

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 160**

51 Int. Cl.:

A61K 36/18	(2006.01)
A61K 31/025	(2006.01)
A61K 36/00	(2006.01)
A61K 36/05	(2006.01)
A61K 36/53	(2006.01)
A61K 36/73	(2006.01)
A61K 36/75	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11762283 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2554178**

54 Título: **Modulador de la expresión para el gen reloj Period**

30 Prioridad:

31.03.2010 JP 2010083017
31.03.2010 JP 2010083016

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2016

73 Titular/es:

SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP

72 Inventor/es:

GOZU, YOKO;
HAZE, SHINICHIRO;
MORI, KEIKO y
UMISHIO, KENICHI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

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

ES 2 567 160 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

Modulador de la expresión para el gen reloj Period

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* como modulador de la expresión para un gen reloj y más específicamente al uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* como modulador de la expresión para el gen reloj Period y para un modulador del ritmo circadiano que lo comprende, como se da a conocer en el presente documento.

Descripción de la técnica relacionada

10 Casi todos los organismos vivos en la tierra tienen un “reloj biológico” interno que oscila de manera autónoma con un ciclo de aproximadamente 24 horas. El reloj biológico provoca una fluctuación diaria biológica denominada ritmo circadiano, se considera que controla los cambios diarios de diversos fenómenos biológicos (actividades) que incluyen no sólo los ciclos de sueño-vigilia de los organismos, sino también la temperatura corporal, la tensión arterial, la secreción hormonal, el metabolismo, así como las actividades mentales y físicas, la alimentación y similares. En los últimos años, se ha señalado que la perturbación del ritmo circadiano es un factor patogénico de
15 diversos síntomas psicosomáticos o trastornos patológicos incluyendo trastornos del sueño, enfermedades de la piel, enfermedades relacionadas con el estilo de vida y enfermedades neuropsiquiátricas tales como depresión y similares.

20 Como se ilustra en la figura 1, el reloj biológico se controla mediante un sistema generador de ritmo que comprende un grupo de genes llamados “genes reloj”. En mamíferos, el núcleo del mecanismo molecular del reloj es un bucle de retroalimentación compuesto por la promoción/supresión transcripcional de los genes que codifican para cuatro proteínas, CLOCK, BMAL1, PERIOD y CRYPTOCHROME. El ritmo circadiano se genera mediante pulsación del bucle de retroalimentación con un ciclo de aproximadamente 24 horas.

25 Aunque el centro de control (reloj central) del ritmo circadiano se encuentra en el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo, ha quedado claro que los genes reloj se expresan incluso en el hígado, el riñón, la piel y otros tejidos periféricos en los que el ritmo circadiano se genera mediante un sistema similar. La expresión de los genes reloj periféricos se regula mediante señales procedentes del núcleo supraquiasmático. Además, se ha establecido que la expresión de los genes reloj en las células y tejidos periféricos se controla directamente mediante factores estimulantes de señales como los glucocorticoides, la catecolamina, la angiotensina II y otros, para generar un ritmo fisiológico. En los últimos años se ha examinado el ritmo circadiano de células cultivadas tales como células
30 fibroblásticas induciendo el ritmo circadiano de la expresión de genes reloj *in vitro* para sincronizar el ritmo de expresión con los factores estimulantes como glucocorticoides, forskolina, suero y otros, y evaluando el ritmo circadiano usando su expresión como criterio (documentos no de patente 1, 2 y 3).

35 Los genes reloj controlan directamente los ritmos de expresión de otros genes como factores de transcripción, y controlan indirectamente la expresión diaria de muchos más genes a través de la regulación de la secreción hormonal y similares. Ha quedado claro que la alteración de los ritmos de expresión de los genes reloj en organismos provoca problemas en los órganos del cuerpo o el sistema endocrino, dando lugar a diversas enfermedades que incluyen enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como la hipertensión (documento no de patente 4). Por ejemplo, se ha notificado que una persona con obesidad muestra una expresión anómala de los genes reloj, y también se han notificado asociaciones con depresión y cáncer. Además, se ha dilucidado que los
40 genes reloj regulan el ritmo circadiano de diversas funciones fisiológicas de la piel. En un experimento usando células fibroblásticas de piel humana normal, se notificó que el gen del colágeno tipo I se expresa en un ritmo circadiano con un patrón de expresión similar al del gen reloj Period 2 (documento no de patente 5)

45 Mediante la modulación de la expresión de los genes reloj es posible ajustar diversos ritmos de comportamiento y ritmos circadianos de las funciones fisiológicas de los organismos vivos que se controlan mediante los genes reloj. En consecuencia, existe una fuerte necesidad de desarrollar un agente que pueda modular la expresión de los genes reloj.

