

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 114**

51 Int. Cl.:

|                    |                              |           |
|--------------------|------------------------------|-----------|
| <b>A61Q 19/08</b>  | (2006.01) <b>A61K 36/48</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 36/77</b>  | (2006.01) <b>A61K 36/17</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 8/97</b>   | (2007.01) <b>A61K 36/185</b> | (2006.01) |
| <b>G01N 33/68</b>  | (2006.01) <b>A61K 36/54</b>  | (2006.01) |
| <b>G01N 33/573</b> | (2006.01)                    |           |
| <b>C12Q 1/68</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 17/06</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 17/00</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 35/00</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61P 37/06</b>  | (2006.01)                    |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2006 PCT/FR2006/051117**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2007 WO07048985**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 06831309 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1948128**

54 Título: **Sustancia para restablecer una coexpresión y una interacción normales entre las proteínas LOX y NRAGE**

30 Prioridad:

**28.10.2005 FR 0511112**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2017**

73 Titular/es:

**BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE SAS (33.3%)**  
**32, rue Saint-Jean-de-Dieu**  
**69007 Lyon, FR;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (33.3%) y**  
**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BOUEZ, CHARBEL; GLEYZAL, CLAUDINE;**  
**ORLY, ISABELLE; ANDRE, VALÉRIE;**  
**SOMMER, PASCAL; REYMERMIER, CORINNE;**  
**DAMOUR, ODILE; PERRIER, ERIC**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 622 114 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

Sustancia para restablecer una coexpresión y una interacción normales entre las proteínas LOX y NRAGE.

- 5 La invención se refiere a la utilización de una sustancia para restablecer una coexpresión y una interacción normales entre las proteínas LOX y NRAGE.

## Estado de la técnica

10 **1) Generalidades**

En los organismos multicelulares, la homeostasis se mantiene mediante un equilibrio entre la proliferación celular, la diferenciación de células implicadas con una función definida y la muerte celular, programada o no.

- 15 La piel, por ejemplo, puede considerarse como un órgano cuya una de las funciones específicas es proteger al organismo de las agresiones externas. El aislamiento con el exterior lo garantiza una capa córnea muy queratinizada compuesta por células muertas. Por tanto, la vía de las células de la epidermis, los queratinocitos, está marcada por una sucesión de evoluciones sucesivas que conducen a esta diferenciación en células queratinizadas y muertas: (1) mantenimiento de células iniciadoras (células "madre" de la capa basal de la epidermis), (2) división asimétrica (cada célula madre produce dos células hermanas), (3) diferenciación (formación de capas suprabasales de la epidermis a partir de una de las células "hermanas iniciadoras"), (4) adquisición de una resistencia a la muerte celular de tipo apoptótico, (5) evolución hacia células cornificadas y (6) muerte celular programada de capas celulares superiores de la epidermis. Cualquier modificación de este equilibrio puede ser patológica.

- 25 El experto en la materia conoce diversas moléculas y mecanismos biológicos que tienen en cuenta determinados aspectos de fenómenos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin embargo, realmente no hay datos que informen sobre cualquier mecanismo que relacione estos tres fenómenos, y que constituiría así una diana sobre la cual actuar en vista de controlarlos y regularlos.

30 **2) LOX (proteína)**

- LOX pertenece a la familia de las lisil oxidasas (LO), que son amina oxidasas dependientes de cobre. Hasta ahora, se han caracterizado 5 genes LO: LOX, LOXL, LOXL2, LOXL3 y LOXL4. Si LOX se conoce por su función en la reticulación del colágeno *ex vivo* e *in vivo*, LOXL está claramente asociado a la homeostasis de fibras elásticas. La función *in vivo* de las otras isoformas se desconoce.

- Diversas células, tales como los fibroblastos, las células musculares lisas, las células endoteliales y los queratinocitos sintetizan las LO. Esta enzima está por tanto presente en numerosos tejidos tales como en la piel, el hígado, los riñones, el bazo y la aorta, tanto a nivel extracelular como intracelular.

