

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 627**

51 Int. Cl.:

A61K 8/99 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 36/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2007 E 07716505 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2019594**

54 Título: **Extracto de R. miehei**

30 Prioridad:

11.01.2006 US 329146

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

25.04.2016

73 Titular/es:

**ACTIVE ORGANICS, INC. (100.0%)
1097 Yates Street
Lewisville, TX 75057, US**

72 Inventor/es:

**BISHOP, MICHAEL;
BISHOP, ELYSIANN;
GILLIS, GLEN y
SMITH, WALTER**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

Observaciones :

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

ES 2 567 627 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

Extracto de *R. miehei*.

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos cosméticos que comprenden la administración de composiciones dermocosméticas, que comprenden extractos de *Rhizomucor miehei* sustancialmente desprovistos de actividad de proteasa ácida.

10

Antecedentes de la invención

Para que la leche se coagule y, en último término, forme queso, deben añadirse enzimas que descompongan las proteínas que mantienen la leche en forma de líquido. Más particularmente, cuando las proteínas se desnaturalizan o se modifican de otro modo, la leche pierde su estructura líquida y empieza a coagularse. Durante mucho tiempo, en la elaboración de queso se han utilizado cuajos, unas enzimas coagulantes de la leche que se obtienen tradicionalmente del abomaso (cuarto estómago de la ternera). La principal enzima presente en el cuajo de ternera es la quimosina.

15

20

Sin embargo, el cuajo de ternera es caro y se ha ido sustituyendo cada vez más con cuajo derivado de microorganismos. La patente de Estados Unidos No. 4.526.792 da a conocer la utilización de *R. miehei* como cuajo microbiano en la elaboración de quesos. (Todos los documentos citados se incorporan como referencia en su parte relevante al presente documento). *R. miehei* no contiene quimosina, sino proteasas ácidas, que tienen una función similar a la quimosina.

25

Entre los extractos de *R. miehei* disponible comercialmente, diversos poseen algún grado de actividad enzimática, principalmente procedente de proteasas ácidas. Sin embargo, puede obtenerse un extracto sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida mediante la eliminación de la actividad enzimática por diversos procesos bioquímicos bien conocidos. El medio no enzimático resultante está sustancialmente desprovisto de actividad enzimática. Los expertos en la materia conocen bien diversos métodos para eliminar la actividad enzimática, entre los cuales se incluyen la cromatografía en columna de gel de afinidad y posterior elución del cuajo microbiano adsorbido. Véase, por ejemplo, Kobayashi y otros, "Rapid isolation of microbial milk-clotting enzymes by N-acetyl- (or N-isobutryl)-pepstatin-aminohexylagarose", Anal. Biochem., 122: 308-312 (1982) (cuajo microbiano de *R. miehei* purificado mediante columna de gel de afinidad utilizando N-acetilpepstatina como ligando de afinidad). Las enzimas también pueden separarse en columnas de gel de afinidad utilizando Cibacron Blue F3GA ("CB"). Véase, por ejemplo, Dean y otros, "Protein purification using immobilized triazine dyes," J. Chromatogr., 165: 301-319 (1979) y Burgett y otros, "Cibacron Blue F3GA affinity chromatography", Am. Lab., 9(5): 74, 78-83 (1977) (que describen la separación de enzimas en columnas CB, incluidas, por ejemplo, las cinasas y las nucleasas). La patente de Estados Unidos No. 4.743.551 da a conocer la utilización de un ligando de afinidad de colorante azul y la elución del cuajo adsorbido para producir un cuajo de *R. miehei* purificado. También puede obtenerse un extracto proteínico de *R. miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida por otras técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, incluidas la inactivación térmica y el tamiz molecular.

30

35

40

45

50

55

Existe un delicado equilibrio homeostático entre las velocidades de síntesis y de degradación en las células de la piel y de los tejidos conectivos subyacentes que contienen colágeno y elastina, las principales proteínas estructurales de la piel de los mamíferos. Este equilibrio permite que las células y los tejidos se regeneren, así como la reparación y sustitución de las células y tejidos dañados a causa de factores de estrés ambiental. Así, en el caso del colágeno, unas señales tanto endógenas como exógenas regulan la transcripción de ARNm de colágeno y su posterior traducción en subunidades de colágeno no estructurales, conocidas como procolágeno. Más particularmente, el procolágeno sufre una modificación postraduccional, incluida la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, dando hidroxiprolina e hidroxilisina. El procolágeno es susceptible de sufrir degradación por parte de las colagenasas, incluidas las metaloproteasas de matriz. Tras ser secretado a través del aparato de Golgi, el procolágeno se procesa hasta obtener colágeno mediante la eliminación proteolítica de las partes no colágenas del polipéptido (es decir, por la acción de proteasas). A continuación, las moléculas de colágeno se ensamblan en forma de fibrillas de colágeno maduro que, a su vez, se reticular y son más resistentes a las metaloproteasas.

60

Los signos visibles del envejecimiento (por ejemplo, las líneas finas y las arrugas) se correlacionan con una disminución del nivel de colágeno en la piel. Esto se puede atribuir tanto a una disminución de la síntesis de colágeno como al aumento de su degradación enzimática por las colagenasas, en particular la colagenasa I, también conocida como metaloproteasa de matriz 1 (MMP1). La actividad de degradación de la MMP1 está regulada por la concentración de un inhibidor endógeno de las proteasas, el inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz 1 (TIMP1).

65

Las composiciones de la técnica anterior han tratado de aumentar la síntesis de colágeno en la piel por una serie de mecanismos moleculares. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.846.812. El KTTKS es un pentapéptido derivado de un fragmento de la porción C-terminal del colágeno I. Ha sido estudiado con detalle en

Katayama y otros, "A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production," J. Biol. Chem., 268(14): 9941-9944 (1993).

Otra estrategia para reducir la aparición de los signos del envejecimiento ha consistido en promover la renovación celular epidérmica mediante la aplicación de exfoliantes. Dos clases ampliamente utilizadas de exfoliantes bien conocidas por los expertos en la técnica son las proteasas ácidas (por ejemplo, de tipo catepsina D), véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6.656.701 y 6.569.437, y los ácidos hidroxicarboxílicos (por ejemplo, ácidos alfa-hidroxi, como el ácido glicólico). En el documento US 6.303.752 B1 se han dado a conocer preparaciones para reducir la alergenicidad; el documento EP 1 514 537 A2 da a conocer agentes anti-envejecimiento que comprenden un hidrolizado de levadura tratado con peróxido de hidrógeno; el documento US 5.597.558 da a conocer la utilización de extractos de bacterias filamentosas como agentes cosméticos para combatir el envejecimiento de la piel.

En un póster presentado en la reunión anual de febrero del 2005 de la American Academy of Dermatology de Nueva Orleans, Leyden y otros describieron la utilización de un extracto botánico de *R. miehei* con actividad de tipo catepsina D para potenciar la renovación celular epidérmica (es decir, la exfoliación) y, de este modo, mejorar la apariencia de la piel dañada por el medio ambiente. Sorprendentemente, el extracto proteínico de *R. miehei*, según la presente invención, que está sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida, reduce la aparición de los signos del envejecimiento por un modo primario de acción no basado en la exfoliación.

