

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 354**

51 Int. Cl.:

A61K 8/63 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/06 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61K 36/074 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2002 PCT/FR2002/03494**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2003 WO03030811**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2002 E 02795309 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 1434565**

54 Título: **Uso de ácidos ganodéricos como agentes cosméticos**

30 Prioridad:

11.10.2001 FR 0113305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

**YVES SAINT LAURENT PARFUMS, (SOCIETE ANONYME) (100.0%)
28/34, BOULEVARD DU PARC
92200 NEUILLY SUR SEINE, FR**

72 Inventor/es:

**GUESNET, JOËLLE y
GUEZENNEC (NÉE LOUCCEL), ANNE, BRUNA,
SUZANNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 354 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

Uso de ácidos ganodéricos como agentes cosméticos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a los campos cosmético y médico con relación a los procedimientos y patologías asociados al envejecimiento de los mamíferos y, en particular, del ser humano, y a productos o nuevos usos capaces de tratar o prevenir la aparición de fenómenos naturales del envejecimiento y, en particular, del envejecimiento cutáneo.

La presente invención se refiere al uso de sustancias como agentes cosméticos, así como al uso de sustancias para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno cutáneo.

10 La invención se refiere igualmente a una composición que comprende una mezcla de varias especies de ácidos ganodéricos, así como, más en general, al uso de los ácidos ganodéricos.

Técnica anterior

15 Desde hace tiempo se conoce el efecto antienviejimiento de la DHEA (DeshidroEpiAndrosterona) y de su derivado sulfato en el ser humano. En particular, se sabe que la DEA y su derivado sulfato circulan en gran cantidad en el adulto y que, entre los efectos descritos relativos a esta sustancia, se conocen aquellos que se oponen a los procedimientos y patologías que están asociados al envejecimiento.

20 Se sabe también que la tasa de producción de DHEA disminuye en el ser humano en función de la edad, permitiendo esta disminución explicar, al menos en parte, las patologías asociadas al envejecimiento. Así, se puede intentar explicar los efectos antienviejimiento observados en el individuo adulto tras una complementación de medicamentos a base de DHEA, por el restablecimiento a nivel individual del equilibrio químico entre la tasa de DHEA y la tasa de hormonas corticoides (cortisol, cortisona). En efecto, se sabe que la DHEA y el cortisol son productos a partir de un mismo precursor, la pregnenolona, y que la disminución de la producción de DHEA y de su derivado sulfato está directamente correlacionada con el envejecimiento, ya que la disminución de la tasa de DHEA observada en las personas mayores desequilibra la relación tasa de DHEA/tasa de hormonas corticoides, en beneficio de estas últimas cuya producción permanece constante independientemente de la edad. Se llega así a una expresión dominante de los efectos de las hormonas corticoides, lo que se traduce en observaciones y fenómenos conocidos tales como: atrofia cutánea, pérdida muscular, redistribución de las grasas, inmunosupresión, osteoporosis, etc., estando asociadas convencionalmente estas manifestaciones al envejecimiento humano. En definitiva, se cree que los efectos antienviejimiento de la DHEA serían atribuibles, por tanto, a una actividad anti-glucocorticoide.

30 Sin embargo, se sabe que la DHEA se sitúa en la encrucijada de una ruta metabólica que puede conducir a la formación de hormonas esteroideas, andrógenos o estrógenos. El uso, como complementación de medicamentos, de la DHEA o de su derivado sulfato, puede originar, por tanto, la aparición de efectos secundarios indeseables en determinados individuos y, en particular, en la mujer. Esto constituye un límite del uso general de la DEA o de su derivado sulfato, uso que, de hecho, está regulado y limitado al campo médico, lo que excluye en particular su uso en el campo de la cosmética.

35 Los procedimientos y las patologías asociados al envejecimiento humano son, por otro lado, conocidos, aunque solo se han aclarado en parte. No obstante, este aspecto tiene, mucha importancia y se investigan constantemente nuevas sustancias o nuevos usos capaces de tratar o prevenir este fenómeno natural en el hombre o en la mujer, sin originar a la vez efectos secundarios indeseables.

40 Por otro lado, ya se conoce el hongo *Ganoderma lucidum* de la familia de las *Ganodermataceae* (poliporáceas), cuyas propiedades benéficas para la salud se han recopilado en abundancia en la bibliografía. Esta especie de hongo, bien conocida en China desde hace aproximadamente 2000 años por sus propiedades curativas de todo tipo, se puede obtener hoy en día mediante cultivo del serrín de madera húmeda, después de haber sido durante mucho tiempo difícil de encontrar en estado natural.

45 Las propiedades médicas comunicadas son extremadamente variadas y han sido recogidas en numerosas publicaciones y, particularmente, por ejemplo, en "Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*" (*Advances in microbiology*, 1992), por ejemplo. A modo de ejemplos no limitantes se pueden citar propiedades comunicadas tales como: una acción antitumoral, una acción de mejora de la síntesis proteica y de la síntesis de ácidos nucleicos, acciones de protección del hígado y acciones desintoxicantes, una acción de regulación del sistema cardiovascular, una acción sobre el sistema respiratorio y una acción mejoradora sobre el sistema inmunitario. También se han comunicado otras propiedades tales como: diurético, regulador del tránsito intestinal, antitusivo, anti-hipertensivo, etc.

