0,3	3,5	0,55
	GLICERINA Y AGUA E	0,5	3,5	2,0
	HIDROXIPROPILCICLODEXTRINA Y PALMITOIL TRIPÉPTIDO-38 (Matrixyl®Synthe'6™)	0,3	2,5	0,45
	EXTRACTO DE SEMILLA DE PIPER NIGRUM (PIMIENTA) (hidro) (Retilactyl D®)	0,3	2,5	0,45
Fase 6	FRAGANCIA	0,1	0,2	0,3
	FENOXIETANOL	0,5	0,5	0,5
	1,2-HEXANODIOL, CAPRILILGLICOL	0,5	0,5	0,5
	ACRILATO DE HIDROXIETILO Y COPOLÍMERO DE ACRILOILDIMETILTAURATO DE SODIO Y ESCUALANO Y POLISORBATO 60	3,5	3,9	3,7
	TOTAL	100	100	100

**Preparación:**

Disolver los ingredientes de la fase 1 en el agua y calentar hasta aproximadamente 75 °C.

5 Calentar por separado la fase 2 a aproximadamente 75 °C

Preparar la premezcla hasta homogeneidad y añadirla a la fase 1, agitar bien.

Poner la fase 2 en la fase 1 con agitación y homogeneizar.

10

Enfriar la fase 1, 2 de la emulsión homogénea a 50 - 55 °C con agitación.

Añadir las fases 3 y 4 por separado a la fase 1, 2; continuar con agitación.

15

Homogeneizar bien.

Enfriar con agitación suave la fase 1, 2, 3, 4 por debajo de 35 °C y continuar la adición de todos los ingredientes de la fase 5 a la fase 1, 2, 3, 4, controlar la homogeneidad.

20

Enfriar de nuevo con agitación suave hasta 20-25 °C, añadir la fragancia, los conservantes y la mezcla de gel a la fase 1, 2, 3, 4, 5.

Controlar la homogeneidad final.

25

Ejemplo 4: Protocolo de prueba de la medición de la expresión del ARNm de HAS1

Se trataron fibroblastos humanos normales por el principio activo/ mezcla de principios activos diluida en el medio de cultivo celular durante 3 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células no tratadas se incubaron en las mismas condiciones con medio de cultivo celular.

30

Entonces se evaluó la expresión del ARNm de HAS1 usando tecnología de PCR en tiempo real (RT) (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa). Para ese fin, se extrajo ARN total con ABI Prism 6100 Nucleic Acid prepstation (Applied Biosystems) y se cuantificó con un espectrofotómetro a 260 nm. La síntesis del ADNc de la primera cadena se realizó usando 2 µg de ARN total con el kit High Capacity cDNA Archive. Se llevó a cabo PCR en tiempo real sobre 10 ng de ADNc con el sistema de PCR en tiempo real 7300 usando cebadores de TaqMan y sonda (Applied Biosystems) específica para HAS1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C durante 40 ciclos. Se calcularon cambios relativos en la expresión génica según el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  con el software 7300 System™.

35

40

Los resultados se demuestran en la siguiente Tabla 1 y en la Figura 1. La Figura 1 muestra la expresión del ARNm de HAS1 medida con RT-PCR sobre fibroblastos humanos normales.

**Tabla 1**

45

Expresión HAS1 mRNA				
Tratamiento 3 h			Tratamiento 6h	
	Estimulación (5) (No tratado)	Análisis estadístico	Estimulación (5) (No tratado)	Análisis estadístico
Sinergia con 2 ingredientes				
Matrixyl 2%	127,2%	s/no tratado	59,6 %	s/no tratado
Retilactyl 0,5%	60,0%	s/no tratado	78,9%	s/no tratado
Mezcla: Matrixyl 2% + Retilactyl 0,5%	377,1%	s/no tratado	289,4 %	s/no tratado
		s/cada ingrediente		s/cada ingrediente
s/no tratado: estadísticamente significativo comparado a células tratadas				
s/cada ingrediente: mezcla estadísticamente comparada a cada ingrediente				

60

65

Como puede deducirse de los resultados, la combinación de 2 % de Matrixyl®Synthe'6™ (que se corresponde con 0,0005 % en peso de palmitoil tripéptido-38) y 0,5 % de Retilactyl D® (que se corresponde con 0,0105 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum*) aumentó la expresión del ARNm de HAS1 al 377,1 %, mientras que la expresión del ARNm de HAS1 de Matrixyl®Synthe'6™ solo fue del 127,2 % y la de Retilactyl D® solo fue del 60 %. La adición de 0,5 % de Coheliss®Bio (que se corresponde con el 0,03 % en peso del extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno)) y 0,5 % de Kigeline (que se corresponde con el 0,0054 % en peso del extracto del fruto de *Kigelia africana*) mejoró adicionalmente la expresión del ARNm de HAS1 al 401,6 %.