[Documento no de patente 1]

H. Okamura, “Clock Genes in Cell Clocks: Roles, Actions, and Mysteries”, *Journal of Biological Rhythms*, vol. 19, n.º 5, pág. 388-399, 2004.

50 [Documento no de patente 2]

A. Balsalobre *et al.*, “A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells”, *Cell*, vol. 93, pág. 929-937, 1998.

[Documento no de patente 3]

K. Yagita *et al.*, “Molecular Mechanisms of the Biological Clock in Cultured Fibroblasts”, *Science*, vol. 292, pág. 278-

281, 2001.

[Documento no de patente 4]

M. Hastings *et al.*, "Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms", *Journal of Endocrinology*, vol. 195, pág. 187-198, 2007.

5 [Documento no de patente 5]

K. Izumi *et al.*, "Gaijitsu rizumu wo motsu hifuseiriidennshi no tansaku (Analysis of skin physiological genes having Circadian Rhythm expression)", *The Molecular Biology Society of Japan*, 32ª Reunión Anual, resumen 2P-0009, 2009.

10 E. Simionatto, "Essential Oil from *Zanthoxylum hyemale*", *Planta Med*, vol. 71, pág. 759-763, 2005, describe estudios químicos de componentes identificados a partir de aceites esenciales de las partes aéreas, las hojas maduras, frutos y flores de *Zanthoxylum hyemale*.

15 El documento JP 2008 266319 A se refiere a una composición que controla el ritmo circadiano que comprende uno o más tipos de (i) un flavanoide seleccionado del grupo que consiste en flavona, flavonol, isoflavona, flavanona, antocianina y flavanol o un polímero de los mismos o un derivado de los mismos, (ii) una saponina esteroide o su derivado, (iii) un sesquiterpenoide o su derivado, (iv) monacolina K o su derivado, (v) resveratrol, escopoletina, eugenol, silimarina, forskolina o un derivado de los mismos, y (vi) un producto obtenido mediante la extracción de una semilla de apio con etanol o glicerina como componentes activos.

Divulgación de la invención

20 En vista de las circunstancias descritas anteriormente, el objeto de la presente invención es proporcionar un agente que pueda modular la expresión de un gen *Period*, que es un gen principal de los relojes biológicos.

Los inventores han llegado a alcanzar la presente invención como se define en las reivindicaciones, ya que han encontrado que el extracto de *Zanthoxylum* tiene una propiedad para inducir ritmos de expresión de genes reloj *Period* y también para promover su expresión.

25 Un modulador de la expresión para un gen *Period* según el uso de la presente invención, comprende extracto de *Zanthoxylum*. Hasta ahora no se conocía en absoluto que el extracto de *Zanthoxylum* pudiese modular la expresión del gen reloj.

En la presente invención, la modulación de la expresión génica no sólo incluye la promoción de la expresión génica, sino también la modulación del ritmo de la expresión génica (fase o ciclo).

30 El modulador del ritmo circadiano para su uso según la presente invención comprende el modulador de la expresión mencionado anteriormente para un gen *Period*. Como se describió anteriormente, los genes reloj controlan directa o indirectamente la expresión diaria de diversos genes implicados en la función de los órganos del cuerpo y en el sistema endocrino. Mediante la modulación de la expresión de un gen *Period*, que es un gen principal del reloj biológico, es posible regular diversos ritmos de comportamiento del organismo vivo y ritmos circadianos de funciones fisiológicas que están bajo el control del gen.

35 El modulador de la expresión para el gen *Period* para su uso según la presente invención es extracto de *Zanthoxylum*. Puede aplicarse mediante diversos modos de administración tales como administraciones transdérmicas, orales e inhaladas, y se usa en cosmética.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra sólo el bucle principal de un sistema de generación de ritmo circadiano mediante genes reloj.

La figura 2 es un gráfico que muestra la inducción de los ritmos circadianos de la expresión de genes reloj con cortisol y forskolina en células fibroblásticas de piel humana cultivadas.

La figura 3 es un gráfico que muestra la expresión regulada del gen reloj *Period1* mediante la sustancias de prueba en células fibroblásticas de piel humana cultivadas.

45 Mejor modo de llevar a cabo la invención

El modulador de la expresión para el gen *Period* para su uso según la presente invención, comprende extracto de *Zanthoxylum* como su componente activo.

En cuanto a los detalles del extracto de *Zanthoxylum*, véase el Diccionario Japonés de Componentes Cosméticos (Nihon Hann-you Keshouhin Genryou Shu) cuarta edición (YAKUJI NIPPO LIMITED).