Por consiguiente, persiste una necesidad largamente experimentada, pero hasta el momento no satisfecha, de aumentar el colágeno I por regulación al alza del gen o genes que codifican la síntesis de colágeno I, y/o de disminuir los niveles de MMP1, ya sea mediante la regulación al alza del gen o genes que codifican el TIMP1 o mediante la regulación a la baja del gen o genes que codifican la expresión de MMP1. Estas necesidades se satisfacen mediante el extracto proteínico utilizado en la presente invención. Sorprendentemente, el extracto de *R. miehei* utilizado en la presente invención, que está sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida, regula al alza la expresión no sólo de los genes mencionados anteriormente, sino que también regula significativamente al alza la expresión de genes que codifican la fibronectina y la vimentina (glicoproteínas de la matriz extracelular que participan en la adhesión, la diferenciación y la migración celulares), así como la procolágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa (una enzima que participa en la reticulación del procolágeno para formar fibras de colágeno empaquetadas maduras).

Características de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos cosméticos que comprenden la administración de composiciones dermocosméticas, que comprenden extracto de *Rhizomucor miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida, que regula al alza la expresión del gen o genes que codifican el colágeno I, ayudando de este modo a reducir la aparición de los signos del envejecimiento, en un vehículo dermatológicamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

La composición tópica que se utiliza en la presente invención comprende extracto de *Rhizomucor miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida en un vehículo dermatológicamente aceptable.

Para los fines de la presente invención, "sustancialmente desprovista de actividad de proteasa ácida" se refiere a una composición en la que la proteasa o proteasas ácidas combinadas presentes tienen una actividad combinada específica de proteasa ácida menor de aproximadamente 500 unidades HUT/mg. En una realización preferente, la actividad combinada específica de proteasa ácida es menor de aproximadamente 50 unidades HUT/mg. Aún más preferentemente, la actividad combinada específica de proteasa ácida es menor de aproximadamente 10 unidades HUT/mg.

La actividad combinada de proteasa ácida se mide utilizando la siguiente variación del método descrito en Food Chemicals CODEX, págs. 496-497 (Washington, DC: National Academy Press, 1981): se prepara sustrato de hemoglobina mezclando 2 g de hemoglobina bovina en 80 ml de agua destilada. A continuación, la solución se valora hasta un pH de 2 mediante la adición, por ejemplo, de ácido fosfórico y/o ácido cítrico. Se añade agua destilada adicional hasta tener un volumen total de 100 ml. La solución se separa en cuatro porciones iguales. Cada porción se valora hasta el pH deseado con hidróxido sódico al 50% o ácido clorhídrico al 50%. Estas soluciones finales se calientan a 30°C durante 20 minutos y luego se filtran a través de lana de vidrio. Se prepara una solución madre de ácido tricloroacético ("TCA") disolviendo TCA en agua destilada hasta una concentración final de TCA del 5%.

Para cada muestra para la que debe medirse la actividad proteolítica, se preparan tubos marcados con una "B" o una "T". En cada tubo se introducen 4 ml de la solución de hemoglobina y se dejan a 37°C, de modo que la muestra se precalienta a 37°C. En el tubo "T" se añaden 100 µg de solución enzimática, se agita suavemente y se incuba a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añaden 10 ml de solución madre de TCA a cada tubo. En el tubo "B" se añade una cantidad de la enzima igual a la añadida en el tubo "T". (Éste será el control para la absorbancia de

fondo). Se centrifuga cada tubo y se filtra cada muestra a través de un filtro de jeringa, y la muestra filtrada se coloca en una cubeta de cuarzo para leer la absorbancia a 280 nm. La absorbancia real se determina restando la absorbancia de fondo a la absorbancia de la muestra "T". Puede generarse una curva estándar midiendo cantidades conocidas de proteasa.

5 Una unidad HUT de actividad proteolítica se define como la cantidad de enzima que, durante un minuto y a las condiciones especificadas para el ensayo, produce un hidrolizado cuya absorbancia a 280 nm es la misma que la de una solución que contiene 1,10 µg por ml de tirosina en ácido clorhídrico 0,006 N. La unidades HUT por gramo se determinan mediante la siguiente fórmula:

$$10 \quad \text{HUT/g} = (\text{absorbancia a 280 nm} \times V) / (0,0084 \times T \times W)$$

en la que V es el volumen final de la solución de ensayo,

15 T es el tiempo de reacción en minutos, y

W es el peso en seco de la muestra de enzima original utilizada en el ensayo

20 La concentración de proteína se determina por un método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, el método de Bradford, que se describe en Ausubel y otros, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994).

Rhizomucor miehei

25 *R. miehei* es un artículo disponible comercialmente a través de diversas fuentes, por ejemplo a través de Valley Research Inc. (South Bend, Indiana) y Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

Se obtiene *R. miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida por tamiz molecular, inactivación térmica y cromatografía en gel de afinidad de pepstatina.

30 En la presente invención, *R. miehei* está presente en una concentración menor de aproximadamente 500 unidades HUT/mg. En una realización preferente, la actividad combinada específica de proteasa ácida es menor de aproximadamente 50 unidades HUT/mg. Aún más preferentemente, la actividad combinada específica de proteasa ácida es menor de aproximadamente 10 unidades HUT/mg.

Vehículo dermatológicamente aceptable

35 La presente invención comprende, además, un vehículo dermatológicamente aceptable adecuado para la aplicación tópica sobre el tejido queratinoso y compatible con los ingredientes activos dermocosméticos que se describen a continuación. Dicho vehículo puede presentarse en una amplia variedad de formas, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de agua en silicona, emulsiones de silicona en agua, emulsiones de agua en aceite en agua y de aceite en agua en aceite, y emulsiones de aceite en agua en silicona. Entre los surfactantes adecuados se incluyen surfactantes aniónicos, catiónicos, anfóteros, zwitteriónicos y no iónicos, incluidos los indicados en la patente de Estados Unidos No. 6.197.319.

45 En el International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook (10ª edición, 2004), publicado por la Cosmetic, Toiletries & Fragrance Association, se describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y dermofarmacéuticos no limitativos de uso común en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su utilización en combinación con el extracto de *R. miehei* de la presente invención. Entre los ejemplos de estos ingredientes se incluyen: antioxidantes, agentes antiinflamatorios, agentes antiacné, agentes antimicrobianos, astringentes, humectantes, hidratantes, reguladores del pH, agentes despigmentantes/iluminadores de la piel, agentes calmantes/cicatrizantes de la piel, que ayudan a disminuir la aparición de los signos del envejecimiento.

50 Entre los ejemplos no limitantes de ingredientes antiacné adecuados para su utilización en las composiciones de la presente invención se incluyen: resorcinol, azufre, ácido salicílico, peróxido de benzoilo, eritromicina y zinc. En la patente de Estados Unidos No. 5.607.980 se describen otros ejemplos de sustancias activas antiacné adecuadas.

55 Entre los ejemplos no limitantes de agentes despigmentantes e iluminadores de la piel que pueden administrarse por vía tópica en la presente invención se incluyen: hidroquinona, ácido kójico, glabridina, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio y ascorbil glucosamina.

