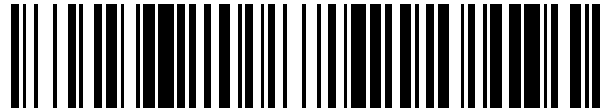


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 056**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2003** **E 03798892 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 1536753**

54 Título: **Método para la protección y para la modulación de uniones dermo-epidérmicas**

30 Prioridad:

**13.09.2002 EP 02292247**

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

**06.05.2016**

73 Titular/es:

**BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE  
S.A.S. (100.0%)  
32, Rue Saint-Jean-de-Dieu  
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**JEANMAIRE, CHRISTINE y  
PAULY, GILLES**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 569 056 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para la protección y para la modulación de uniones dermo-epidérmicas

Campo de la invención

5 La invención se encuentra en el campo de las preparaciones cosméticas y se refiere a un método cosmético para el mejoramiento y/o para la protección de las uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas y para la protección de la piel humana contra el envejecimiento, la tensión oxidativa y contra del efecto dañino de toxinas ambientales y radiación UV. Además, la invención se refiere al uso de una sustancia que provoca una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, para la producción de agentes cosméticos para el mejoramiento y/o para la protección de las uniones dermo-epidérmicas.

10 Estado de la técnica

15 La membrana basal es una estructura celular de unión entre tejidos morfológicamente diferentes. Se encuentra en la piel esencialmente como tejido que rodea los vasos sanguíneos y entre la dermis y epidermis. La última región mencionada separa la epidermis de su formación anexa de la dermis y de modo correspondiente se denomina como unión dermo-epidérmica (DEJ). La DEJ posee una estructura compleja que consiste en hemidesmosomas, filamentos intermedios, filamentos de anclaje, lámina densa y fibrillas de anclaje. Entre los componentes bioquímicos que allí existen principalmente se cuentan laminina-5 en la lámina lúcida; los antígenos AgBP 230 y AgPB180 así como plectina/HD1 en hemidesmosomas; entactina/nidógeno y el proteoglicano perlecano en la lámina lúcida y lámina densa; colágeno tipo IV en la lámina densa y el proteoglicano colágeno tipo VII como componente de fibrillas de anclaje en la sub-lámina densa. Estos componentes forman una red que interactúa.

20 La DEJ representa la formación más importante de la piel. Ella cuida de la unión entre la epidermis y la dermis subyacente y conserva la integridad del tejido epitelial mediante anclaje de células con la matriz extracelular, mediante los complejos celulares especiales de unión de los hemidesmosomas, filamentos y fibrillas.

Por un lado, ella representa un filtro en el flujo de moléculas especiales, por otro lado hace posible el intercambio de informaciones - por ejemplo por factores de crecimiento -entre los queratinocitos y la dermis.

25 Entre las modificaciones de la DEJ condicionadas por el envejecimiento, se cuentan la disminución en el espesor de las uniones y la reducción de las vellosidades citoplasmáticas consistentes en queratinocitos basales en la dermis. La disminución resultante de ello en la superficie de las DEJ conduce a una disminución en la resistencia del tejido, una reducción en la tensión de la piel y una formación multiplicada de arrugas. Otros fenómenos de envejecimiento como la duplicación de la lámina densa, envejecimiento de las fibrillas de anclaje o modificaciones de los componentes celulares de la DEJ conduce asimismo a que, con el incremento de la edad, el anclaje sobre el sistema epidérmico padezca un relajamiento. La disminución del colágeno tipo VII condicionado por el envejecimiento se explica también por la hidrólisis del colágeno por metaloproteinasas. Con el aumento de la edad, el colágeno tipo VII parece ser menos resistente frente a las proteasas.

35 También los daños inducidos por radiación UV, que conducen a una reducción en el contenido de colágeno tipo VII en las fibrillas de anclaje, resultando en un relajamiento de la unión entre la dermis y la epidermis y una disminución condicionada por ello en la elasticidad de la piel y aumento en las arrugas.