El extracto de *Zanthoxylum* mencionado anteriormente puede obtenerse mediante técnicas comúnmente conocidas, por ejemplo, mediante la inmersión o el calentamiento a reflujo del material vegetal del que se deriva el extracto con un disolvente de extracción, seguido de filtración y concentración. Cualquier disolvente que se usa normalmente para la extracción puede emplearse como disolvente de extracción, incluyendo agua, metanol, etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, glicerina y otros alcoholes, disolventes hidroalcohólicos, cloroformo, dicloroetano, tetraclorometano, acetona, acetato de etilo, hexano y otros disolventes orgánicos solos o en combinación. Los extractos obtenidos usando los disolventes mencionados anteriormente pueden usarse tal cual o, alternativamente, pueden usarse para eliminar las impurezas utilizando una técnica de absorción con, por ejemplo, resina de intercambio iónico, o columna de polímero poroso (por ejemplo, Amberlite XAD-2) seguido de elución con metanol o etanol y después concentración. También pueden usarse extractos, por ejemplo, con agua/acetato de etilo y otros.

El extracto de *Zanthoxylum* está disponible comercialmente y se describe brevemente a continuación.

El extracto de *Zanthoxylum* se obtiene a partir del fruto de *Zanthoxylum* (*Zanthoxylum piperitum*), preferiblemente extraído de la cáscara del fruto de *Zanthoxylum* con etanol al 70% o similares.

El extracto de *Zanthoxylum* como modulador de la expresión para el gen *Period* puede usarse solo o en combinación con un agente que tiene una acción para modular la expresión de otros genes reloj.

Los ejemplos de otros genes reloj incluyen genes *Bmal* (*Bmal1*, *Bmal2*), gen *Clock*, gen *Cryptochrome*, gen de proteína de unión al promotor del sitio D de la albúmina (*Dbp*), gen *E4BP4*, gen *Npas2* y gen *Rev-erb*. Sin embargo, es preferible que el modulador de la expresión para el gen *Period* se use en combinación con un modulador de la expresión para el(los) gen(es) *Bmal*, *Clock* y/o *Cryptochrome*, otros genes principales del reloj biológico, y especialmente preferible usarlo en combinación con un modulador de la expresión para gen(es) *Bmal*.

En el sistema de generación de ritmo del ritmo circadiano tal como se ilustra en la figura 1, *BMAL1*, el producto de expresión de un gen *Bmal*, forma un heterodímero con *CLOCK* para promover la transcripción de un gen *Period*, mientras que la *PERIOD* (*PER*) expresada forma un heterodímero con *CRYPTOCHROME* (*CRY*) para suprimir las actividades *BMAL* y *CLOCK*, de modo que se crea un bucle de retroalimentación que oscila con un período de 24 horas. En los mamíferos, los ritmos circadianos de genes *Bmal* y *Period* se generan con un desfase de aproximadamente 12 horas. La expresión de *Bmal* aumenta durante la noche, mientras que la expresión de *Period* aumenta durante el día. Por tanto, se considera que el ritmo circadiano puede modularse de manera más eficaz regulando el bucle principal del reloj biológico a través de la expresión regulada de ambos genes, *Period* y *Bmal*.

Los moduladores de expresión para el gen *Bmal* incluyen, pero no se limitan a, medicamentos a base de plantas tales como ciprés hinoki, *Chlorella*, lúpulo, *Zanthoxylum* y otros extractos; y fragancias tales como enebro, lavanda, eucalipto, olíbano, ciprés, palmarrosa, aguja de pino, rosa, ylang-ylang, elemí, petitgrain, pimienta, tomillo, manzanilla y otros aceites esenciales. Se ha confirmado que estos medicamentos o fragancias a base de plantas pueden inducir el ritmo de expresión de un gen *Bmal* o promover su expresión en células fibroblásticas de la piel cultivadas.

Además, el modulador de la expresión para el gen *Period* y el modulador del ritmo circadiano de la presente invención pueden usarse solos o pueden estar contenidos en diversas sustancias. Dependiendo del tipo de sustancia, puede incluirse de manera complementaria cualquier constituyente así como el componente indispensable mencionado anteriormente.