60 Entre los ejemplos no limitantes de ingredientes antioxidantes/captadores de radicales adecuados para su utilización en las composiciones de la presente invención se incluyen: ácido ascórbico (vitamina C) y sus sales, ésteres de ascorbilo de ácidos grasos, derivados del ácido ascórbico (por ejemplo, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil fosfato de sodio, sorbato de ascorbilo); tocoferol (vitamina E) y sus ésteres, entre ellos sorbato de tocoferol, acetato de tocoferol; ácidos hidroxibenzoicos butilados y sus sales; ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; ácido

gálico y sus ésteres de alquilo, especialmente galato de propilo; ácido úrico y sus sales y ésteres de alquilo; ácido sórbico y sus sales; ácido lipoico; aminos (por ejemplo, N,N-dietilhidroxilamina, amino-guanidina); compuestos de sulfhidrilo (por ejemplo, glutatión); coenzima Q10 y sus análogos, incluida, sin limitación, idebenona; ácido dihidroxifumárico y sus sales; pidolato de licina; pilolato de arginina; ácido nordihidroguayarático; bioflavonoides; curcumina; lisina; 1-metionina; prolina; superóxido dismutasa; silimarina; extractos de té; extractos de piel/semilla de *Vitis vinifera* (vid); melanina; y extractos de *Rosmarinus officinalis* (romero).

Entre los ejemplos no limitantes de agentes calmantes y/o cicatrizantes de la piel adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen: alantoína, aloe vera y sus derivados, ácido betulínico, bisabolol, glicirricinato dipotásico, ácido oleonólico, pantenol y sus derivados, ácido pantoténico y sus derivados, y ácido ursólico.

Entre los ejemplos no limitantes de agentes que ayudan a disminuir la aparición de los signos del envejecimiento se incluyen mucopolisacáridos (incluido el ácido hialurónico), aldosaminas (incluidas las n-acetil glucosaminas) y péptidos de cadena corta biológicamente activos (por ejemplo, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos y hexapéptidos, y mezclas de los mismos).

En una realización preferente de la presente invención, uno o más de los ingredientes cosméticos son derivados de origen botánico (por ejemplo, extractos).

Entre los agentes antibacterianos derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, extracto de *Laurus nobilis* (laurel), extracto de *Larrea divaricata* (jarilla hembra), extracto de *Rosa canina* (escaramujos) y extracto de *Scutellaria galericulata* (escutelaria).

Entre los agentes antifúngicos derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, extracto de *Laurus nobilis* (laurel), extracto de *Commiphora myrrha* (mirra) y extracto de *Melaleuca alternifolia* (aceite esencial del árbol del té).

Entre los agentes antiinflamatorios derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, extracto de *Iris versicolor* (lirio azul), extracto de *Calendula officinalis* (caléndula), extracto de *Chamomilla recutita* (manzanilla), extracto de *Tussilago farfara* (uña de caballo), extracto de hojas de *Symphytum officinale* (consuelda), extracto de *Tanacetum parthenium* (matricaria), extracto de *Panax ginseng* (ginseng), extracto de *Gynostemma pentaphyllum* (jiaogulan), extracto de *Aesculus hippocastanum* (castaño de Indias), extracto de *Camellia oleifera* (té verde japonés), extracto de *Tilia cordata* (tilo), extracto de *Althea officinalis* (malvaisco), extracto de *Viola tricolor* (pensamiento), extracto de *Mentha pulegium* (poleo), extracto de *Vinca minor* (hierba doncella), extracto de semilla de *Chaenomeles japonica* (membrillo japonés), extracto de *Anthemis nobilis* (manzanilla romana), extracto de *Valeriana officinalis* (valeriana) y extracto de *Viola odorata* (violeta).

Entre los agentes derivados botánicamente preferentes que ayudan a disminuir la aparición de los signos del envejecimiento se incluyen los que estimulan la producción de colágeno. Entre los ejemplos no limitantes de estos ingredientes se incluyen el ácido asiático, el ácido madecásico y el asiaticósido.

Entre los antioxidantes derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, extractos de *Camellia oleifera* (té verde japonés), extractos de semilla de *Vitis vinifera* (vid), extractos de *Punica granatum* (granada), extractos de *Citrus grandis* (pomelo), bioflavonoides, extractos de *Panax ginseng* (ginseng), extractos de *Gynostemma pentaphyllum* (jiaogulan), resveratrol, antocianidinas, monoterpénoides, diterpenoides y triterpenoides.

Entre los agentes astringentes derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, extracto de *Citrus medica limonum* (limón), extracto de *Citrus aurantifolia* (lima), extracto de *Artium lappa* (bardana), extracto de *Nasturtium officinale* (berro), extracto de *Hedera helix* (hiedra), extracto de *Hamamelis virginiana* (avellano de bruja), extracto de corteza de raíz de *Myrica cerifera* (arrayán), extracto de *Quercus alba* (roble blanco), extracto de *Echinacea purpurea* (equinácea), extracto de *Echinacea augustifolia* (equinácea de hoja estrecha), extracto de *Eugenia caryophyllus* (aceite de clavo), extracto de *Capsicum annuum* (pimienta de cayena), extracto de *Mentha piperita* (aceite de menta piperita) y extracto de *Melaleuca alternifolia* (aceite del árbol del té).

Entre los agentes hidratantes derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, pectina, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos extraídos de *Aloe barbedensis*, algas, plantas acuáticas y plantas de pradera marina.

Entre los agentes despigmentantes/iluminadores de la piel derivados botánicamente preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, arbutina y glabridina.

Los extractos botánicos mencionados anteriormente están disponibles comercialmente a través de Active Organics LP (Lewisville, Texas).

65

5 También pueden utilizarse sustancias activas como filtro solar en combinación con el extracto de *R. miehei* de la presente invención. Entre éstos se incluyen los filtros solares que figuran actualmente en el monográfico Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use Final Monograph de la US Food and Drug Administration, publicado en el registro federal 64, págs. 27.666-27.693 (21 de mayo de 1999). El uso de otros ingredientes activos como filtro solar está aceptado en países distintos de los Estados Unidos, y se considera que también éstos entran dentro del alcance de la presente invención.

10 Los ingredientes dermatofarmacéuticos que pueden utilizarse en combinación con el extracto de *R. miehei*, utilizado en la presente invención, se dan a conocer en la patente de Estados Unidos No. 6.277.892, en Kerdel y otros, Dermatologic Therapeutics (2005), y en Hardman y otros, Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics (10ª edición, 2001). En la patente de Estados Unidos No. 6.492.326, se dan a conocer otros ejemplos de ingredientes cosméticos y/o dermatofarmacéuticos adecuados para su utilización en el sistema de administración de la presente invención.

15 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Los componentes e ingredientes específicos se presentan como típicos, y pueden derivarse diversas modificaciones a la vista de la descripción anterior dentro del alcance de la presente invención. En estos ejemplos, el extracto proteínico de *R. miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida se designa por su nombre comercial Actipeptide® M, de Active Organics, LP (Lewisville, Texas). Todos los porcentajes, relaciones y proporciones indicados a continuación son en peso, a menos que se especifique lo contrario. Todas las temperaturas se expresan en grados Celsius, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos de formulación

25 Tónico

Agua desionizada	93,190%
Methyl Gluceth-20	1,000%
Sorbato de potasio	0,100%
Benzoato de sodio	0,100%
Fenoxietanol	0,600%
Ácido cítrico	0,010%
Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%

Añadir los ingredientes secuencialmente en el orden indicado. Mezclar hasta que quede transparente. Finalizar el proceso.