También se dice que el hongo *Ganoderma* es una fuente particularmente interesante de compuestos triterpénicos.

La mayoría de los estudios sobre la composición química de los hongos *Ganoderma* se han emprendido sobre la especie *Ganoderma lucidum*, y estos estudios hacen referencia a un gran número de constituyentes químicos (*Encyclopedia of Common Natural Ingredients*, Segunda Edición, Albert Y. LEUNG, Steven FOSTER) tales como: esterol, enzimas diversas (lactasa, celulasa, amilasa), proteínas solubles en el agua, polipéptidos, ácidos aminados, azúcares diversos, alcanos, ácidos grasos, polisacáridos y elementos inorgánicos diversos, compuestos triterpénicos que incluyen todas las especies de ácidos ganodéricos conocidos, así como ácidos lucidénicos en particular, aunque también ácidos ganodéricos, lucidonas, ácidos ganoderénicos, ganoderales y ganoderoles.

La mayoría de los estudios farmacológicos se han efectuado sobre extractos diversos de *Ganoderma lucidum*, y se ha notificado que las propiedades cardiovasculares hipotensivas tienen que ver con los compuestos triterpénicos del hongo *Ganoderma lucidum*, que incluyen los ácidos ganodéricos B, D, F, H, K, S e Y, siendo el ácido ganodérico F el más activo. También se ha observado que los efectos antihistamínicos del hongo podían ser debidos a los ácidos ganodéricos C y D.

Del mismo modo, la literatura recoge que los efectos antitumorales pueden ser debidos a diferentes compuestos del hongo y, en particular, a los ácidos ganodéricos T y Z.

Se ha comunicado también que los ácidos ganodéricos extraídos del hongo *Ganoderma* se han usado como complementos alimentarios o energéticos.

Los usos de extractos del hongo *Ganoderma* son diversos y tales como la medicina tradicional, la alimentación especializada de carácter biológico o energético. Se ha comunicado también el uso de extractos del hongo *Ganoderma* en el campo de la cosmética, usándose estos extractos en productos para el cuidado de la piel (cremas o lociones) por sus propiedades de hidratación, de nutrición y de blanqueamiento en particular.

Descripción de la invención

El objeto asignado a la invención se dirige precisamente a solventar los diferentes problemas señalados previamente, con relación a los límites del uso de la DHEA para luchar contra el envejecimiento, y a encontrar una nueva vía para tratar o prevenir el envejecimiento.

Otro objeto de la invención se dirige a encontrar una nueva vía para tratar o prevenir la aparición del envejecimiento cutáneo.

Otro objeto adicional de la invención se dirige a proponer un nuevo uso de una composición a base de ácidos ganodéricos.

Otro objeto de la invención se dirige a proponer un nuevo uso médico.

Otro objeto de la invención se dirige a proponer una nueva composición a base de ácidos ganodéricos particularmente eficaces como agentes contra el envejecimiento.

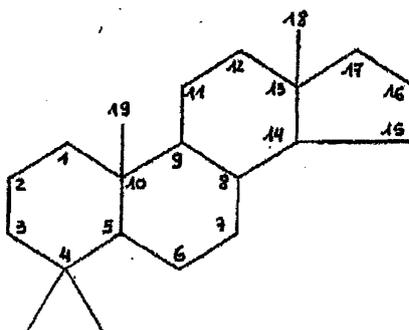
Los objetos asignados a la invención se consiguen con la ayuda de compuestos que tienen una estructura triterpenoide de acuerdo con el objeto de la reivindicación 1.

Los objetos asignados a la invención se consiguen con la ayuda del uso de una composición de ácidos ganodéricos para la preparación de un medicamento, para el tratamiento o la prevención de un trastorno cutáneo, de acuerdo con el objeto de la reivindicación 7.

Los objetos asignados a la invención se consiguen con la ayuda de una composición que comprende ácidos ganodéricos de acuerdo con el objeto de la reivindicación 10.

Mejor modo de realizar la invención

De manera sorprendente, se ha demostrado así el nuevo uso de compuestos que tienen una estructura triterpenoide con dos funciones metilo en la posición 4 de la fórmula:



y que llevan al menos una función hidroxilo en las posiciones 3 y 7, como agentes cosméticos.

En efecto, se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos antienvjecimiento generales en el ser humano, cuando se usan como agentes cosméticos en diversas formas.

5 A modo de ejemplo, los efectos antienvjecimiento en el campo cosmético se pueden ejercer sobre el envjecimiento cutáneo retardándolo o previniéndolo.

De manera general, los efectos antienvjecimiento constatados son efectos protectores o retardantes de la apoptosis corticoinducida, que constituye un modelo de estudio representativo de los efectos ligados a la presencia de los glucocorticoides.

10 Además de los efectos antienvjecimiento, se ha demostrado que los compuestos que tienen al menos una función hidroxilo en las posiciones 3 y 7 y usados como agentes cosméticos, tienen también efectos adelgazantes localizados resultantes de un tratamiento de los excesos de grasa localizada.

Entre los compuestos conocidos que tienen una estructura triterpenoide o incluso un esqueleto de triterpeno, tal como aquellos indicados previamente en la presente solicitud, los ácidos ganodéricos han demostrado ser particularmente interesantes.