Numerosas enfermedades que perjudican las DEJ, conducen a una formación de multiplicaciones perimétricas subepidérmicas. Ellas muestran como un rasgo común una reducción en la cohesión entre la dermis y la epidermis, que a nivel de las DEJ se manifiesta en una formación de bolsas.

40 Con el objetivo de un mejoramiento de la función de las uniones dermo-epidérmicas, se usaron en formulaciones cosméticas y dermatológicas en particular componentes de las DEJ como lámina (FR 2813018, WO 97/48415), o calinina (WO 92/ 17498). También la estimulación de colágeno tipo IV mediante aspartato de magnesio (WO 99/62481), saponina (FR 2779058) o extractos de plantas (EP 668072) así como la estimulación de colágeno tipo VII mediante ácido elálgico (WO 99/16415), extractos de plantas de la *Potentilla erecta* (WO 98/19664) o extracto de *Bertholletia* (US 6004568) fueron manifestados para la producción de preparaciones cosméticas contra el envejecimiento, formación de arrugas y para la tensión de la piel.

45 A pesar de ello, existe aún necesidad de una protección efectiva de la piel contra la influencia del envejecimiento condicionado por el ambiente. De allí que el objetivo de la presente solicitud consistió en encontrar nuevos mecanismos para el mejoramiento de las uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas, que contribuya a un retardo en el envejecimiento de la piel y a una protección de la piel, cuero cabelludo y mucosas contra la influencia del ambiente, tensión oxidativa, sustancias tóxicas o radiación UV y con ello pueda usarse efectivamente en preparaciones cosméticas para la aplicación tópica.

Descripción de la invención

Son objetivo de la invención métodos para el tratamiento cosmético para el mejoramiento y/o para la protección de las uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas, caracterizado porque se aplica por vía tópica una preparación, que contiene por lo menos una sustancia, que causa una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano.

Otros objetivos de la invención son el uso de una sustancia que causa una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, para la producción de agentes cosméticos para el mejoramiento y/o para la protección de uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas, el uso de esta sustancia para la producción de agentes cosméticos para la protección contra el envejecimiento de la piel y el uso de la sustancia para la producción de agentes cosméticos para la protección contra tensión oxidativa, influencia negativa por el medio ambiente y radiación UV.

De modo sorprendente se encontró que la modulación de moléculas como plectina/HD1, entactina/nidógeno y/o perlecano conduce a una preservación y mejoramiento de las uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas. La función de las DEJ es un requerimiento esencial no sólo para la salud, sino también para la cosmética. Ellas cuidan de una buena cohesión entre la epidermis y los tejidos subyacentes de la dermis, preservan con ello la elasticidad y tensión de la piel y hacen posible que se impida la formación de arrugas. Además, mediante las DEJ por un lado se garantiza el buen cuidado de la piel mediante el paso de moléculas necesarias para la vida, entre la epidermis y la dermis, por otro lado ofrece una protección frente a la penetración de moléculas dañinas en las capas profundas de la piel.

La modulación de plectina/HD1, entactina/nidógeno y/o perlecano mediante la aplicación tópica de una preparación que estimula estas sustancias, ha mostrado ahora que de este modo puede fortalecerse la unión dermo-epidérmica, respectivamente la red compleja total de las DEJ. Esto implica una tensión de la piel y reducción de la formación de arrugas. Mediante el mejorado anclaje entre los componentes de las DEJ y el aumento en la estabilidad y la creciente elasticidad del tejido, asociados con ellos, puede prevenirse efectivamente la aparición de envejecimiento, también cuando ellos son causados por radiación UV.

Condicionado por el mejoramiento de la función de paso molecular, se optimiza el intercambio entre queratinocitos y dermis y la alimentación de la piel, y con ello se protege no sólo la piel contra el envejecimiento, sino también contra el efecto dañino de la radiación UV y efecto tóxico del ambiente, puesto que mediante el cuidado mejorado también se fortalece también la resistencia frente a las moléculas dañinas.