30

Crema facial

Parte A

Agua desionizada	62,600%
Silicato de magnesio y aluminio	0,400%
Goma de xantano	0,150%
Acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C ₁₀₋₃₀	0,750%

35 Parte B

Butilenglicol	4,000%
EDTA disódico	0,050%

Parte C

Lecitina hidrogenada	0,500%
Triglicérido caprílico/cáprico	8,000%
Aceite de semilla de <i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba)	5,000%
Palmitato de octilo	4,000%
Alcohol cetearílico	2,000%
Estearato de PEG-8	1,000%
Estearato de PEG-100	0,800%

Parte D

Trietanolamina 99%	0,100%
--------------------	--------

ES 2 567 627 T3

Parte E

Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10x, Active Organics)	5,000%
Fenoxietanol	0,500%
Sorbato de potasio	0,100%
Metilisotiazolinona	0,050%
Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%

- 5 Espolvorear silicato de magnesio y aluminio, goma de xantano, acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀ en un vórtice de agua. Mezclar y calentar hasta 80°C. Añadir la parte B a la parte A, mezclar y mantener la temperatura hasta 80°C. En un recipiente separado, mezclar la parte C y calentar hasta 75°C, mezclar hasta que quede transparente. Añadir la parte C a las partes A y B, mezclar durante 10 minutos. Añadir la parte D a las partes ABC. Mezclar durante 15 minutos. Cambiar a mezclado por barrido. Enfriar el lote a 45°C. En un recipiente separado, añadir los ingredientes de la parte E. Mezclar hasta uniformidad. A 45°C, añadir la parte E a las partes ABCD. Mezclar y enfriar a 25°C. Finalizar el proceso.

Crema de ojos

Parte A

Agua desionizada	57,650%
Acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C ₁₀₋₃₀	0,300%
Pantenol	0,100%
Sorbato de potasio	0,100%
EDTA disódico	0,100%
Alantoína	0,100%

- 15 **Parte B**
- | | |
|--|--------|
| Triglicérido caprílico/cáprico | 2,000% |
| Dimeticona | 3,000% |
| <i>Butyrospermum parkii</i> (manteca de karité) | 2,000% |
| Aceite de semilla de <i>Carthamus tinctorius</i> (cártamo) | 2,000% |
| Alcohol cetearílico | 1,500% |
| Dimeticonol | 1,300% |
| Steareth-2 | 1,000% |
| Steareth-21 | 0,500% |
| Ciclometicona | 5,000% |

Parte C

Trietanolamina	0,250%
----------------	--------

- 20 **Parte D**
- | | |
|----------------------------|---------|
| Carbómero 940, solución 2% | 10,000% |
|----------------------------|---------|

Parte E

Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%
---	--------

Parte F

Hialuronato de sodio (Actimoist® Bio 2, Active Organics)	2,000%
Phenonip	1,000%
Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10X, Active Organics)	5,000%
Tocoferol	0,100%

- 25 Espolvorear acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀ en un vórtice de agua. Mezclar y calentar hasta 75°C. Mezclar y calentar la parte B hasta 70°C. Añadir la parte B a la parte A, mezclar durante 10 minutos. Añadir la parte C. Mezclar durante 10 minutos. Añadir la parte D. Mezclar y enfriar a 45°C. A 45°C, añadir las partes E y F. Mezclar y enfriar a 25°C. Finalizar el proceso.

30

ES 2 567 627 T3

Barra de labios

Parte A

Aceite de semilla de <i>Ricinus communis</i> (ricino)	24,37%
Palmitato de octilo	33,33%
Vaselina	10,84%
Cera de abejas	3,33%
Cera de parafina	3,33%
Cera de <i>Euphorbia cerifera</i> (candelilla)	5,20%
Ozoquerita	3,00%
Cera de <i>Copernicia cerifera</i> (carnauba)	2,50%
Aceite de semilla de <i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba)	8,00%
Propilparabeno	0,10%

5 Parte B

Isoestearato del oliglicerilo-4	1,00%
Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,00%

Mezclar y calentar la parte A hasta 80°C. Premezclar la parte B; añadir a la parte A. Mezclar y verter en el recipiente.

10 Máscara facial

Parte A

Agua desionizada	59,960%
Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10X, Active Organics)	5,000%
Glicerina	4,000%
Cafeína	0,100%
Goma arábica	0,300%
Verde de óxido de cromo	0,500%
Dióxido de titanio	3,000%
Metilparabeno	0,200%

Parte B

Estearato de glicerilo	6,000%
Aceite de semilla de <i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba)	1,500%
Acetato de tocoferilo	0,100%
Propilparabeno	0,100%

15 Parte C

Bentonita	11,000%
-----------	---------

Parte D

Fenoxietanol	0,500%
Ácido cítrico 50%	2,100%
Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%

Parte E

Aceite esencial (hierbabuena)	0,070%
Aceite esencial (menta piperita)	0,070%

20 Mezclar y calentar la parte A hasta 75°C. Mezclar y calentar la parte B hasta 75°C. Homogeneizar la parte A, luego añadir la parte B, continuar mezclando en el homogeneizador durante 5 minutos. Empezar a enfriar. A 60°C, añadir la parte C; mezclar bien. Continuar enfriando. A 45°C, añadir las partes D y E. Mezclar y enfriar a 25°C. Finalizar el proceso.

25 Champú hidratante

Parte A

Agua desionizada	46,680%
Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10X, Active Organics)	10,000%

ES 2 567 627 T3

	Parte B	
	Sulfonato sódico de olefina C14-16	18,000%
	Cocamidopropilbetaína	18,000%
	Glucamate DOE-120	1,000%
	Parte C	
	Fenoxietanol	0,300%
	Kathon CG	0,020%
	Cloruro de sodio, solución al 25%	c. s.
	Butilenglicol y extracto de <i>Spiraea ulmaria</i> (Actiphyte® Queen of Meadow Concentrate, Active Organics)	1,000%
5	Parte D	
	Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%
	Mezclar y calentar la parte A hasta 50°C. Añadir la parte B a la parte A; mezclar hasta que quede transparente. Añadir las partes C y D a las partes A y B. Mezclar y enfriar a 25°C. Finalizar el proceso.	
10	Acondicionador hidratante	
	Parte A	
	Agua desionizada	64,670%
	Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10X, Active Organics)	5,000%
	Pantenol	0,200%
	Parte B	
	Aceite de jojoba	2,000%
	Metosulfato de behentrimonio, alcohol cetearílico	4,000%
	Estearamidopropil dimetilamina	2,000%
	Alcohol cetearílico	4,500%
	Estearato de PEG-100	0,880%
	Estearato de glicerilo	1,200%
15	Parte C	
	Agua, feniltrimeticona, ciclometicona, polisilicona-11, lecitina (Actiprime® 100, Active Organics)	10,000%
	Parte D	
	Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%
	Fenoxietanol	0,500%
	Metilisotiazolinona	0,050%
20	Mezclar y calentar la parte A hasta 75°C. Mezclar y calentar la parte B hasta 75°C. Añadir la parte B a la parte A; tras mezclar, añadir la parte C y mezclar. Enfriar hasta 45°C, luego añadir la parte D. Mezclar y enfriar a 25°C. Finalizar el proceso.	
25	Suero facial	
	Parte A	
	Agua desionizada	80,850%
	Keltrol RD	0,250%
	Butilenglicol	0,400%
	Parte B	
	Agua	0,600%
	Sorbato de potasio	0,100%
30	Parte C	
	Agua, extracto de algas y jugo de hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Actisea® 100, Active Organics)	5,0%

Parte D

Jugo de la hoja de <i>Aloe barbadensis</i> (Activera® 10x, Active Organics)	5,000%
Fenoxietanol	0,600%
Neolone 950	0,050%
Extracto de <i>Mucor miehei</i> , butilenglicol y N-acetilglucosamina (Actipeptide® M, Active Organics)	5,000%

Parte E

Agua	2,000%
Alantoína	0,1%
EDTA disódico	0,05%

- 5 Mezclar la parte A. Añadir la parte B predisuelta; mezclar hasta uniformidad. Añadir la parte C; mezclar hasta uniformidad. Añadir la parte D; mezclar bien. Añadir la parte E predisuelta, mezclar hasta uniformidad. Finalizar el proceso.