Por ejemplo, cuando la sustancia es una formulación tópica para su aplicación sobre la piel, cualquier componente que se encuentra normalmente en una formulación tópica de este tipo puede estar contenido junto con el modulador de la expresión mencionado anteriormente para el gen *Period* dependiendo de su forma de dosificación (por ejemplo, formulación líquida, formulación en polvo, formulación en polvo granulado, formulación en aerosol, formulación sólida, formulación en gel, formulación en parche, formulación en supositorio y otras) o su forma de producto (es decir, cosméticos). Una formulación tópica para su aplicación sobre la piel abarca en general las composiciones que van a aplicarse sobre la piel (incluyendo la piel de la cabeza, el pelo de la cabeza y las uñas) y es un cosmético tal como productos para el cuidado de la piel, productos de maquillaje, productos para el cuidado del cabello, productos para el lavado de la cara, productos para el lavado del cabello y otros. Las formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, sistemas a base de agua, sistemas solubilizados, emulsiones, sistemas a base de aceite, geles, pastas, pomadas, aerosoles, sistemas de dos fases de agua-aceite, sistemas de tres fases de agua-aceite-polvo, y otros. Como la formulación tópica para su aplicación sobre la piel es un cosmético, incluye perfumes, *eau de toilette*, colonia, cremas, emulsiones, bases, polvos para la cara, barras de labios, jabones, champús y acondicionadores, champús para el cuerpo, enjuagues para el cuerpo, polvos corporales, jabones de baño, y otros.

El modulador de la expresión para el gen *Period* para su uso según la presente invención puede estar contenido en desodorantes y cualquier otro producto cosmético.

El contenido del modulador de la expresión para el gen *Period* para su uso según la presente invención en una sustancia no está particularmente limitado, y puede seleccionarse apropiadamente según el tipo y la forma del extracto de *Zanthoxylum* cuando se usa según la presente invención, pero es por ejemplo del 0,00001% en masa

hasta el 100% en masa, preferiblemente del 0,0001% en masa hasta el 50% en masa, y más preferiblemente del 0,0001% en masa al 20% en masa de la masa total de la sustancia.

5 La aplicación específica de la presente invención es el uso cosmético del extracto de *Zanthoxylum* para modular el ritmo circadiano para mejorar la piel áspera resultante de la disfunción del ritmo circadiano induciendo ritmos de expresión de un gen Period o promoviendo la expresión de un gen Period.

Ejemplos

10 La presente invención se describirá a continuación en detalle con ejemplos, pero la presente invención no se limita a los ejemplos. Pueden usarse células fibroblásticas de la piel, células epiteliales, células endoteliales, células de pigmento, adipocitos, células nerviosas y otros diversos tipos de células como células de cultivo. En los ejemplos, sin embargo, se llevaron a cabo evaluaciones con células fibroblásticas de piel humana. Debido a que el sistema principal del gen reloj es común a todas las especies de organismos y todos los tipos de células, se cree que los resultados de evaluación a partir de células fibroblásticas de piel humana deberían ser aplicables a otras especies de organismos y otros tipos de células. En los seres humanos, se conocen tres genes como genes Period; Period1, Period2 y Period3. Se cree que se comportan de manera similar ya que pertenecen a la misma familia de genes. En 15 los ejemplos siguientes, se determinó que la expresión de Period1 era representativa.

Examen del sistema de evaluación para el ritmo de expresión de genes reloj usando células fibroblásticas de piel humana cultivadas

Se confirmó que ritmo de expresión de genes reloj podía evaluarse en un sistema usando células fibroblásticas de piel humana cultivadas.

20 Se adquirieron, como células fibroblásticas humanas cultivadas, células fibroblásticas de piel humana normal (Cell Application, Inc.) y se usaron en los experimentos. Se inocularon en medio DMEM complementado con FBS al 10%, HEPES 20 mM, GlutaMAX y agentes antibacterianos, y se cultivaron a 37°C en un 5% de CO₂. En el sexto día de cultivo, se añadieron 50 ng/ml de cortisol o 10 µM de forskolina a cada uno de los pocillos, y se recogieron las muestras en diversos tiempos tras el tiempo 0, que se definió como el tiempo inmediatamente después de la adición de cortisol o forskolina. Se extrajo ARN de las células con un kit de extracción de ARN disponible comercialmente y se midieron las cantidades de expresión de los genes pretendidos mediante la tecnología de RT-PCR usando cebadores de PCR disponibles comercialmente (Perfect Real Time Primer, Takara Bio). En cuanto a los genes reloj, se determinaron las cantidades de expresión de Period1 y Bmal1, que están implicadas en el sistema principal. De manera similar, se cuantificaron las cantidades de expresión de un gen de mantenimiento RPLP0 y se usaron como patrón interno para calcular la expresión relativa de los genes pretendidos con respecto a RPLP0. 30

En organismos vivos, glucocorticoides tales como cortisol están implicados en la regulación del reloj biológico en el tejido periférico y similares, y se cree que la concentración en sangre de cortisol aumenta al despertar por la mañana, para reajustar el reloj biológico. En células cultivadas, las células individuales habitualmente mantienen su ritmo de manera independiente. Los ritmos de expresión de los genes reloj pueden sincronizarse para inducir un ritmo circadiano mediante la estimulación con un factor de estimulación de señales tal como cortisol o forskolina. 35

Se muestran los resultados en la figura 2. Se confirmó que la expresión de Period1 y Bmal1 alcanza un pico aproximadamente 2 horas y aproximadamente 16 horas, respectivamente, tras la estimulación y que ambos genes se expresan de manera recurrente con un ritmo circadiano de aproximadamente 24 horas por ciclo.