Las DEJ rodean sobre el cuero cabelludo al folículo piloso y cuidan también aquí de dar protección al folículo, de modo que un fortalecimiento de los DEJ en este ámbito conduce a un mejoramiento de las propiedades del cabello y es particularmente efectivo contra la caída del cabello o el daño del cabello.

Con ello, los agentes cosméticos aplicados por vía tópica, que contienen por lo menos una sustancia que causa la modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, tienen un efecto preventivo contra el envejecimiento de la piel e influencia dañina por tensión oxidativa, toxinas ambientales y radiación UV sobre la piel, cuero cálido, cabello y mucosas. Sin embargo, la modulación de las moléculas especiales conduce, aparte del efecto preventivo, a una regeneración acelerada de la piel, cuero cabelludo y mucosas después de un deterioro que ya ocurre.

Como moduladores han probado ser adecuados los extractos de plantas, en particular el extracto de *Pisum sativum*, *Ruscus Aculeatus*, *Centella asiatica*, *Calendula Officinalis*, *Aesculus Hippocastanum*, y/o *Hibiscus esculentus*. Sin embargo, también es posible una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano mediante la administración de péptidos de bajo peso molecular, que son necesarios para la construcción de los componentes de las DEJ y exhiben una secuencia similar que los componentes de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano.

Así mismo se observó una modulación de las moléculas mediante por lo menos una sustancia que es elegida de entre el grupo que está formado por manitol, ciclodextrina, extracto de levadura, pantenol, propilenglicol, glicirrizato de amonio y succinato de disodio. En particular, la combinación de estos componentes contribuye a efecto ventajoso sobre las uniones dermo-epidérmicas.

Puesto que las DEJ son muy susceptibles a la degradación por una multiplicidad de diferentes proteasas, el uso de extractos de planta, péptidos y otros principios activos con actividad contra las proteasas contribuye de manera crucial a la preservación de la estructura. Los principios activos con actividad contra las proteasas, en combinación con sustancias que causan la modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, contribuyen a un aumento sobresaliente del efecto.

Aparte de estas sustancias o extractos de plantas, los agentes cosméticos pueden contener además factores

protectores contra la luz UV y/o antioxidantes. La combinación de sustancias que causan una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, con factores protectores contra la luz UV y/o antioxidantes, conduce mediante diferentes mecanismos a un modo de acción sinérgico y ofrece una protección sobresaliente contra la influencia dañina y el envejecimiento de la piel por la acción de la luz UV.

5 Plectina/HD1

Plectina y HD1 son sinónimos para la misma molécula. Está localizada en los hemi-desmosomas, exhibe una masa molecular de aproximadamente 500 Dalton y sirve para el anclaje de proteínas del citoesqueleto como queratina, vimentina o proteínas de los microtúbulos.

Entactina/Nidógeno

10 También entactina y nidógeno son términos diferentes para la misma molécula. Representa una glicoproteína con una masa molecular de aproximadamente con 150 Dalton, que consiste en dos regiones terminales globulares, que están unidas una a otra por una estructura de cadena larga. Esta glicoproteína es decisiva para la estabilidad estructural de las DEJ, responsable de que mediante ello se produzca una unión entre laminina y colágeno tipo IV y contribuye al anclaje de una multiplicidad de otros componentes como fibulina o perlecano.

15 Perlecano

Todas las membranas basales contienen proteoglicanos. El proteoglicano de ocurrencia principal en las DEJ es perlecano, un sulfato de heparano, que es sintetizado en los fibroblastos dérmicos. El perlecano consiste en un núcleo grande de proteína y tres cadenas de sulfato de heparano. Su objetivo es entre otros estabilizar una unión entre laminina-6 y nidógeno. Aparte de las funciones de anclaje, los proteoglicanos de sulfato de heparano unen también moléculas que se difunden como enzimas y factores de crecimiento, y posiblemente tienen también mediante ello una influencia en el comportamiento y las propiedades de las células.