Pruebas clínicas

- 10 La reducción de la aparición de los signos del envejecimiento se documenta mediante cuatro tipos de estudios clínicos bien conocidos por los expertos en la materia: (i) hidratación de la piel a partir de mediciones de impedancia; (ii) firmeza de la piel mediante balistometría; (iii) reducción de las arrugas mediante la evaluación de las líneas faciales superficiales; (iv) suavidad de la piel mediante réplicas y análisis digital de imágenes. En cada estudio, doce
- 15 sujetos femeninos, con edades comprendidas entre 40 - 60, con una piel normal y/o normal a seca y que muestra signos de envejecimiento, se aplican la siguiente fórmula dos veces al día en una cantidad de 3 mg/cm²:

Parte A	Agua	70,40
	Butilenglicol	10,00
Parte B	Ácido esteárico	2,50
	Triglicérido caprílico/cáprico	3,00
	Estearato de glicerilo	3,50
	Estearato de PEG-100	2,00
	Alcohol cetearílico	1,00
	Cetareth-20	1,00
	Dimeticona	0,60
Parte C	Fenoxietanol	0,72
	Metilparabeno	0,16
	Etilparabeno	0,04
	Propilparabeno	0,02
	Butilparabeno	0,04
	Isobutilparabeno	0,02
Parte D	Actipeptide® M	5,00

- 20 La fórmula anterior se produce de acuerdo con el siguiente procedimiento: Mezclar y calentar la parte A hasta 75°C. Mezclar y calentar la parte B en un recipiente separado hasta 75°C. Añadir la parte B a la parte A. Mezclar bien y enfriar el lote a 45°C. Añadir la parte C al lote mientras se mezcla. Añadir la parte D. Mezclar y enfriar a 25°C.

- 25 En el momento de realizar el estudio, los sujetos de ensayo no están utilizando Retin-A o análogos, corticosteroides, peróxido de benzoilo y/o antibióticos tópicos, ni han utilizado estos productos en los seis meses anteriores. Análogamente, los sujetos tampoco se han sometido a peelings faciales ni dermoabrasión en el último año. Además, los sujetos no presentan psoriasis, eczema ni dermatitis atópica.

- 30 Una semana antes de iniciar el estudio, los sujetos dejan de utilizar productos para el cuidado de la piel (por ejemplo, crema hidratante, filtro solar, maquillaje líquido). Además, se les facilita una pastilla de jabón (Neutrogena) para que se laven toda el área facial tan a menudo como deseen. Este período de equilibrado de la piel ayuda a garantizar que todos los sujetos se encuentran en un valor basal y ayuda a minimizar la posible confusión con regímenes de cuidado de la piel anteriores. El primer día después del equilibrado de una semana de la piel, se dan instrucciones a todos los participantes en el estudio sobre cómo utilizar los productos de ensayo. Se indica a los sujetos que se laven únicamente con el jabón Neutrogena durante todo el estudio de ocho semanas.

- 35 El contenido de humedad de la piel se evalúa mediante mediciones de impedancia en la zona de la mejilla de los sujetos utilizando un Novameter DPM. Al final del período de equilibrado de la piel de una semana, se toman dos mediciones separadas en cada sujeto y se promedian. El promedio basal de 95,8 indica el estado relativamente seco de la piel de los sujetos. Tal como se recoge en la siguiente tabla, se observan unos aumentos significativos
- 40 del contenido de humedad de la piel, del 16,5%, el 19% y el 24,2%, tras dos, cuatro y ocho semanas de tratamiento:

ES 2 567 627 T3

<u>Sujeto</u>	<u>Valor basal</u>	<u>2 semanas</u>	<u>4 semanas</u>	<u>8 semanas</u>
1	90	112	111	113
2	98	101	107	110
3	98	116	121	124
4	98	110	111	114
5	95	114	116	119
6	90	100	104	121
7	93	122	124	122
8	94	115	114	118
9	97	121	127	131
10	99	111	117	115
11	95	112	110	115
12	103	106	106	126
Promedio	95,8	111,7	114,0	119,0
% de variación		16,5	19,0	24,2

- 5 La firmeza de la piel se evalúa mediante un balistómetro (a medida, de Dermac Labs, Conn). Tal como conocen los expertos en la materia, un balistómetro deja caer un péndulo sobre la superficie de la piel y mide el patrón de rebote resultante. Más particularmente, se calcula la relación entre la altura del primer y el segundo picos de rebote. Tal como se recoge en la siguiente tabla, tras cuatro y ocho semanas de tratamiento se observan aumentos significativos de la firmeza de la piel, del 21,8% y el 25,9%.

<u>Sujeto</u>	<u>Valor basal</u>	<u>2 semanas</u>	<u>4 semanas</u>	<u>8 semanas</u>
1	3,23	3,11	2,56	2,42
2	4,12	3,45	3,05	3,04
3	4,67	4,64	3,2	2,87
4	4,05	3,9	3,34	3,19
5	5,12	4,67	4,03	3,77
6	3,8	3,6	2,96	2,8
7	4,03	3,54	3,21	3,04
8	3,5	3,26	2,93	2,7
9	3,56	3,4	2,86	2,67
10	3,78	3,67	3,05	3,1
11	4,1	3,86	3,05	2,89
12	3,92	3,86	3,2	2,97
Promedio	3,99	3,75	3,12	2,96
% de variación		-6,1	-21,8	-25,9

- 10 Se evalúan las líneas faciales superficiales (SFL) por el método de Packman y Gans, "Topical Moisturizer: Quantification of their effects on Superficial Facial Lines," J. Soc. Cosmet. Chem. 29: 79-90, (1978). A las dos semanas, cuatro semanas y ocho semanas, se puntúan la profundidad, la poca profundidad y el número de SFL dentro de un área definida alrededor del ojo. Se observan reducciones del 22,4%, el 36,4% y el 42,3% tras dos, cuatro y ocho semanas.

<u>Sujeto</u>	<u>Valor basal</u>	<u>2 semanas</u>	<u>4 semanas</u>	<u>8 semanas</u>
1	21	17	14	12
2	14	11	10	9,5
3	16,5	14	11,5	11
4	22	17	12,5	12
5	17,5	13	9	10
6	19	15	13	12
7	16	12	11	10
8	18	12,5	10	8,5
9	19,5	16	13	11
10	22	18,5	14,5	12
11	18,5	12,5	10	10
12	17	13	12	9,5
Promedio	18,42	14,29	11,71	10,63
% de variación		-22,4	-36,4	-42,3

- 15 También se miden los cambios en las líneas finas, las arrugas y la textura de la piel tomando réplicas con Silflo de las zonas de las comisuras de los ojos izquierdo y derecho. Se colocan anillos adhesivos en cada zona de comisura y se introduce material de replicación de silicio dental dentro de los anillos. Una vez que se seca el silicio (2-3 minutos), el mismo se retira y las réplicas se etiquetan con el número de sujeto y la fecha. Se escanean fotografías en blanco y negro de las réplicas y se convierten en píxeles en blanco y negro, donde los píxeles negros resaltan las líneas y las arrugas. El número total de píxeles blancos (no-arrugas) y negros (arrugas y líneas) se compara con un
- 20

valor umbral predeterminado. Se observan reducciones en las líneas finas y las arrugas del 14,1%, el 21% y el 30,1%, respectivamente, a las dos, cuatro y ocho semanas.