15 Se ha demostrado que los ácidos ganodéricos tienen efectos antienvjecimiento generalmente en el ser humano, y que estas propiedades generales antienvjecimiento podían estar relacionadas con efectos antiglucocorticoides en general.

TABLA 1

| Relación Estructura - Actividad antiglucocorticoide frente a un modelo de protección contra la apoptosis celular corticoinducida | | | | | | | | | |
|--|--------------------|------------------------|------|----------------|----------------|------|------|-----------------------|---|
| Muestra | Ácidos ganodéricos | Ácidos ganodéricos (%) | | | | | | B + C2 + G totales | % de células en apoptosis corticoinducida |
| | totales (%) | A | B | C ₁ | C ₂ | F | G | | |
| 1 | 10,26 | 3 | 1,83 | 2,35 | 1,03 | 1,07 | 0,98 | 37,40 % | 37 |
| 2 | 8,4 | 1,81 | 1,86 | 1,75 | 0,68 | 0,97 | 1,33 | 46,00 % | 38 |
| 3 | 26,72 | 8,02 | 4,09 | 9,6 | - | 5,01 | - | 15,30 % | 90 |

20 Los ensayos realizados, cuyos resultados figuran en la tabla 1, han permitido demostrar que los efectos antienvjecimiento observados son efectos protectores contra la apoptosis corticoinducida.

Los ácidos ganodéricos usados pueden proceder de cualquier fuente posible, ya se trate de ácidos ganodéricos obtenidos mediante síntesis o mediante extracción a partir de una sustancia o de un elemento natural.

25 De modo ventajoso, los ácidos ganodéricos proceden de un extracto de un hongo de la familia de las *Ganodermataceae* (poliporáceas).

En los ensayos realizados (tabla 1), el extracto de hongo ensayado procede de la especie *Ganoderma lucidum*, entendiéndose que, en el contexto de la invención, cualquier extracto de ácido ganodérico que se puede usar puede proceder de otras especies conocidas de *Ganoderma*, por ejemplo, *Ganoderma Japonicum*, *Ganoderma Capense* y *Ganoderma Applatanum*, en particular.

30 Los ensayos se han realizado con muestras de ácidos ganodéricos que se presentan en forma de extracto en polvo, teniendo los ensayos como fin evaluar los efectos de los activos cosméticos sobre la apoptosis inducida por glucocorticoides en timocitos de ratón.

La apoptosis se induce mediante dexametasona y se analiza midiendo la cantidad de caspasa 3 intracelular, un marcador específico de la apoptosis, mediante citometría de flujo.

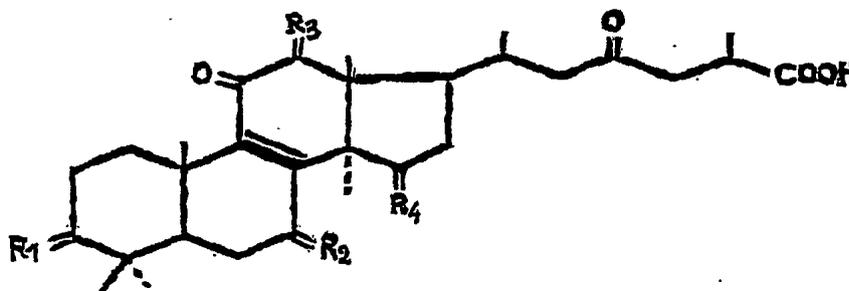
35 Los timocitos se pretratan o no con los productos, durante una hora, antes de la inducción de la apoptosis. Las células se cultivan a continuación durante dieciocho horas, permitiendo los controles sin dexametasona evaluar un posible efecto apóptico directo de los productos a las máximas concentraciones.

Seguidamente los timocitos se centrifugan y se incuban en presencia de anticaspasa 3-ficoeritrina y se fijan en PBS/paraformaldehído y después se analizan mediante citometría. Los resultados se expresan en porcentaje de

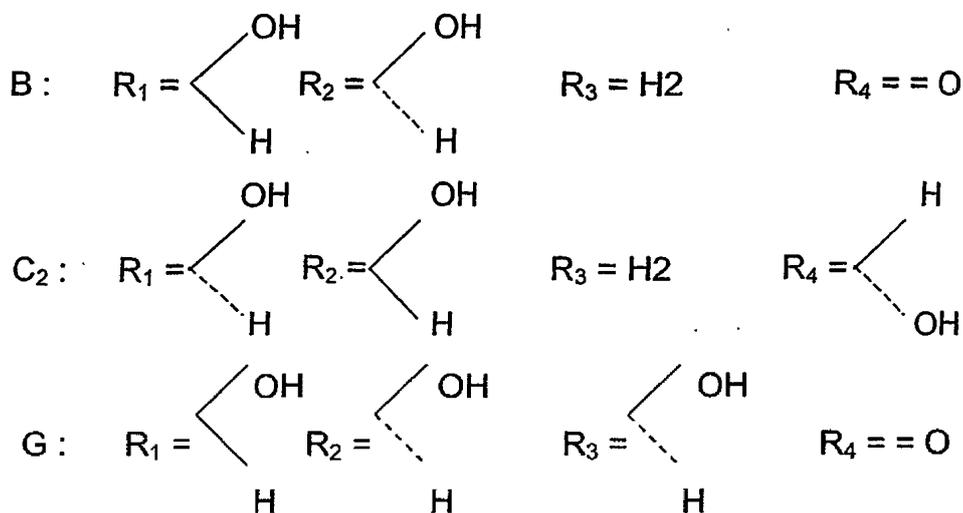
células marcadas (caspasa +) por triplicado, en tres muestras diferentes.