40

**2.1) Estabilización de la matriz extracelular - función extracelular**

- La función extracelular de LOX, a partir de ahora bien conocida, consiste en estabilizar la matriz extracelular (MEC) de los tejidos conjuntivos. LOX tiene en efecto como función reticular los colágenos fibrilares y la elastina. Para ello, cataliza la desaminación oxidativa de restos lisilo e hidroxilisilo de moléculas de procolágeno fibrilares y de tropolastina, reacción que viene acompañada por la liberación de amoníaco y de peróxido de hidrógeno. Los restos aldehído formados se condensan por tanto espontáneamente con funciones de aldehídos o aminas adyacentes, conduciendo a enlaces intra o intermoleculares. Estas condensaciones originan puentes que se encuentran en las fibras de colágeno y de elastina. Por tanto, tanto LOX como las LO, se estudian en campos biomédicos que implican una evolución de la MEC (envejecimiento, fibrosis, cáncer, cicatrización, patologías osteoarticulares y cardiovasculares, angiogénesis).

- Se ha demostrado *in vitro* que los nitrilos orgánicos eran inhibidores irreversibles de LOX. De este modo, el  $\beta$ -aminopropilnitrilo ( $\beta$ -APN) se fija, de manera competitiva, con los sustratos alquil amina, sobre el sitio activo de LOX; las LO utilizan como sustrato el  $\beta$ -APN, formando así una base de Schiff, pero sin liberación de producto aldehído, lo que bloquea el sitio activo de manera covalente sin tener efecto sobre la síntesis. Basándose en esto, los inventores han descrito la utilización de diferentes inhibidores de lisil oxidasas, entre ellos  $\beta$ -APN, para evitar la desdiferenciación de ciertos tipos celulares (condrocitos...) que se produce sistemáticamente cuando se cultivan estas células (Farjanel et al, patente francesa 01.10443, CNRS, Utilización de inhibidores de lisil oxidasas para el cultivo celular e ingeniería tisular n.º depositada el 3 de agosto de 2001, n.º de publicación: 2 828 206). Sin embargo, este documento se refiere a las lisil oxidasas en su conjunto y no particularmente a la isoforma de LOX; además, se refiere exclusivamente a la inhibición de la desdiferenciación de células en cultivo *in vitro*, no dando ninguna información sobre la función de las lisil oxidasas, ni aún más de LOX, en el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación, diferenciación y apoptosis, ni tampoco proporciona información sobre nuevos compañeros o sustratos de lisil oxidasas, ni de LOX.

65

**2.2) Función intracelular**

La función intracelular de LOX, y de las LO en general, es menos conocida. De este modo, aunque se admite que LOX participa en la regulación del desarrollo, en la diferenciación, movilidad o senescencia celular (Csizar, Lysyl oxydases: A novel multifunctional amine oxydase family, Nucleic Acid research and Molecular Biology, 2001, 70:2-28), los mecanismos moleculares subyacentes no están aclarados.

**2.2.1) LOX y homeostasis celular.**

La posible implicación de LOX en la regulación de la homeostasis celular (mantenimiento de un equilibrio fisiológico entre proliferación, diferenciación y apoptosis) está comúnmente aceptada (Jeay *et al.*, Lysyl oxydase inhibits Ras-mediated transformation by preventing activation of NF-KB, Mol. Cell. Biol., 2003, 23:2251-2263), sin embargo los mecanismos subyacentes aún son desconocido para el experto en la materia.

Por tanto, el experto en la materia dispone actualmente de algunos datos que indican una relación posible entre LOX y la diferenciación, por un lado, y LOX y la proliferación/transformación celular, por otro lado. Por lo tanto, la técnica anterior no indica una posible relación entre LOX y apoptosis.

**2.2.2) LOX y diferenciación epidérmica**

LOX se ha localizado en la epidermis, con una expresión regulada en función del nivel de diferenciación de los queratinocitos (Noblesse *et al.*, Lysyl oxydase like and lysyl oxydase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers, J. Invest. Dermatol., 2004, 122 621-630). Sin embargo, los estudios realizados a día de hoy no han permitido definir la función de LOX en los queratinocitos ni investigar sus compañeros en estas células, que no forman (o muy poco) colágeno y elastina.

**2.2.3) LOX y transformación celular.**

El gen *LOX* está claramente asociado al mantenimiento del fenotipo no tumoral de las células.