<u>Sujeto</u>	<u>Valor basal</u>	<u>2 semanas</u>	<u>4 semanas</u>	<u>8 semanas</u>
1	10.294	10.203	9.506	8.324
2	13.211	11.045	10.405	9.045
3	16.237	12.495	11.450	10.302
4	16.203	12.402	10.890	9.940
5	11.034	9.820	9.340	7.894
6	12.405	10.808	9.937	8.094
7	13.002	11.056	10.485	10.003
8	9.579	9.304	8.765	6.794
9	12.200	10.365	10.038	8.905
10	8.567	8.340	8.244	7.892
11	12.345	10.869	9.450	8.732
12	15.230	12.405	10.203	9.122
Average	12.525,58	10.759,33	9.892,75	8.753,92
% Change		-14,1	-21,0	-30,1

5 Análisis de micromatrices de ADN

El efecto del extracto proteínico de *R. miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa ácida sobre la expresión de determinados genes se analiza utilizando micromatrices de ADN, tal como se describe a continuación.

10 Las células cultivadas se cultivan en una placa de 6 pocillos hasta confluencia utilizando unas condiciones de cultivo adecuadas. Al alcanzar la confluencia, tres de los seis pocillos se tratan con medio de cultivo suplementado con material de ensayo a una concentración del 1%. Los tres pocillos restantes se tratan con medio de cultivo solo y actúan como control. Tras aplicar el material de ensayo, las células se incuban durante 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y $5 \pm 1\%$ de CO_2 . Al final del período de incubación, el medio de cultivo se elimina por aspiración y las células se lavan una vez con tampón fosfato salino ("PBS") frío, utilizando aproximadamente 1 ml por pocillo. Tras el lavado, se añade una solución de tripsina/EDTA a los pocillos para separar las células. A continuación, se añade solución de neutralización de tripsina a los pocillos. Las células tratadas y las células no tratadas se reservan en tubos de centrifuga independientes de 15 ml y se sedimentan por centrifugación a 1.000 rpm a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Tras eliminar el sobrenadante, las células sedimentadas se lisan mediante la adición de 300 ml de solución de lisis de tiocianato de guanidinio a cada tubo y luego aspirando y liberando repetidamente la solución en la pipeta hasta que se disuelve el sedimento celular. Los lisados celulares se almacenan a -75°C hasta que se completa el proceso de extracción de ARN, tal como se describe a continuación.

25 Alternativamente, pueden utilizarse tejidos cultivados. Las muestras de tejido se extraen de la bandeja de transporte y se colocan en una placa de 6 pocillos que contiene 2,5 - 5,0 ml de medio de ensayo ($37 \pm 2^\circ\text{C}$). Se incuban durante, como mínimo, 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y $5 \pm 1\%$ de CO_2 . Tras esta incubación inicial, el medio de ensayo se sustituye con 2,5 - 5,0 ml de medio fresco ($37 \pm 2^\circ\text{C}$). Se aplican 25-50 ml de material de ensayo o tampón fosfato salino (control negativo) directamente sobre la superficie del tejido. A continuación, las placas de 6 pocillos se incuban a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y $5 \pm 1\%$ de CO_2 durante 24 horas. A continuación, las muestras de tejido se lavan, como mínimo, una vez con 100 ml de PBS y se introducen en un tubo de centrifuga de 1,5 ml que contiene 10-12 volúmenes de solución de lisis de tiocianato de guanidinio. Los tejidos se desmenuzan con tijeras de punta fina y se homogeneizan hasta quedar completamente rotos. Tras la homogeneización, los tejidos se centrifugan a 15.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo. El sedimento (desechos de tejido) se descarta. A continuación, el homogenizado tisular se almacena a -75°C hasta que se completa el proceso de extracción de ARN, tal como se describe a continuación.

35 Aislamiento de ARN

40 El aislamiento del ARN se lleva a cabo utilizando el kit RNAqueous de Ambion Inc. (Austin, Texas). A los lisados celulares u homogeneizados tisulares preparados anteriormente, se añade un volumen igual de etanol al 64% y los tubos se someten a agitación en vórtex. Hasta 700 ml de la mezcla se transfieren a un cartucho de filtro de fibra de vidrio, que se carga en un tubo de recogida de 1,5 ml, y el cartucho se centrifuga durante 1 minuto a 14.000 rpm. La fracción no retenida se descarta. La posible mezcla restante se carga en el cartucho de filtro y el proceso de centrifugación se repite hasta haber procesado toda la mezcla. A continuación, el filtro se lava para eliminar cualquier desecho celular residual del ARN unido a las fibras de vidrio aplicando 700 ml de una primera solución de lavado (1 vez) y 500 ml de una segunda solución de lavado (2 veces) al cartucho de filtro y centrifugando a 14.000 rpm durante 1 minuto para hacer pasar cada lavado a través del cartucho. La fracción no retenida se desecha después de cada lavado. Tras el lavado final, se lleva a cabo un centrifugado final sin solución de lavado para eliminar toda posible solución de lavado residual presente en el cartucho de filtro. A continuación, el ARN unido a las fibras de vidrio dentro del cartucho se eluye aplicando 30 ml de tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, precalentado a $70-80^\circ\text{C}$, en lo sucesivo designado "tampón TE") al cartucho y centrifugando el cartucho en un nuevo

tubo de recogida a 14.000 rpm durante un minuto. Para las muestras preparadas a partir de lisados celulares y tejidos pequeños, el proceso de elución se repite con 30 ml adicionales de tampón TE precalentado. Para las muestras preparadas a partir de tejidos más grandes (es decir, tejidos de espesor completo), el proceso de elución se repite dos veces adicionales. Tras eluir el ARN, la concentración de ARN se cuantifica mediante un ensayo de Ribogreen. La calidad del ARN se evalúa por electroforesis en gel.

Ensayo de concentración de ARN

El reactivo de Ribogreen se suministra como solución madre en DMSO. Antes de su utilización, el reactivo se diluye 2.000 veces en tampón TE. El ensayo de ARN requiere 200 µl de reactivo de Ribogreen diluido por muestra a ensayar y 1 µl del reactivo para los patrones. Una vez preparado, el reactivo diluido se conserva protegido de la luz. Se preparan una serie de patrones de ARN por dilución de ARN ribosómico purificado derivado de *E. coli* a las siguientes concentraciones: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 200 ng/ml, 40 ng/ml y 0 ng/ml (blanco). Antes del ensayo, las muestras de ARN preparadas anteriormente se diluyen 1.000 veces en tampón TE. Para el ensayo de ARN, se transfieren 100 µl de las muestras o patrones diluidos a los pocillos de una placa de 96 pocillos negra. Las muestras y los patrones se analizan por duplicado. Después de introducirse las muestras/patrones en la placa, se añaden 100 µl de reactivo de ensayo de Ribogreen diluido a los pocillos y la placa se mezcla suavemente y se incuba durante 5-10 minutos protegida de la luz. Después de esta incubación, la placa se lee con un fluorómetro utilizando una longitud de onda de excitación de 500 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm.