#### Ejemplo 5:

#### Exploración de la actividad de un producto acabado de la invención sobre hialuronano sobre explante de piel humana viva.

La crema de día C del Ejemplo 1 con 2 % de Matrixyl y 0,5 % de cada uno de Retilactyl, Coheliss Bio y Kigeline se probó con respecto a su actividad sobre la síntesis de ácido hialurónico de la dermis.

Los explantes se mantuvieron en supervivencia en medio de cultivo BEM a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub>. El producto probado se aplicó en los días D0, D2 y D4 basándose en 2 mg / cm<sup>2</sup>. La mitad del medio de cultivo se renovó en D2 y D4. El explante de control no recibió ningún tratamiento.

En D0, se recogieron 3 explantes y se cortaron en dos partes. Una mitad se fijó en formalina tamponada y la otra mitad se congeló a -80 °C. En D5, 3 explantes tratados o no con el producto se recogieron y se procesaron de la misma forma.

La muestra congelada se cortó en secciones de 7 μm de espesor usando un criostato Leica CM 3050. La inmunotinción de HA se realizó sobre las secciones congeladas con HABP biotinilado (Seikagaku ref 400763-1A) durante 1 hora a temperatura ambiente. La tinción se reveló usando estreptavidina/FITC (Caltag, SA 1001).

La inmunotinción se evaluó por observación microscópica usando un bloque de filtro I3 de Leica (FITC) para HABP y por análisis de imágenes. Reveló que la síntesis del ácido hialurónico mejora el 61 %.

Fig. 2 muestra los resultados de inmunotinción de esta prueba *in vitro* sobre piel humana normal. El ácido hialurónico se tiñe de verde.

**Reivindicaciones**

1. Una composición cosmética para aumentar la síntesis de ácido hialurónico en la piel, **caracterizada porque** comprende  
 5 0,000025 al 0,001 % en peso de palmitoil-lisil-dioximethionil-lisina  
 0,00105 al 0,063 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta)  
 agua y auxiliares cosméticamente aceptables, en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la  
 composición.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende del 0,003 al 0,18 % en peso del  
 extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno), en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la  
 composición, preferentemente del 0,006 al 0,09 % en peso.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** comprende del 0,000054 al 0,0324 % en  
 peso del extracto del fruto de *Kigelia africana*, en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la  
 composición, preferentemente del 0,00108 al 0,0162 % en peso.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** comprende del  
 0,000125 al 0,00075 % en peso de palmitoil-lisil-dioximethionil-lisina, en la que los porcentajes dados se refieren al  
 peso total de la composición, preferentemente del 0,00025 al 0,00075 % en peso.
- 25 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** comprende del 0,0021  
 al 0,0315 % en peso del extracto de semilla de *Piper nigrum* (pimienta), preferentemente del 0,0042 al 0,021 % en  
 peso, en la que los porcentajes dados se refieren al peso total de la composición.
- 30 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** comprende del 0,006  
 al 0,06 % en peso del extracto de semilla de *Secale cereale* (centeno), en la que los porcentajes dados se refieren al  
 peso total de la composición.
- 35 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** comprende del  
 0,00108 al 0,0108 % en peso del extracto del fruto de *Kigelia africana*, en la que los porcentajes dados se refieren al  
 peso total de la composición.
- 40 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** comprende sustancias  
 auxiliares que están seleccionadas del grupo que comprende uno o más de emulsionantes, emolientes,  
 humectantes, hidratantes, gelificantes, agentes quelantes o complejantes, agentes moduladores de la viscosidad,  
 opacificantes, conservantes, colorantes, fragancias, agentes de cuidado de la piel, agentes bronceadores, filtro de  
 UV, tampones, disolventes y mezclas de los mismos.
- 45 9. Una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en aumentar la  
 síntesis de ácido hialurónico en la piel.
- 50 10. Una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en reparar o  
 suavizar arrugas, preferentemente arrugas faciales.
- 55 11. Un método no terapéutico para tratar arrugas sobre la piel, preferentemente arrugas faciales, caracterizado  
 porque una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 se aplica a áreas de la piel  
 con arrugas que van a tratarse.

50

55

60

65