Se han emitido dos hipótesis para explicar esta función de LOX. La primera hipótesis sugiere que la reticulación de la MEC induce a un entorno tridimensional favorable al mantenimiento del estado no tumoral. Esta hipótesis está demostrada por el hecho de que LOX y LOXL no se expresan cuando los cánceres se convierten en invasivos, mientras que están presentes en los cánceres *in situ* (Peyrol *et al.*, Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma., Am J Pathol. Feb; 150(2):497-507 1997). La otra hipótesis se refiere a la función intracelular de las LO, sobre sustratos aún por descubrir por experto en la materia (Li *et al.* Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells., Proc Natl Acad Sci USA., 1997 Nov 25; 94(24):12817-2.).

En efecto, parece que la enzima LOX es un supresor del oncogén *ras*, y que mutaciones somáticas en el gen están asociadas a diversos cánceres (Contente *et al.*, Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras, Science, 1990, 249:796-798; Csiszar *et al.*, Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors, Int. J. Cancer, 2002, 97:636-642). Recientes trabajos muestran que el bajo nivel de expresión de LOX en los fibroblastos transformados por *ras* se debe a la actividad del factor de crecimiento autocrino FGF-2, y que el fármaco antitumoral suramina permite la re inducción de la expresión de la enzima (Palamakumbura *et al.*, Autocrine growth factor regulation of lysyl oxidase expression in transformed fibroblasts., J Biol Chem., 2003, Aug 15; 278(33):30781-7; Epub 2003 Jun 4). Por otra parte, se ha demostrado que la reexpresión de LOX en estos fibroblastos inhibe su crecimiento en agar blando, y que, actúa sobre la vía de señalización NF-kB a través de la regulación de la localización de la proteína AKT (Jeay *et al.*, Lysyl oxydase inhibits Ras-mediated transformation by preventing activation of NF-B, Mol. Cell. Biol., 23:2251-2263, 2003).

Como ocurre con otros supresores tumorales, LOX actúa probablemente según la disponibilidad y la regulación de sus sustratos y compañeros celulares, pero estos últimos siguen siendo desconocidos para el experto en la materia.

**2.2.4) Apoptosis**

El término apoptosis se utiliza para describir una forma particular de muerte celular, que presenta características morfológicas diferentes de células de la necrosis.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que requiere la adquisición de caspasas. Durante este proceso, las células adquieren características morfológicas particularmente notables, como la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, conduciendo a su autodestrucción y a su eliminación del tejido sin dañar las células adyacentes.

La apoptosis corresponde a la muerte natural de las células, durante su desarrollo, o durante la homeostasis.

La técnica anterior informa sobre un determinado número de actores y de mecanismos que, a través de los procesos celulares de apoptosis y de diferenciación, están implicados en la regulación del ciclo celular.

### **3) NRAGE (PROTEÍNA)**

5 De este modo, en particular, se conoce una familia de proteínas que están implicadas en la regulación del ciclo celular, de la diferenciación y de la apoptosis. Se trata de la familia de proteínas MAGE (por las siglas en inglés *Melanoma Associated Antigen*, antígeno asociado a melanoma), cuyo de sus miembros, la proteína NRAGE, denominada también "*neurotrophin-receptor-interacting MAGE homolog*, homólogo de MAGE que interacciona con el receptor de neurotrofina" es particularmente conocida por su función proapoptótica mediante el factor neurotrófico NGF.

15 La proteína NRAGE contiene 778 aminoácidos. Lleva un primer dominio característico de las proteínas MAGE: el dominio de homología MAGE (MHD-1) en la región central y, en la región N-terminal, un segundo dominio: MHD-2, únicamente presente en determinadas isoformas. Estos dos dominios presentan zonas ricas de restos lisilo. Entre estos dos dominios, existe una región denominada IRD (por las siglas en inglés *Interspersed Repeat Domain*, Dominio de Repetición Intercalado) que no existe en ninguna proteína conocida hasta ahora.