Evaluación de las sustancias de prueba en el efecto de modulación de la expresión para un gen Period.

40 Los resultados mencionados anteriormente del sistema de evaluación usando células fibroblásticas de piel humana cultivadas demuestran que Period1 muestra un ritmo circadiano con un pico de expresión génica aproximadamente 2 horas tras la estimulación con un reactivo. Se evaluaron las sustancias de prueba para determinar el efecto de modulación de la expresión en un gen Period basándose en la cantidad de expresión génica 2 horas tras la estimulación. Para confirmar la inducción del ritmo de expresión para el gen Period, también se determinó la cantidad de expresión del gen Period1 16 horas tras la estimulación. 45

Se inocularon células fibroblásticas de piel humana normal (Cell Application, Inc.) según un método similar al usado anteriormente. Se añadió cada sustancia de prueba en el sexto día de cultivo hasta una concentración final de 100 ppm, y se recogieron las células 2 y 16 horas tras la estimulación. Se extrajo ARN de las células con un kit de extracción de ARN disponible comercialmente. Se determinaron las cantidades de expresión del gen Period1 mediante la tecnología RT-PCR que usa cebadores de PCR disponibles comercialmente (Perfect Real Time Primer, Takara Bio). 50

Además, también se determinó la expresión génica de manera similar para la ácido hialurónico sintetasa (HAS) implicada en la producción de ácido hialurónico que desempeña una función importante en la retención de humedad en la piel. Se conocen HAS1, HAS2 y HAS3 como HAS, y se examinó HAS2 como una ácido hialurónico sintetasa representativa. 55

Se cuantificaron las cantidades de expresión génica de un gen de mantenimiento RPLP0 y se usaron como patrón interno para calcular la expresión relativa de los genes diana con respecto a RPLP0. Se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett en las mediciones obtenidas, y se consideró que eran significativamente eficaces mediciones con un nivel de significación del 5% unilateral en comparación con el control.

- 5 La figura 3 muestra cantidades significativas de expresión génica del gen Period1 2 y 16 horas tras la adición de una variedad de sustancias de prueba y cortisol o forskolina como controles positivos.

A continuación, la tabla 1 muestra las cantidades relativas de expresión génica del gen Period1 2 horas tras la estimulación. Para algunas sustancias de prueba, se muestran también en la tabla 1 cantidades relativas de expresión génica del gen Has2 16 horas tras la estimulación.

- 10 [Tabla 1]

Sustancia de prueba	Cantidad relativa de expresión del gen Period1 (2 horas)	Cantidad relativa de expresión del gen Has2 (16 horas)
Control	0,23	4,6
Medicamento a base de plantas		
Árnica***	0,56**	
Extracto de té negro***	0,48*	
<i>Nuphar</i> ***	0,51**	
<i>Zanthoxylum</i>	0,42*	
Fragancia		
Enebro***	0,67*	163
Cedro***	0,7*	
Lavanda***	0,88**	
Clavo***	1,11**	
Ciprés***	1,29**	
Rosa***	0,75*	
Ylang-ylang***	1,08**	66**
Gálbano***	0,76*	
Petitgrain***	1,06**	
Pimienta***	1,44**	78,8**
Tomillo***	1,81**	
Albahaca***	0,68*	
Beta-cariofileno***	0,44*	

*. p<0,05, **: p<0,01

***: Ejemplo comparativo

- 15 Se demostró que el extracto de árnica, extracto de *Nuphar*, extracto de té negro, extracto de *Zanthoxylum*, aceite de enebro, aceite de cedro, aceite de lavanda, aceite de clavo, aceite de ciprés, aceite de rosa, aceite de ylang-ylang, aceite de gálbano, aceite de petitgrain, aceite de pimienta, aceite de tomillo, aceite de albahaca y beta-cariofileno, de los cuales sólo el extracto de *Zanthoxylum* es según la invención y todos los demás son ejemplos comparativos, así como los controles positivos de cortisol y forskolina, pueden inducir un ritmo de expresión con un pico 2 horas tras la estimulación, y aumentar significativamente las cantidades de expresión génica de Period1 y, en consecuencia, que estos medicamentos o fragancias a base de plantas pueden modular la expresión del gen Period.