Electroforesis en gel de ARN

Se prepara un gel de ARN al 1% añadiendo 0,3 g de agarosa a 21,6 ml de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). La agarosa se disuelve por ebullición del agua en un horno de microondas. Después de enfriar la solución aproximadamente a 55°C, se añaden 5,4 ml de formaldehído y 3,0 ml de MOPS 10x (MOPS 0,2 M [pH 7,0], acetato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, preparado en H₂O DEPC y esterilizado en filtro). Tras el mezclado, el gel de agarosa se coloca en el aparato de gel horizontal con ranuras de carga dispuestas en el lado del gel más cercano al terminal negativo. El gel se deja asentar durante, como mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Mientras el gel se asienta, se preparan 175 ml de MOPS 1x diluyendo la solución madre 10x. Cuando el gel se ha asentado, se retira el peine y la cámara de tampón del aparato de gel se llena con 150-175 ml de MOPS 1x (se añade suficiente tampón para cubrir el gel con aproximadamente 3 mm de tampón). Se coloca la cubierta del aparato, los conductores eléctricos se conectan a la fuente de alimentación y el gel vacío se hace correr a 40 V (4 V/cm) durante 5-10 minutos. Mientras corre el gel, se preparan las muestras de ARN transfiriendo aproximadamente 1 µg de cada ARN de muestra a un tubo de PCR de 600 µl. Se utiliza H₂O DEPC para llevar el volumen total de todas las muestras a un nivel común y luego se añaden 1-3 volúmenes de un tampón de carga de gel (es decir, glicerol al 5%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0,025%, xileno cianol FF al 0,025%, formaldehído al 20%, formamida al 50%, bromuro de etidio 10 mg/ml). Las muestras se desnaturalizan manteniéndolas a 65-70°C durante 5-15 minutos y luego se colocan sobre hielo para enfriarlas. A continuación, las muestras se cargan con cuidado en los carriles (cada ranura de carga puede alojar 10-15 µl de muestra, dependiendo del espesor del gel) y se hacen correr sobre el gel a 40 V durante 1-3 horas. Al final del ciclo, el ARN se visualiza colocando el gel en un transiluminador de UV. Se utiliza una muestra de ARN para el procesamiento posterior si las dos bandas ribosómicas 18S y 28S son claramente visibles y hay muy poca o ninguna tinción por debajo de la banda 18S.

Amplificación de ARNm

El ARNm se amplifica utilizando el kit MessageAmp RNAa, de Ambion Inc.

Síntesis de la primera cadena de ADNc: Para iniciar la primera síntesis de cadena, se introducen 5 µg de ARN total para cada muestra en tubos de PCR de 600 µl y el volumen total de líquido del tubo se ajusta a 12 µl con H₂O DEPC. A cada tubo se añade 1 µl de cebador T7 Oligo(dT) y el tubo se incuba a 70 ± 2°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ARN, y a continuación se coloca sobre hielo para permitir que el cebador se hibride a las colas poli A del ARNm. Tras enfriar, se añaden 2 µl de tampón de primera cadena 10x, 1 µl de inhibidor de ARNasa y 4 µl de mezcla dNTP a cada tubo, y el tubo se calienta a 42°C. Tan pronto como se calienta el tubo, se añade 1 µl de transcriptasa inversa y los tubos se vuelven a mantener a 42 ± 2°C durante 2 horas. Al final de las dos horas, los tubos se centrifugan brevemente para recoger todo el líquido en la parte inferior del tubo y luego se colocan sobre hielo.

Síntesis de la segunda cadena y purificación del ADNc: Para la síntesis de la segunda cadena de ADNc, se añaden secuencialmente a los tubos los siguientes ingredientes: 63 µl de H₂O DEPC, 10 µl de tampón de segunda cadena 10x, 4 µl de mezcla dNTP, 2 µl de ADN polimerasa y 1 µl de ARNasa H. El tubo se mezcla y después se incuba a 16 ± 2°C durante 2 horas. Hacia el final de la incubación de 2 horas, se calienta una cantidad suficiente de H₂O DEPC a 50 ± 2°C y se equilibra un cartucho de filtro de purificación de ADNc con 50 µl de tampón de unión de ADNc (un cartucho por muestra) durante, como mínimo, 5 minutos. Después de que las muestras hayan terminado la incubación, se añaden 250 µl de tampón de unión de ADNc a cada tubo y se mezclan por completo. El contenido del tubo de PCR se transfiere al cartucho de filtro de purificación de ADNc. A continuación, el cartucho se introduce en un tubo de recogida y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto. La fracción no retenida se descarta y se

añaden 650 ml de solución de lavado de ADNc al cartucho. El cartucho se vuelve a centrifugar, la fracción no retenida se descarta y se centrifuga una vez más para asegurar que el tampón de lavado se ha eliminado por completo del filtro. El ADNc se eluye mediante la aplicación de 10 ml de H₂O DEPC precalentada al filtro y la centrifugación del filtro en un nuevo tubo de recogida a 10.000 rpm durante un minuto. Esta elución se lleva a cabo una vez más para dar un volumen total de 16-18 ml de solución de ADNc.

Transcripción in vitro para sintetizar ARNa y purificación del ARNa

La transcripción in vitro comienza añadiendo los siguientes ingredientes a la solución de ADNc: 4 ml en cada caso de solución T7 ATP, solución T7 CTP, solución T7 GTP, solución T7 UTP, 4 ml de tampón de reacción 10x y 4 ml de mezcla de enzima T7. El tubo se mezcla y después se incuba a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 6-14 horas. Hacia el final de la incubación, se calienta un volumen suficiente de la solución de elución a $50-60^\circ\text{C}$ y se equilibra un cartucho de filtro de ARNa con 100 ml de tampón de unión a ARNa durante, como mínimo, 5 minutos. Al final del período de incubación, se añaden 350 ml de tampón de unión a ARNa a los tubos de muestra y se mezclan por completo. También se añaden 250 ml adicionales de etanol absoluto a cada tubo. A continuación, la mezcla se transfiere a un cartucho de filtro de ARNa; a continuación, el cartucho se introduce en un tubo de recogida y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto. La fracción no retenida se descarta y se añaden 650 ml de tampón de lavado de ARNa al cartucho, seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante un minuto. Tras desechar la fracción no retenida, el cartucho se centrifuga una última vez para eliminar toda traza del tampón de lavado. A continuación, el cartucho se transfiere a un nuevo tubo de recogida. Se añaden 25 ml de solución de elución precalentada al cartucho. El cartucho se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se eluye el ARNa por centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm. Esta elución se lleva a cabo una vez más para dar un volumen total de 45-50 ml de solución de ARNa. La concentración final de ARNa se determina mediante el ensayo de Ribogreen, descrito anteriormente. Además, la calidad del ARNa se comprueba por electroforesis en gel, tal como se ha descrito anteriormente. Se utiliza una muestra de ARNa para el tratamiento posterior si se observa una banda ancha de ARN.

Marcaje y purificación del ARNa

El ARNa se marca con colorantes fluorescentes utilizando el kit PerkinElmer ASAP RNA Labeling Kit. Se preparan dos tubos para el proceso de marcaje: para el marcaje de la muestra de Cy3 sin tratar (verde) y para el marcaje de la muestra de Cy5 tratada (rojo). Al tubo de Cy3 se añaden 2 mg de ARNa preparado a partir de la muestra sin tratar/control y se añade una cantidad suficiente de H₂O DEPC para llevar el volumen total hasta 4 ml. Al tubo de Cy5 se añaden 2 mg de ARNa preparado a partir de la muestra tratada con el material de ensayo y se añade una cantidad suficiente de H₂O DEPC para llevar el volumen total hasta 4 ml. A los dos tubos se añaden 5 ml de tampón de marcaje ASAP y 1 ml del colorante específico para el tubo (Cy3 o Cy5). Se incuban los tubos durante 15 minutos a $85 \pm 2^\circ\text{C}$. Pasados los 15 minutos, se colocan los tubos sobre hielo para enfriarlos y se añaden 2,5 ml de solución de detención ASAP a cada tubo. Las proporciones anteriores son suficientes para el análisis de un chip de micromatrices. Si se van a utilizar más chips, el marcaje se incrementa proporcionalmente.