Los ensayos realizados han permitido, por tanto, demostrar que las muestras que contienen ácidos ganodéricos presentaban un efecto protector evidente, especialmente a un nivel de concentración de un 3-10⁻⁶ %.

5 Se ha demostrado que entre todas las especies de ácidos ganodéricos presentes en los *Ganoderma* y cuya fórmula general es la siguiente:



los derivados B, C₂ y G cuya fórmula es la siguiente:



10 presentan una actividad particularmente interesante como agentes cosméticos, a fin de obtener efectos antienvjecimiento, especialmente contra la apoptosis corticoinducida, así como efectos adelgazantes localizados.

15 Estas actividades sorprendentes se han relacionado con la existencia de dos funciones hidroxilo en las posiciones 3 y 7 presentes en cada una de las fracciones de ácidos ganodéricos B, C₂ y G. En efecto, se cree que el radical 3-hidroxilo está relacionado directamente con una acción antienvjecimiento, mientras que el radical 7-hidroxilo tendría una acción de bloqueo de la producción de precursores hormonales, bloqueando especialmente la transformación de la DHEA.

20 Así pues, la invención se refiere también al nuevo uso de una composición de ácidos ganodéricos para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno cutáneo. De modo ventajoso, este nuevo uso consiste en tratar o prevenir la apoptosis corticoinducida.

Los efectos antigluocorticoides demostrados *in vitro* se pueden ejercer sobre otras dianas tales como la inflamación o el metabolismo adipocitario, de modo que la invención se basa también en un nuevo uso de los ácidos ganodéricos, que consiste en tratar o prevenir trastornos resultantes de inflamaciones cutáneas o del metabolismo adipocitario.

25 La tabla 1 muestra que, entre los diferentes extractos de ácidos ganodéricos usados, parece que sólo los extractos del hongo (*Ganoderma lucidum* en los ejemplos) que comprenden al menos una fracción de ácido ganodérico B y/o al menos una fracción de ácido ganodérico C₂ y/o al menos una fracción de ácido ganodérico G, son capaces de tener un efecto protector contra la apoptosis corticoinducida.

30 Los extractos de ácidos ganodéricos usados comprenden una mezcla de ácidos ganodéricos seleccionados entre las especies B, C₂, G, solos o en combinación.

En efecto, se ha demostrado que los extractos de ácidos ganodéricos usados y desprovistos de la mezcla de los ácidos ganodéricos B, C₂ y G o de uno de ellos al menos, por ejemplo en beneficio de los ácidos ganodéricos A, C₁ y F, no permitían demostrar una actividad antigluco corticoide realmente significativa.

5 Se cree, por tanto, que el efecto anti envejecimiento demostrado está asociado a la presencia de otro radical 3-hidroxi lo, que está ausente en las especies de ácidos ganodéricos A, C₁ y F.

También se ha demostrado que la actividad anti envejecimiento o de tratamiento o prevención de un trastorno cutáneo podía ser tanto más eficaz cuanto mayor era la proporción de ácidos ganodéricos B, C₂ y G en el seno de la fracción total de los ácidos ganodéricos proporcionados.

10 La tabla 1 permite constatar igualmente que la actividad antigluco corticoide de las fracciones o extractos de ácidos ganodéricos parece estar directamente relacionada con la proporción de ácidos ganodéricos B, C₂ y G en el seno de la fracción de ácidos ganodéricos. La muestra 3 exhibe una actividad antigluco corticoide reducida, en comparación con las muestras 1 y 2 cuya proporción de ácidos ganodéricos B, y/o C₂, y/o G es superior en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos.

15 Parece, por tanto, que la proporción de ácidos ganodéricos B, y/o C₂, y/o G es tanto más eficaz cuanto más superior es esta proporción al 15 % en el seno de la fracción total de los ácidos ganodéricos y, preferentemente, por ejemplo, de al menos igual al 20 % o al 30 %.

20 Así pues, la invención pretende proteger una composición de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende ácidos ganodéricos, comprendiendo dicha composición una fracción de ácidos ganodéricos B y/o de ácidos ganodéricos C₂ y/o de ácidos ganodéricos G, siendo dicha fracción o fracciones superiores al 15 % en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos.

La composición de acuerdo con la invención podrá comprender, por tanto, una mezcla de al menos dos fracciones diferentes de ácidos ganodéricos B y/o C₂, y/o G.

De modo ventajoso, la composición de acuerdo con la invención comprende una mezcla de ácidos ganodéricos B, C₂ y G, y cuya proporción es superior al 15 % en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos.

25 En el contexto de la invención, los extractos de hongo, especialmente los procedentes de *Ganoderma lucidum*, se podrán usar en forma purificada al 100 %, o en una fracción enriquecida mediante extracción o disolventes diversos.

En el caso del uso de los ácidos ganodéricos obtenidos mediante síntesis, los extractos se podrán usar en forma purificada o diluida.