- 20 Además, se sugirió que el enebro, ylang-ylang y pimienta como ejemplos comparativos pueden mejorar o aumentar las funciones de la piel potenciando la producción de ácido hialurónico, al demostrarse que promovían la expresión del gen Has2 16 horas tras la estimulación.

- 25 Cuando se usa el extracto de *Zanthoxylum* según la presente invención, puede usarse en combinación con un modulador de la expresión para un gen Bmal, que incluye, pero no se limita a, medicamentos a base de plantas tales como ciprés hinoki, *Chlorella*, lúpulo, *Zanthoxylum* y otros extractos; y fragancias tales como enebro, lavanda, eucalipto, olíbano, ciprés, palmarrosa, aguja de pino, rosa, ylang-ylang, elemí, petitgrain, pimienta, tomillo, manzanilla y otros aceites esenciales. Se ha confirmado que estos medicamentos a base de plantas o fragancias pueden inducir el ritmo de expresión del gen Bmal o promover su expresión, como resultado del examen del ritmo de expresión de genes Bmal en células fibroblásticas de piel cultivadas con Bmal1 como representativo. A continuación,
- 30 la tabla 2 muestra las cantidades relativas de expresión génica del gen Bmal1 16 horas tras la estimulación.

[Tabla 2]

Sustancia de prueba	Cantidad relativa de expresión del gen Bmal1 (16 horas)
Control	0,41
Medicamento a base de plantas	
Ciprés hinoki***	0,64**
<i>Chlorella</i> ***	0,63**
Lúpulo***	0,55*

<i>Zanthoxylum</i>	0,6**
Fragancia	
Enebro***	2,69**
Lavanda***	1,2**
Eucalipto***	1,73**
Olíbano***	1,09*
Ciprés***	1,13**
Palmarrosa***	1,07**
Aguja de pino***	1,26**
Rosa***	1,01*
Ylang-ylang***	4,25**
Elemí***	1,3**
Petitgrain***	1,13*
Pimienta***	1,98**
Tomillo***	1,5**
Manzanilla***	2,25**

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: Ejemplo comparativo

Ejemplos comparativos de composición

- 5 A continuación se facilitan ejemplos comparativos de composición. En los ejemplos de composición a continuación, se usa aceite de tomillo. Uno, o una mezcla de más de uno, de los medicamentos a base de plantas y/o fragancias que se describen anteriormente como que pueden modular la expresión del gen *Period* puede(n) estar contenido(s). Se representan todas las cantidades de composición en porcentaje en masa respecto a la cantidad total de cada producto.

[Fragancia]

(1) Alcohol	75,0
(2) Agua purificada	resto
(3) Dipropilenglicol	5,0
(4) Modulador de la expresión para gen <i>Period</i> (aceite de tomillo)	10,0
(5) Antioxidante	8,0
(6) Colorante	según sea necesario
(7) Absorbente UV	según sea necesario

[Ambientador]

(1) Alcohol	80,0
(2) Agua purificada	resto
(3) Antioxidante	5,0
(4) Modulador de la expresión para gen <i>Period</i> (aceite de tomillo)	3,0
(5) 3-Metil-3-metoxibutanol	5,0
(6) Dibencilidensorbitol	5,0

10 [Incienso]

(1) Polvo de makko	75,5
(2) Benzoato de sodio	15,5
(3) Modulador de la expresión para gen <i>Period</i> (aceite de tomillo)	5,0
(4) Aceite de eucalipto	1,0
(5) Agua purificada	resto

[Sales de baño]

(1) Sulfato de sodio	45,0
(2) Bicarbonato de sodio	45,0
(3) Aceite de lavanda	9,0
(4) Modulador de la expresión para gen <i>Period</i> (aceite de tomillo)	1,0

[Gel de masaje]

(1) Eritritol	2,0
(2) Cafeína	5,0
(3) Extracto de corteza de <i>Phellodendron amurense</i>	3,0
(4) Glicerina	50,0
(5) Polímero de carboxivinilo	0,4
(6) Polietilenglicol 400	30,0
(7) Edetato de trisodio	0,1
(8) Copolímero de polioxileno (10)-metilpolisiloxano	2,0
(9) Escualano	1,0

ES 2 567 160 T3

(10)	Hidróxido de potasio	0,15
(11)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	1,0

[Crema de masaje]

(1)	Parafina sólida	5,0
(2)	Cera de abeja	10,0
(3)	Vaselina	15,0
(4)	Parafina fluida	41,0
(5)	1,3-Butilenglicol	4,0
(6)	Monoestearato de glicerina	2,0
(7)	Éster de monolaurato de sorbitano POE (20)	2,0
(8)	Bórax	0,2
(9)	Caféina	2,0
(10)	Conservante	según sea necesario
(11)	Antioxidante	según sea necesario
(12)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	1,0
(13)	Agua purificada	resto