Filtros protectores contra la luz UV y antioxidantes

Se entienden por factores protectores contra la luz UV por ejemplo por ejemplo sustancias orgánicas que a temperatura ambiente están presentes en forma líquida o cristalina (filtros protectores contra la luz), que están en capacidad de absorber la radiación ultravioleta y emitir la energía absorbida en forma de radiación de mayor longitud de onda, por ejemplo calor. Los filtros UVB pueden ser solubles en aceite o solubles en agua. Como sustancias solubles en aceite se mencionan por ejemplo:

- 3-bencilidenalcanfor o 3-bencilidennorcanfor y sus derivados como por ejemplo 3-(4-metilbenciliden)alcanfor;
- derivados del ácido 4-aminobenzoico, preferiblemente 2-etilhexiléster de ácido 4-(dimetilamino)benzoico, 2-octiléster de ácido 4-(dimetilamino)benzoico y amiléster de ácido 4-(dimetilamino)benzoico;
- ésteres del ácido cinámico, preferiblemente 2-etilhexiléster de ácido 4-metoxicinámico, propiléster de ácido 4-metoxicinámico, isoamiléster de ácido 4-metoxicinámico, 2-etilhexiléster de ácido 2-ciano-3,3-fenilcinámico (octocrileno);
- ésteres del ácido salicílico, preferiblemente 2-etilhexiléster del ácido salicílico, 4-isopropilbenciléster del ácido salicílico, homomentiléster del ácido salicílico;
- derivados de la benzofenona, preferiblemente 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, 2-hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona, 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona;
- ésteres del ácido benzalmalónico, preferiblemente di-2-etilhexiléster del ácido 4-metoxibenzomalónico;
- derivados de triazina, como por ejemplo 2,4,6-trianilino-(p-carbo-2'-etil-1'-hexiloxi)-1,3,5-triazina y octil triazona, o dioctilbutamido triazonas (Uvasorb® HEB);
- propano-1,3-dionas, como por ejemplo 1-(4-tert.butilfenil)-3-(4'metoxifenil)propano-1,3-diona;
- derivados de cetotriciclo(5.2.1.0)decano.

Como sustancias solubles en agua entran en consideración:

- ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales alcalinas, alcalinotérricas, de amonio, de alquilamonio, de alcanolamonio y glucamonio;
- derivados de ácido sulfónico de benzofenonas, preferiblemente ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico y sus sales;

• derivados de ácido sulfónico de 3-bencilidenalcanfor, como por ejemplo ácido 4-(2-oxo-3-bornilidenmetil)benzenosulfónico y ácido 2-metil-5-(2-oxo-3-borniliden)sulfónico y sus sales.

Como típicos filtros UV-A entran en particular en consideración derivados de benzoilmetano, como por ejemplo 1-(4'-tert.butilfenil)-3-(4'-metoxifenil)propano-1,3-diona, 4-tert.-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (Parsol® 1789), 1-fenil-3-(4'-isopropilfenil)-propano-1,3-diona así como compuestos de enamina. Los filtros UV-A y UV-B pueden ser usados también evidentemente en mezclas. Las combinaciones particularmente convenientes consisten en los derivados de benzoilmetanos, por ejemplo 4-tert.-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (Parsol® 1789) y 2-etil-hexiléster de ácido 2-ciano-3,3-fenilcinámico (Octocrileno) en combinación con ésteres de ácido cinámico, preferiblemente 2-etilhexiléster de ácido 4-metoxicinámico y/o propiléster de ácido 4-metoxicinámico y/o 4-isoamiléster de ácido metoxicinámico. De modo conveniente se usan tales combinaciones con filtros solubles en agua como por ejemplo ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales alcalinas, alcalinotérricas, de amonio, de alquilamonio, de alcanolamonio y glucamonio.