30 Las aplicaciones contempladas se refieren evidentemente al uso en el campo de la cosmética, y también en el campo de la dermatología, pudiendo integrarse directamente las aplicaciones contempladas durante la formulación de cremas, suero, emulsiones, gemas, etc.

La invención pretende proteger también una composición de acuerdo con la invención que está formada por una composición cosmética que comprende los diferentes excipientes apropiados para un uso cosmético.

35 Los diferentes excipientes apropiados para tal uso son bien conocidos por el experto en la materia y figuran en las diferentes formulaciones proporcionadas en adelante en el presente documento, y que se refieren a una crema antiarrugas, un suero antimanchas, una base de maquillaje, una emulsión blanqueante protectora, un gel adelgazante y una crema hidratante, sin que esta lista pueda ser considerada por ello limitante.

40 La invención pretende proteger también una composición de acuerdo con la invención que está formada por una composición alimentaria que comprende los diferentes excipientes apropiados para un uso alimentario, siendo tales excipientes bien conocidos por el experto en la materia.

De forma general, los excipientes para uso alimentario se podrán seleccionar de los ejemplos siguientes:

Composición de cápsulas duras/cápsulas para complemento alimentario:

Envuelta:

- 45
- Gelatina,
 - Glicerol,
 - Agua purificada,
 - Colorante alimentario autorizado (óxido de hierro...).

Polvo:

- 50
- Extracto de *Ganoderma*,
 - Lactosa (o dextrina /maltosa) c.s.

Otra composición alimentaria

- Agua,
- Aceite vegetal (maíz, soja),
- Emulsionante (mono- o diglicéridos de ácidos grasos)
- 5 - Espesante (alginato de sodio, goma guar o goma de xantano),
- Extracto de *Ganoderma*,
- Estabilizante (fosfato disódico).

Por último, esta invención pretende proteger una composición que está formada por una composición farmacéutica que comprende los excipientes apropiados para un uso farmacéutico, siendo los diferentes excipientes bien conocidos por el experto en la materia.

De forma general, los excipientes para uso farmacéutico se podrán seleccionar de los ejemplos siguientes:

Composiciones farmacéuticas para aplicación tópica:

Emulsión agua/aceite n.º 1:

- Agua,
- 15 - Glicerina Códex,
- Aceite de parafina Códex,
- Estearato de glicerol,
- Polímero siliconado,
- 20 - Polímero carboxílico,
- Trietanolamina.

Emulsión agua/aceite n.º 2:

- Agua,
- Dioctilciclohexano,
- 25 - Miristato de isopropilo,
- Estearato de glicerilo,
- Aceite de ricino hidrogenado PEG7,
- Sorbitán estearato de glicerilo,
- Ciclometicona,
- Fenoxietanol.

30 A modo de ejemplo no limitante, se pueden usar fracciones de ácidos ganodéricos B, C₂ y G, solos o mezclados, en las siguientes formulaciones de: crema antiarrugas, suero antimanchas, base de maquillaje, emulsión blanqueante protectora contra los rayos UVA y UVB, gel adelgazante y crema hidratante.

35 La composición que comprende una mezcla de uno o varios ácidos ganodéricos B, C₂ y G presentes en una relación de al menos un 15 % en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos puede estar formada por una composición alimentaria y, por ejemplo, del tipo de composición energética, que se presenta en cualquier forma y envase apropiado y, por ejemplo, en forma sólida o líquida o pastosa o semipastosa.

40 Se han realizado ensayos complementarios, tales como los que figuran a continuación, para demostrar el paralelismo de acción existente entre la DHEA y la acción de los ácidos ganodéricos B, C₂ y G, solos o en combinación, para luchar contra el envejecimiento cutáneo, demostrando estos resultados que los ácidos ganodéricos B, C₂ y G, debido a su proximidad a la DHEA en cuanto a estructura química, relacionada especialmente con la presencia de un radical 3-hidroxilo, pueden ser considerados sustitutos de la DHEA para luchar contra el envejecimiento cutáneo.

45 Los ensayos que figuran en la tabla 2 más adelante en el presente documento se refieren a la regulación de una enzima, la MMP1 (colagenasa intersticial humana) que pertenece a las metaloproteinasas, de la familia de las proteasas, enzimas que degradan la matriz extracelular, degradando particularmente la MMP1 el colágeno nativo.

Se sabe que la estimulación de las metaloproteinasas conlleva la degradación de la matriz extracelular, pudiéndose acelerar el procedimiento de degradación mediante diversos estímulos y, especialmente, durante la exposición a los rayos ultravioletas, o durante fenómenos inflamatorios. Estos efectos se han descrito ampliamente en la bibliografía y son conocidos como participantes del procedimiento general de envejecimiento, particularmente el cutáneo.

50 Los ensayos, cuyos resultados figuran en la tabla 2, han consistido, por tanto, en comparar la actividad de la DHEA y de los ácidos ganodéricos B, C₂ y G sobre la regulación de la actividad de la MMP1 tras la estimulación de los fibroblastos por el PMA.

Los resultados muestran el paralelismo existente en la actividad de prevención del trastorno cutáneo que se manifiesta por una prevención con relación a la infección o, por tanto, al envejecimiento cutáneo.