[Fibra aromática]

- 5 Se añadieron microcápsulas que contenían el modulador de la expresión para el gen Period (diámetro de partícula: no mayor de 50 μm (micrómetros); porcentaje de aceite esencial en la microcápsula: 50% en peso) a una disolución de celulosa de cupramonio (concentración de celulosa; 10% en peso; concentración de amonio: 7% en peso; concentración de cobre: 3,6% en peso) en el intervalo del 0,1% en peso al 20% en peso del peso de la celulosa, se mezcló y se hiló mediante un método de hilatura en húmedo convencional, y se obtuvo fibra aromática tras una etapa de refinado y una etapa de secado.

[Gránulos]

(1)	Sucralosa	0,1
(2)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	0,1
(3)	Saborizante	5,0
(4)	Excipiente (Ceolus)	10,0
(5)	Maltitol	resto

10 [Comprimidos (de tipo masticable)]

(1)	Inositol	11,0
(2)	Maltitol	21,0
(3)	Sacarosa	0,5
(4)	Extracto de esperma de salmón (DNA Na)	0,1
(5)	Extracto de levadura	0,1
(6)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	0,1
(7)	Saborizante	5,0
(8)	Excipiente	resto

[Comprimidos]

(1)	Lubricante (éster de ácido graso de sacarosa, etc.)	1,0
(2)	Disolución acuosa de goma arábiga (5%)	2,0
(3)	Acidulante	1,0
(4)	Colorante	según sea necesario
(5)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	0,1
(6)	Azúcares (azúcar en polvo, sorbitol, etc.)	resto

[Caramelo]

(1)	Azúcar	50,0
(2)	Sirope de almidón	47,95
(3)	Ácidos orgánicos	2,0
(4)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	0,05

[Chicle]

(1)	Azúcar	43,0
(2)	Base de chicle	30,95
(3)	Glucosa	10,0
(4)	Sirope de almidón	16,0
(5)	Modulador de la expresión para gen Period (aceite de tomillo)	0,05

- 15 Los productos de estos ejemplos de composición pueden regular la expresión del gen Period y modular el ritmo circadiano del organismo vivo mediante un uso de prueba de cada forma de producto de una manera típica de uso.

REIVINDICACIONES

1. Uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* para modular el ritmo circadiano para mejorar la piel áspera resultante de la disfunción de los ritmos circadianos induciendo ritmos de expresión de un gen Period o promoviendo la expresión de un gen Period.
- 5 2. Uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* según la reivindicación 1, en el que el extracto de *Zanthoxylum* se proporciona como formulación tópica para su aplicación sobre la piel.
3. Uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* según la reivindicación 2, en el que la formulación tópica incluye perfume, *eau de toilette*, colonia, crema, emulsión, base, polvo para la cara, barra de labios, jabón, champú y acondicionador, champú para el cuerpo, enjuague para el cuerpo, polvo para el cuerpo y jabón de baño.
- 10 4. Uso cosmético de extracto de *Zanthoxylum* según la reivindicación 2 ó 3, en el que la formulación tópica se proporciona en la forma de dosificación de un sistema a base de agua, sistema solubilizado, emulsión, sistema a base de aceite, gel, pasta, pomada, aerosol, sistema de dos fases de aceite-agua o sistema de tres fases de polvo-aceite-agua.

FIG.1

SISTEMA DE GENERACIÓN DE RITMO CIRCADIANO CON GENES CLOCK (SOLO BUCLE PRINCIPAL)