Aparte de las sustancias solubles mencionadas, para este propósito entran en consideración también pigmentos insolubles protectores contra la luz, es decir óxidos o sales metálicos finamente dispersos. Son ejemplos de óxidos metálicos adecuados en particular óxido de zinc y dióxido de titanio y aparte de ellos óxido de hierro, silicio, zirconio, manganeso, aluminio y cerio así como sus mezclas. Como sales pueden usarse silicatos (talco), sulfato de bario o estearato de zinc. Los óxidos y sales son usados en forma de pigmentos para emulsiones para el cuidado y protección de la piel y cosméticos decorativos. Al respecto, las partículas deberían exhibir un diámetro promedio inferior a 100 nm, preferiblemente entre 5 y 50 nm y en particular entre 15 y 30 nm. Ellas pueden exhibir una forma esférica, sin embargo, pueden usarse también tales partículas que poseen una forma elipsoide o que de otro modo se desvían de la forma esférica. Los pigmentos pueden ser también tratados superficialmente, ser transformados en hidrofílicos o hidrófobos. Son ejemplos típicos los dióxidos de titanio recubiertos, como por ejemplo dióxido de titanio T 805 (Degussa) o Eusolex® T2000 (Merck). Al respecto, como agentes de recubrimiento hidrófobos entran en consideración sobre todo siliconas y al respecto en especial trialkoxisilanos o simeticonas. En los agentes protectores contra el sol se usan preferiblemente los denominados micro- o nanopigmentos. Preferiblemente se usa óxido de zinc micronizado.

Aparte de los dos grupos mencionados previamente de sustancias protectoras contra la luz, pueden usarse también agentes secundarios protectores contra la luz del tipo de los antioxidantes, que interrumpen la cadena de reacciones fotoquímicas, las cuales se inician cuando la radiación UV penetra en la piel. Son ejemplos típicos de ello los aminoácidos (por ejemplo glicina, histidina, tirosina, triptofano) y sus derivados, imidazoles (por ejemplo ácido urocánico) y sus derivados, péptidos como D,L-carnosina, D-carnosina, L-carnosina y sus derivados (por ejemplo anserina), carotenoides, caroteno (por ejemplo  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno) y sus derivados, ácido clorogénico y sus derivados, ácido lipónico y sus derivados (por ejemplo ácido dihidrolipónico), aurotioglucosa, propiltiouracilo y otros tioles (por ejemplo tioredoxina, glutatión, cisteína, cistina, cistamina y sus glicosil-, N-acetil-, metil-, etil-, propil-, amil-, butil- y lauril-, palmitil-, oleil-,  $\gamma$ -linoleil-, colesteril- y glicerilésteres) así como sus sales, dilauriltiodipropionato, disteariltiodipropionato, ácido tiodipropiónico y sus derivados (ésteres, éteres, péptidos, lípidos, nucleótidos, nucleósidos y sales) así como compuestos de sulfoximina (por ejemplo butioninsulfoximina, homocisteinsulfoximina, butioninsulfonas, penta-, hexa-, heptationinsulfoximina) en dosificaciones compatibles muy bajas (por ejemplo pmol a  $\mu$ mol/kg), además agentes quelantes de metales (por ejemplo  $\alpha$ -hidroxiácidos grasos, ácido palmítico, ácido fítico, lactoferrina),  $\alpha$ -hidroxiácidos (por ejemplo ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico), ácido húmico, ácido biliar, extracto de bilis, bilirrubina, biliverdina, EDTA, EGTA y sus derivados, ácidos grasos insaturados y sus derivados (por ejemplo ácido  $\gamma$ -linoléico, ácido linoleico, ácido oleico), ácido fólico y sus derivados, ubiquinona y ubiquinol y sus derivados, vitamina C y derivados (por ejemplo ascorbilpalmitato, ascorbilfosfato de magnesio, ascorbilacetato), tocoferoles y derivados (por ejemplo acetato de vitamina E), vitamina A y derivados (de vitamina A) así como coniferilbenzoato de resina de benjuí, ácido rutínico y sus derivados,  $\alpha$ -glicosilrutina, ácido ferúlico, furfuralidenglucitol, carnosina, butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, resina de ácido nordihidroguayarático, ácido nordihidroguayarático, trihidroxibutirofenona, ácido úrico y sus derivados, manosa y sus derivados, superóxido-dismutasa, zinc y sus derivados (por ejemplo ZnO, ZnSO<sub>4</sub>) selenio y sus derivados (por ejemplo selenio-metionina), estilbeno y sus derivados (por ejemplo óxido de estilbeno, óxido de trans-estilbeno) y los derivados adecuados de acuerdo con la invención (sales, ésteres, éteres, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, péptidos y lípidos) de estos principios activos mencionados.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: expresión de plectina