Los efectos antienvjecimiento se manifiestan para cada uno de los ácidos ganodéricos B, C₂ y G, pareciendo presentar este último una actividad superior a la de los otros ácidos ganodéricos.

Más precisamente, la tabla 2 de resultados muestra que la DHEA igual que los ácidos ganodéricos permite regular la cantidad de MMP1 tras una estimulación de las células. En efecto, bajo estimulación inflamatoria (tratamiento con PMA), la cantidad de la MMP1 presente en las células ha aumentado desde su valor basal (control - PMA) a un valor fijado arbitrariamente como testigo de referencia al 100 % (testigo + PMA). Durante el tratamiento de las células por la DHEA (DHEA al 0,001 %) este valor se lleva a un 60 % del valor del testigo (testigo + PMA) de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$), lo que representa una disminución de la cantidad de MMP1 de aproximadamente un 40 %. Este efecto inhibitor se encuentra igualmente de forma significativa con los ácidos ganodéricos para los cuales la disminución de la cantidad de MMP1 es de aproximadamente un 30 % para los ácidos ganodéricos B y C₂, y alcanza más del 40 % para el ácido ganodérico G.

Ensayos complementarios:

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS USADOS EN LOS ENSAYOS DE MMP-1/FIBROBLASTOS

a) Células

- 15 - Fibroblastos humanos normales profundos (tipo R₂Ad₂), usados en el 2º pase.
- Cultivo: 37 °C, 5 % CO₂
- Medio de crecimiento: medio Tebu PM-1
- Medio de ensayo: DMEM/HAMF10, vol/vol (Invitrogen 21969035 / Invitrogen 31550-023)
- 20 Hepes 15 mM (Invitrogen 1563-056)
- L-glutamina 2 mM (Invitrogen 25030024)
- penicilina 50 UI/ml estreptomycin 50 µg/ml (Invitrogen 15070063)
- sin suero bovino fetal**

b) Productos de ensayo

25 DHEA

- solución madre: 10 % en etanol más dilución al 0,1 % en una solución de BSA deslipidada a 5 mg/ml final
- diluciones: en medio de cultivo estéril
- **concentración final ensayada: 0,001 %** (50 µg/ml BSA 1ª conc, final) Ácido ganodérico B
- solución madre: 10 % en DMSO
- 30 - diluciones: en medio de cultivo estéril
- **concentración final ensayada: 0,04 %** (50 µg/ml BSA, final) Ácido ganodérico C₂
- solución madre: 10 % en DMSO
- diluciones: en medio de cultivo estéril
- **concentración final ensayada: 0,04 %** (50 µg/ml BSA, final) Ácido ganodérico G
- 35 - solución madre: 10 % en DMSO
- diluciones: en medio de cultivo estéril
- **concentración final ensayada: 0,04 %** (50 µg/ml BSA, final)

c) Ensayo; puesta a punto de las condiciones

40 Las células se sembraron a 17 000 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, una placa por cada tiempo de cultivo. Todas las condiciones por triplicado (3 pocillos de cultivo). Las placas se precultivaron durante 24 h en medio sin SFB. Tras 24 h de precultivo, los medios se sustituyeron por un medio equivalente que contenía los productos de ensayo o no (controles) o la DHEA al 0,001 %. Tras 4 h de incubación, se añadió una solución 10 veces concentrada de "forbol miristato acetato" (PMA Sigma, 0,1 µg/ml final) o no se añadió (controles) y las células se cultivaron durante 6 h adicionales.

45 Al final de cada tiempo de cultivo, los medios de cultivo se recuperaron y se congelaron a -80 °C para el análisis cuantitativo de la cantidad de MMP-1 y la viabilidad de los tapices celulares se controló usando un ensayo convencional de reducción del MTT.

El análisis cuantitativo de MMP-1 (colagenasa intersticial humana) se realizó mediante ELISA, con la ayuda de un kit "BIOTRACK human MMP-1, ELISA system, Amersham RPN2610", según las directrices del proveedor.

50 Resumen de las condiciones ensayadas:

Modelo: fibroblastos humanos
 Ensayo: análisis de la cantidad de MMP-1 producida (proteína, ELISA)
 Medios: sin suero

Ensayos: productos de ensayo, DHEA al 0,001 % o controles no tratados, durante 4 h

Estimulación: adición de PMA (o no, controles) y cultivo durante 6 h Productos (según viabilidades sobre los fibroblastos)

- 5
- A.G. B 0,04 %;
 - A.G. C₂ 0,04 %;
 - A.G. G 0,04 %;
 - DHEA 10 µg/ml

Tratamiento de los datos

Los datos brutos del recuento se transfirieron y se trataron con el programa PRISM® (Graph Pad Software).