Para purificar el ARNa marcado, se introduce una columna de filtro Microcon YM-30 en un tubo de recogida y se llena con 400 ml de tampón TE. Las sondas de Cy3 y Cy5 se combinan (12,5 ml de cada una), se añaden al filtro Microcon y se mezclan por completo con el tampón TE. El filtro se centrifuga a 12.000 rpm durante 8 minutos y la fracción no retenida se descarta. La columna se lava dos veces con 400 ml de tampón TE, descartando cada vez la fracción no retenida. Tras el lavado final, la columna de filtro se invierte, se coloca en un nuevo tubo de recogida y se centrifuga a 12.000 rpm durante 2 minutos a fin de recoger la sonda (la sonda se concentra en un volumen de 2-30 ml de tampón TE residual).

Hibridación y lavado de micromatrices

Para la hibridación, se mezclan 45 ml de ARN diana de control 10x (suministrado con el kit Agilent Technologies In Situ Hybridization Kit) con 160 ml de agua DEPC y 9 ml de tampón Agilent Fragmentation Buffer 25x. Esta mezcla se incuba a 60°C durante aproximadamente 30 minutos en un horno de hibridación. Al final de la incubación, se añaden 225 ml de Agilent Hybridization Buffer junto con las sondas fluorescentes de ARNa preparadas anteriormente. A continuación, la mezcla se incuba a 70°C durante 5-10 minutos en un baño de agua. Durante este período de incubación, se prepara una cámara de hibridación Agilent SUREHYB mediante la inserción de un portaobjetos de vidrio en la mitad inferior de la cámara. Al final de la incubación, la mezcla de hibridación (aproximadamente 450 ml) se aplica al portaobjetos de vidrio y se coloca un Agilent Human 1A Oligo Microarray Chip boca abajo en la parte superior del portaobjetos, de modo que la solución de hibridación se intercala entre el portaobjetos de vidrio y la cara de las micromatrices del chip. La mitad superior de la cámara se conecta y se aprieta el tornillo de conexión. Tras comprobar que hay una buena formación de burbujas en la cámara, se coloca en el horno de hibridación durante aproximadamente 17 horas (60°C y con rotación a 4 rpm). Al final del período de hibridación, las micromatrices/portaobjetos de vidrio se extraen de la cámara SUREHYB y se colocan en 50 ml de una primera solución de lavado (temperatura ambiente, 6x SSC, Triton X-102 al 0,005%). Cuando el portaobjetos se ha desprendido de la micromatriz, la matriz se transfiere a 300 ml de solución de lavado 1 nueva en una placa de agitación magnética. La matriz se lava mientras la solución se mezcla a velocidad media durante 10 minutos y, a

continuación, se transfiere a 300 ml de solución de lavado 2 (0,1x SSX, Triton X-102 al 0,005%, 4°C) durante 5 minutos. Tras el lavado final, la matriz se centrifuga a 500 rpm durante 5 minutos hasta sequedad.

Escaneo y análisis de micromatrices

5 Las micromatrices se escanean con un escáner Axon GenePix 4100A, con una resolución de escaneo ajustada a 10 mm, y se analizan con el software GenePix Pro. Durante el escaneo inicial, la ganancia de PMT del escáner se ajusta de tal manera que las proporciones de recuento de imagen de Cy5/Cy3 están comprendidas entre 0,88 y 1,12.

10 Para obtener la curva estándar para el ensayo de Ribogreen, se representan las unidades fluorescentes relativas (RFU) frente a las concentraciones conocidas de ARN en mg/ml para los patrones y se someten a análisis de regresión para establecer la línea que se ajusta mejor a los puntos del gráfico. A continuación, se utilizan los valores medios de RFU para los materiales de ensayo y las muestras sin tratar para estimar la cantidad de ARN presente en cada muestra.

15 El nivel de expresión génica está relacionado con la intensidad de fluorescencia del marcador génico marcado en la micromatriz. Las mediciones de fluorescencia entre las sondas Cy3 y Cy5 se normalizan. La señal fluorescente total para los dos colorantes se normaliza con un factor de corrección tal que la relación entre las intensidades totales para ambos colorantes sea igual a uno.

20 Los criterios para evaluar los cambios en la expresión génica son conocidos por los expertos en la materia e incluyen los siguientes: En primer lugar, la relación de intensidad de fluorescencia Cy3/Cy5 (sin tratar/tratada) es mayor de 1,5 o menor de 0,66. (Esto corresponde a un cambio en la expresión génica de, como mínimo, +/- 30%.) En segundo lugar, la intensidad de fluorescencia del marcador génico es mayor que la intensidad de fondo. En tercer lugar, la función génica está claramente marcada específicamente por las sondas de ARN y no es debida a fluorescencia no específica. Los dos primeros criterios se filtran mediante análisis por ordenador. El último criterio requiere una inspección visual de la matriz.

25 Se interpreta que una relación mayor de aproximadamente 1,3 indica que un gen está regulado al alza por el tratamiento, mientras que se interpreta que una relación menor de aproximadamente 0,7 indica un gen regulado a la baja. Por consiguiente, una relación de 1,3, donde el valor de la muestra tratada es el 130% del valor de la muestra sin tratar, indica un aumento del 30% de la expresión génica. Análogamente, una relación de 0,7 significa que el valor de la muestra tratada era del 70% del valor de la muestra sin tratar, lo que indica una disminución del 30% de la expresión génica.

30 Los siguientes resultados se observan tras completar el análisis de micromatrices, tal como se ha descrito anteriormente:

Colágeno tipo 1, subunidad alfa 1	1,31
MMP1	0,495
Fibronectina	1,64
Vimentina	1,346
Procolágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa	2,10

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para aumentar los niveles de colágeno en la piel con fines cosméticos, que comprende administrar a una persona una composición dermocosmética, que comprende una cantidad eficaz de un extracto proteínico de *R. miehei* sustancialmente desprovisto de actividad de proteasa, en el que la actividad combinada específica de proteasa ácida en dicho extracto proteínico es menor de aproximadamente 500 unidades HUT/mg; y un vehículo dermatológicamente aceptable.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el extracto proteínico de *R. miehei* tiene una actividad combinada específica de proteasa ácida menor de aproximadamente 50 unidades HUT/mg.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el extracto proteínico de *R. miehei* tiene una actividad combinada específica de proteasa menor de aproximadamente 10 unidades HUT/mg.
- 15 4. Procedimiento para estimular la síntesis de colágeno con fines cosméticos, que comprende administrar a una persona la composición dermocosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 5. Procedimiento para disminuir la expresión de uno o más genes que codifican la colagenasa con fines cosméticos, que comprende administrar a una persona la composición dermocosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Procedimiento para aumentar la firmeza de la piel con fines cosméticos, que comprende administrar a una persona la composición dermocosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 7. Procedimiento para aumentar el contenido de humedad de la piel con fines cosméticos, que comprende administrar a una persona la composición dermocosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.