Reactivos:

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales de anti-plectina y anticuerpos IgG antirratón conjugados con anticuerpos secundarios de isotiocianato de fluoresceína FITC de la compañía Tebu y Clinisciences. PBS (solución salina amortiguada con fosfato con pH 7,2) y azul Evans fueron comprados en BioMérieux y TGF provenía de Sigma.

Piel humana reconstruida EKIN:

La piel humana reconstruida de Episkin (kit de Ekin) consiste en un soporte dérmico moldeado a partir de colágeno. Se eliminaron los queratinocitos de este soporte. Después de la eliminación de los queratinocitos y una diferenciación en un cultivo expuesto al aire, pudo obtenerse un equivalente a la piel humana.

5 Sustancias de prueba

Se usó TGF beta como control positivo.

10 Como sustancia de prueba sirvió una preparación compuesta por: propilenglicol, extracto de la raíz de Ruscus Aculeatus, extracto de Centella Asiatica, pantenol, agua, extracto de flores de Calendula Officinalis, proteína hidrolizada de levadura, extracto de Aesculus Hippocastanum, y glicirrizato de amonio en cantidades en peso cambiantes.

Se trató por vía tópica diariamente la piel humana reconstruida, durante tres días con 0,01 % de esta preparación o con 10 ng/ml de TGF beta. Esto corresponde a una cantidad total de preparación de 100 microlitros por piel reconstruida. Después de este tratamiento, se tomaron de inmediato biopsias y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta la evaluación.

15 Inmunohistoquímica

Se fijaron 10 micrómetros de la sección de criostato (biopsia almacenada en nitrógeno líquido) sobre portaobjetos de vidrio y se mantuvieron en acetona fría por diez minutos. A continuación se lavó la sección en PBS y se secó al aire.

20 Se incubó la sección por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-plectina en una solución 1/150. Después de lavar con PBS se incubó la sección con anticuerpo anti-ratón conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 45 min en una solución 1/40. Se obtuvieron controles negativos excluyendo el primer anticuerpo. Después del lavado exhaustivo con PBS se trataron con azul Evans por 10 minutos las secciones tratadas inmunológicamente. Con un microscopio láser confocal de la compañía Zeiss se examinaron las secciones.

25 Determinación cuantitativa

Mediante un software morfológico matemático (Quantimet Q500, Leica) se convirtieron y analizaron las imágenes obtenidas con microscopio láser confocal. Los resultados fueron representados como porcentaje de la superficie reconstruida ocupada por plectina (FITC).

Resultados

	Control tratamiento	sin TGF beta	Preparación de la sustancia de prueba
% de plectina en la sección de piel	4,16	21,43	37,9

30 Sin tratamiento pudo detectarse sólo una baja expresión del componente DEJ de plectina en la piel reconstruida.

El tratamiento tópico con la preparación de las sustancias de prueba ha mostrado un fuerte aumento en la expresión de plectina en la piel reconstruida. El control positivo de TGF mostró asimismo un aumento en la expresión de plectina en la piel reconstruida.

35 **Ejemplo 2: expresión de perlecano**

Reactivos:

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-perlecano y anticuerpos secundarios sobre anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC, de la compañía Tebu y Clinisciences. PBS (solución salina amortiguada con fosfato con pH 7,2) y azul Evans obtenido de BioMérieux y TGF provenía de Sigma.

40 Cultivo de fibroblastos humanos primarios

Se produjo una suspensión celular de fibroblastos humanos mediante digestión estándar de colagenasa de dermis humana de personas adultas, obtenida por cirugía plástica. Los fibroblastos fueron cultivados sobre platillos de

## ES 2 569 056 T3

vidrio con cámara de incubación y crecieron en el medio de cultivo hasta confluencia.