10 Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) por medio de una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

TABLA 2:

| DHEA : Análisis actividad MMP1 (+ PMA) a las 6 h | | | | | |
|--|---------------------|--------------------------|----------|------------------------|----------|
| Tratamiento | MMP1 (ng/ml) | Desviación típica | n | % Testigo + PMA | p |
| Testigo + PMA | 10,54 | 1,56 | 3 | 100 | - |
| Control - PMA | 3,61 | 0,76 | 3 | 34 | p < 0,01 |
| DHEA (0,001 %) | 6,38 | 0,73 | 3 | 61 | p < 0,01 |
| Acidos ganodéricos: Análisis actividad MMP1 (+ PMA) a las 6 h | | | | | |
| Tratamiento | MMP1 (ng/ml) | Desviación típica | n | % Testigo + PMA | p |
| Testigo + PMA | 17,89 | 2,48 | 3 | 100 | - |
| Control - PMA | 7,67 | 1,23 | 3 | 43 | p < 0,01 |
| A. ganodérico B (0,04 %) A. ganodérico C₂ (0,04 %) | 13,52 | 2,21 | 3 | 76 | p < 0,05 |
| | 12,95 | 1,74 | 3 | 72 | p < 0,01 |
| A. ganodérico G (0,04 %) | 10,15 | 0,82 | 3 | 57 | p < 0,01 |

CREMA ANTIARRUGAS

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|-----------------|
| AGUA | c.s.p. 100 |
| GLICERINA | 5 |
| CARBÓMERO | 0,2 |
| EDTA TETRASÓDICO | 0,1 |
| ACEITE DE HOJA DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> | 2 |
| POLIISOBUTENO HIDROGENADO | 8 |
| ESTEARATO DE GLICERIL SE (AUTOEMULSIONABLE) | 2 |
| DIMETICONA | 1 |
| ESTEARATO DE GLICERIL Y ESTEARATO DE PEG-100 | 1,5 |
| TRIEILHEXANOINA | 5 |
| ÁCIDO ESTEÁRICO | 2 |
| ALCOHOL CETÍLICO | 1 |
| SÍLICE | 1 |

ES 2 618 354 T3

(continuación)

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|----------|
| MALEATO DE DICAPRILIO | 6 |
| ESTEARATO DE GLICERILO | 1 |
| DIMETICONA | 3,5 |
| AGUA | 2,3 |
| TRITANOLAMINA | 0,5 |
| FENOXIETANOL, METILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO, ETILPARABENO | 0,7 |
| FRAGANCIA | 0,3 |
| ACETATO DE TOCOFERILO | 0,5 |
| RETINOL | 0,1 |
| HIALURONATO SÓDICO | 0,03 |
| EXTRACTO DE <i>CENTELLA ASIATICA</i> | 1 |
| PROTEÍNA DE SOJA HIDROLIZADA | 0,4 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 1 |

SUERO ANTIMANCHAS

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|------------|
| AGUA | c.s.p. 100 |
| EDTA TRISÓDICO | 0,1 |
| HIDROXIETILCELULOSA | 0,1 |
| GOMA DE XANTANO | 0,3 |
| FENOXIETANOL, METILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO, ETILPARABENO | 0,65 |
| BUTILENGLICOL | 5 |
| POLISORBATO 20 | 1 |
| FRAGANCIA | 0,05 |
| ACETATO DE TOCOFEROL | 0,1 |
| CITRATO SÓDICO | 0,65 |
| ASCORBIL FOSFATO DE MAGNESIO | 1 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 3 |

BASE DE MAQUILLAJE

| Nombre INCI | Cantidad |
|---------------------------------|------------|
| AGUA | c.s.p. 100 |
| SILICATO DE ALUMINIO Y MAGNESIO | 0,5 |
| GOMA DE CELULOSA | 0,35 |
| GLICERINA | 3 |
| PVP | 5 |

ES 2 618 354 T3

(continuación)

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|----------|
| DIPROPILENGLICOL | 0,05 |
| PROPILENGLICOL | 2 |
| FENOXIETANOL, METILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO, ETILPARABENO | 1 |
| GOMA DE XANTANO | 0,2 |
| TRJETANOLAMINA | 0,7 |
| PALMITATO DE ISOPROPILO | 4 |
| ACEITE MINERAL | 2 |
| HEXILDECANOL | 3 |
| ESTEARATO DE GLICERILO | 2 |
| ÁCIDO ESTEÁRICO | 2,4 |
| ÁCIDO OLEICO | 0,5 |
| POLISORBATO 60 | 0,7 |
| TOCOFEROL | 0,5 |
| DIÓXIDO DE TITANIO | 7 |
| ÓXIDO DE HIERRO | 4 |
| NAILON 2 | 6 |
| HIALURONATO SÓDICO | 0,01 |
| FRAGANCIA | 0,5 |
| DICAPRATO/DICAPRILATO DE PROPILENGLICOL | 7,2 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 1 |

EMULSIÓN BLANQUEANTE PROTECTORA UVA/UVB

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|----------|
| METOXICINAMATO DE OCTILO | 4 |
| CETIL PEG/PPG-10/1 DIMETICONA | 3 |
| Bis-PEG/PPG-14/14 DIMETICONA | 3 |
| DIMETICONA | 6 |
| CICLOMETICONA | 4 |
| POLIDECENO | 4 |
| METILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO, ETILPARABENO | 0,65 |
| TOCOFEROL | 0,5 |
| FRAGANCIA | 0,8 |
| PPG-3 MIRISTIL ÉTER | 0,5 |
| DIÓXIDO DE TITANIO | 8 |
| FENOXIETANOL | 0,35 |
| CITRATO SÓDICO | 0,65 |
| ASCORBIL FOSFATO DE MAGNESIO | 3 |

ES 2 618 354 T3

(continuación)

| Nombre INCI | Cantidad |
|----------------------------------|------------|
| AGUA | c.s.p. 100 |
| GOMA DE XANTANO | 0,4 |
| BUTILENGLICOL | 2 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 1 |