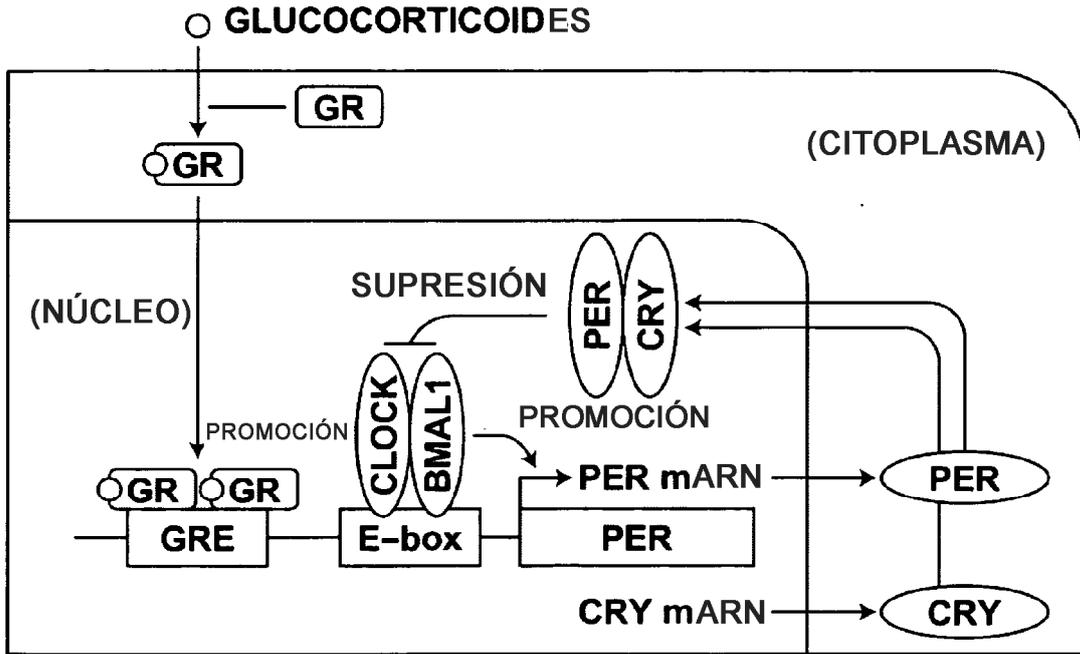
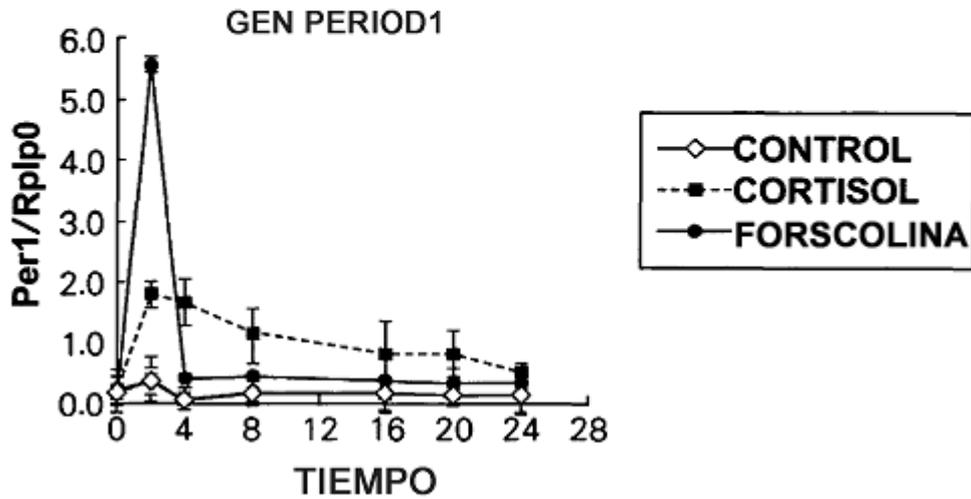


FIG.2

CANTIDAD DE EXPRESIÓN DE GEN CLOCK



CANTIDAD DE EXPRESIÓN DE GEN CLOCK

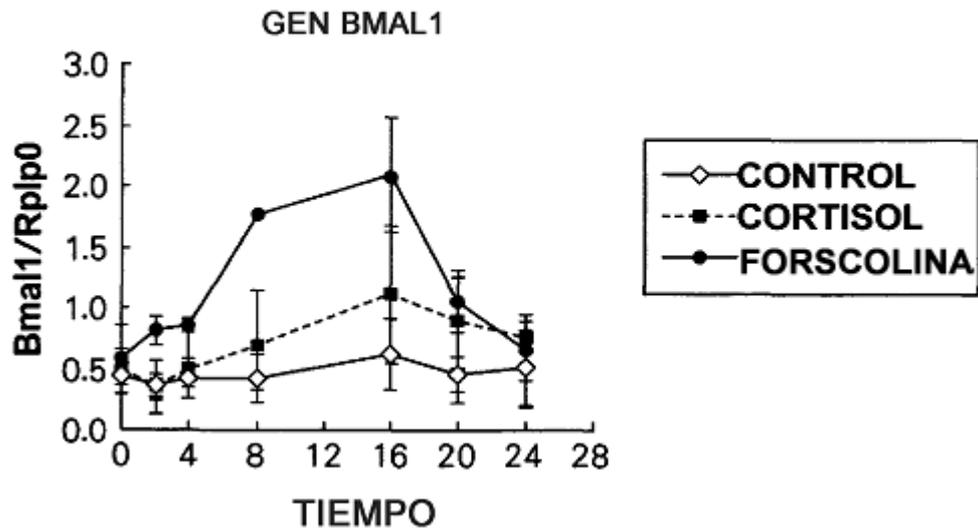


FIG.3