Sustancias de prueba

Se empleó como control positivo TGF.

Como sustancia de prueba sirvió un extracto hidrolizado de Hibiscus Esculentus.

- 5 Se cultivaron los fibroblastos humanos en presencia de 0,1 % de la sustancia de prueba o en presencia de 10 ng/ml de TGF beta en el medio de cultivo, por 6 días. A continuación se evaluó la expresión de perlecano mediante inmunocitoquímica.

Inmunohistoquímica

- 10 Se fijaron los cultivos de fibroblastos en los platillos de vidrio en metanol frío por 10 min y se lavaron con PBS. A continuación se incubaron los cultivos de fibroblastos por una hora 37°C con el anticuerpo monoclonal antipectina en una solución 1/150. Después del lavado con PBS se incubó la sección con anticuerpo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 45 min en una solución 1/40. Se obtuvieron controles negativos omitiendo el primer anticuerpo. Después del lavado exhaustivo con PBS se trataron las secciones tratadas inmunológicamente, por 10 minutos con azul Evans. Se examinaron las secciones con un microscopio láser confocal de la compañía Zeiss.
- 15

Determinación cuantitativa

[0042] Las imágenes obtenidas con el microscopio láser confocal fueron convertidas y analizadas mediante un software morfológico matemático (Quantimet Q500, Leica). Los resultados fueron representados como porcentaje de la superficie del cultivo de fibroblastos ocupada por perlecano (FITC).

### 20 Resultados

	Control tratamiento	sin TGF beta	Sustancia de prueba
% del contenido de perlecano en el cultivo de fibroblastos	1,28	25,07	8,0

Sin tratamiento pudo detectarse sólo una baja expresión del componente DEJ de perlecano en el cultivo de fibroblastos.

- 25 El tratamiento con la sustancia de prueba ha mostrado un aumento en la expresión de perlecanina en el cultivo de fibroblastos. El control positivo de TGF mostró asimismo un aumento en la expresión de perlecano en el cultivo de fibroblastos.

Los resultados del ejemplo 1 y ejemplo 2 muestran que las sustancias de prueba, (productos de Laboratoires Sérobiologiques) pueden elevar la expresión de plectina y perlecano.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para el tratamiento cosmético para el mejoramiento y/o para la protección de las uniones dermo-epidérmicas de la piel, cuero cabelludo y mucosas, caracterizado porque se aplica por vía tópica una preparación que contiene por lo menos una sustancia que causa una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano,
- en donde la sustancia es elegida de entre el grupo consistente en un extracto de las plantas *Pisum sativum*, *Ruscus Aculeatus*, *Centella asiatica*, *Calendula Officinalis*, *Aesculus Hippocastanum*, y/o *Hibiscus esculentus* y manitol, ciclodextrina, extracto de levadura, pantenol, propilenglicol, glicirrizato de amonio, succinato de disodio y péptidos de bajo peso molecular.
- 10 2. Empleo cosmético de una sustancia como se define en la reivindicación 1, para la protección de la piel contra el envejecimiento.
3. Empleo cosmético de una sustancia como se define en la reivindicación 1 para la protección de la piel, cuero cabelludo y mucosas contra el efecto tóxico del ambiente.
- 15 4. Empleo cosmético de una sustancia como se define en la reivindicación 1, para la protección de la piel, cuero cabelludo y mucosas contra la acción de la luz UV.
5. Empleo cosmético de una sustancia como se define en la reivindicación 1 contra la tensión oxidativa.
6. Empleo cosmético de una sustancia como se define en la reivindicación 1 contra la caída del cabello y para el mejoramiento de las propiedades del cabello.
- 20 7. Preparaciones cosméticas que contienen por lo menos una sustancia como se define en la reivindicación 1, que causa una modulación de plectina/HD1 y/o entactina/nidógeno y/o perlecano, y factores protectores contra la luz UV y/o antioxidantes.