GEL ADELGAZANTE

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|------------|
| AGUA | c.s.p. 100 |
| EDTA TETRASÓDICO | 0,2 |
| CARBÓMERO | 0,5 |
| GLICERINA | 3,0 |
| METACRILATO DE POLIGLICERILO Y PROPILENGLICOL | 5,0 |
| DIPROPILENGLICOL | 3,0 |
| BUTILENGLICOL | 5,0 |
| FENOXIETANOL, METILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO, ETILPARABENO | 0,65 |
| TRJETANOLAMINA | 0,5 |
| CAFEÍNA | 2 |
| EXTRACTO DE <i>RUSCUS ACULEATUS</i> | 1 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 1 |

CREMA HIDRATANTE

| Nombre INCI | Cantidad |
|-------------------------|--------------|
| AGUA | c.s.p. 100 g |
| CARBÓMERO | 0,35 |
| EDTA TETRASÓDICO | 0,1 |
| POLISORBATO 60 | 3 |
| ESTEARATO DE SORBITANO | 2,6 |
| PALMITATO DE ISOPROPILO | 2,5 |
| PALMITATO DE CETILO | 4 |
| PALMITATO DE ETILHEXILO | 5,1 |
| ESCUALANO | 1 |
| ALCOHOL CETÍLICO | 2,5 |
| CICLOMETICONA | 1 |
| DIMETICONA | 0,5 |
| TRJETANOLAMINA | 0,53 |
| BUTILENGLICOL | 5 |
| FRAGANCIA | 0,3 |

(continuación)

| Nombre INCI | Cantidad |
|--|----------|
| FENOXIETANOL, METILPARABENO, ETILPARABENO, PROPILPARABENO, BUTILPARABENO | 0,65 |
| ACETATO DE TOCOFERILO | 0,5 |
| HIALURONATO SÓDICO | 0,03 |
| PROTEÍNA DE ALMENDRA DULCE Y GLICERINA | 2 |
| METACRILATO DE POLIGLICERILO | 5 |
| FRACCIONES DE ÁCIDOS GANODÉRICOS | 1 |

5 En cada una de estas formulaciones, la fracción de ácido ganodérico incorporada (que se presenta en forma de polvo, por ejemplo) es del orden del 1 %, quedando entendido que esta fracción puede variar dentro de proporciones bien conocidas por el experto en la materia y, por ejemplo, entre un 0,5 % y un 5 %, sin salirse, no obstante, del alcance de la invención.

Posibilidad de aplicación industrial

La invención encuentra su aplicación industrial en la fabricación de composiciones farmacéuticas, cosméticas o alimentarias.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. - Uso de compuestos que tienen una estructura triterpenoide con dos funciones metilo en la posición 4 y al menos una función hidroxilo en las posiciones 3 y 7, comprendiendo dichos compuestos ácidos ganodéricos seleccionados entre las especies B, C₂, G, solos o en combinación, como agentes cosméticos que tienen efectos antienvjecimiento.
2. - Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** los efectos antienvjecimiento son efectos protectores contra la apoptosis corticoinducida.
3. - Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichos compuestos de estructura triterpenoide tienen efectos adelgazantes localizados.
- 10 4. - Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** los ácidos ganodéricos proceden de un extracto de hongo de la familia de las *Ganodermataceae* (poliporáceas).
5. - Uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el extracto de hongo procede de *Ganoderma lucidum*.
- 15 6. - Uso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el extracto de ácidos ganodéricos comprende una mezcla de ácidos ganodéricos B, C₂ y G.
7. - Uso de compuestos que tienen una estructura triterpenoide que llevan al menos una función hidroxilo en las posiciones 3 y 7, comprendiendo dichos compuestos una mezcla de ácidos ganodéricos B y C₂, o una mezcla de ácidos ganodéricos B y G, o una mezcla de ácidos ganodéricos C₂ y G, para la preparación de un medicamento, para el tratamiento o la prevención de un trastorno cutáneo.
- 20 8. - Uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** consiste en tratar o prevenir la apoptosis corticoinducida.
9. - Uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** consiste en tratar o prevenir trastornos resultantes de inflamaciones cutáneas o del metabolismo adipocitario.
- 25 10. - Composición que comprende ácidos ganodéricos **caracterizada porque** comprende una mezcla de al menos una fracción de ácido ganodérico B y de una fracción de ácido ganodérico C₂, o una mezcla de una fracción de ácido ganodérico B y una fracción de ácido ganodérico G, o una mezcla de una fracción de ácido ganodérico C₂ y una fracción de ácido ganodérico G, siendo dichas fracciones superiores al 15 % en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos.
- 30 11. - Composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** comprende una mezcla de ácidos ganodéricos B, C₂ y G, cuya proporción es superior al 15 % en el seno de la fracción total de ácidos ganodéricos.
12. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 11, **caracterizada porque** está formada por una composición alimentaria que comprende los excipientes apropiados para un uso alimentario.
13. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 11, **caracterizada porque** está formada por una composición cosmética que comprende los excipientes apropiados para un uso cosmético.
- 35 14. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 11, **caracterizada porque** está formada por una composición farmacéutica que comprende los excipientes apropiados para un uso farmacéutico.