20 La proteína NRAGE está implicada en el control de la apoptosis a través de diferentes rutas.

- Por su interacción con p75NTR, que es receptor de "baja afinidad" de factores de neutrófilos (NGF) o de TNF, NRAGE pueden bloquear la progresión del ciclo celular y es, de este modo, proapoptótica a través de la ruta de las caspasas.
- NRAGE es también proapoptótica ya que interacciona con los inhibidores citoplásmicos de proteínas apoptóticas IPA.
- NRAGE también puede actuar directamente sobre la actividad de homofactores nucleares, como los factores Msx y Dlx que intervienen en la regulación morfogénica de tejidos.

30 Aunque la expresión de NRAGE es ubicua, la técnica anterior no informa de su presencia a nivel de la piel. La técnica anterior tampoco aporta ninguna información sobre una eventual relación entre LOX y la apoptosis, ni tampoco sobre un vínculo entre LOX y NRAGE.

### **4) Conclusión sobre la técnica anterior**

35 La técnica anterior no proporciona la identidad de nuevos compañeros o sustratos de LOX, particularmente interviniendo en el mantenimiento del equilibrio celular entre proliferación, diferenciación y apoptosis, por otra parte, la técnica anterior no proporciona la identidad de estos nuevos compañeros o sustratos ni en las células epiteliales (en particular los queratinocitos), ni en ningún otro tipo celular en absoluto.

40 La técnica anterior no informa sobre las eventuales variaciones de expresión de LOX a nivel epidérmico (particularmente expresada por los queratinocitos), en función de la edad, de la existencia o no de exposición a los UV o de otros tipos de agresiones, o en caso de patologías que afectan a la piel (soriasis, respuesta de huésped contra injerto, cáncer...).

45 La técnica anterior no describe la implicación de LOX en la apoptosis.

La técnica anterior no informa sobre la eventual presencia de NRAGE en la piel, bien se trate de piel sana, de piel alterada por la edad o por los UV, o que haya sufrido otros tipos de agresiones, o de piel patológica.

50 La técnica anterior no dispone de modelos conocidos para estudiar NRAGE en estas células de origen epitelial, ni en la epidermis.

La técnica anterior no informa de ninguna otra interacción de LOX con NRAGE, cualquiera que sea el tejido.

55 La técnica anterior no proporciona ningún modelo que permita la identificación de principios activos capaces de modular la expresión de LOX y/o de NRAGE en los queratinocitos.

60 Por otro lado, actualmente la experimentación con animales está prohibida en Europa para determinadas aplicaciones y la experimentación con seres humanos está éticamente discutida. Por tanto, no es aceptable para los inventores efectuar un método de selección aplicado en animales o en seres humanos.

65 En el modelo tridimensional MIMESKIN® (Coletica, Francia), LOX se expresa a nivel de la epidermis, con una expresión regulada en función del nivel de diferenciación de los queratinocitos (Noblesse et al, 2004). Durante estos estudios, no se investigaba ni la expresión de NRAGE, ni la existencia de una eventual relación entre LOX y la apoptosis. De este modo, no era obvio para el experto en la materia interesarse en la modulación de la expresión de LOX y/o de NRAGE para regular la homeostasis celular basándose en el equilibrio entre proliferación, diferenciación

y apoptosis, en el caso en el que esté alterada (edad, estrés, patologías), lo que constituye por tanto un problema técnico nuevo.

5 Por tanto, la técnica anterior no proporciona principios activos capaces de modular la expresión de compañeros intracelulares de LOX (como NRAGE) asociada o no a una modulación de la expresión de LOX con el objetivo de actuar sobre la regulación celular. En este ámbito, también es difícil obtener criterios objetivos que permitan juzgar el impacto de estos principios activos.

### Objetos de la invención

10 La invención tiene principalmente por objeto resolver los problemas técnicos anunciados anteriormente y, particularmente, se refiere a regular el equilibrio celular entre proliferación, diferenciación y apoptosis, en el caso en el que esté perturbada en el caso de piel alterada por la edad.

15 La invención también se refiere a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1. En particular el principio activo que estimula la expresión de LOX permite regular el equilibrio celular entre proliferación, diferenciación y apoptosis en el caso en el que esté perturbada en el caso de piel alterada por la edad.

### Descripción de la invención

20 En el conjunto de la invención, los inventores entienden por los términos:

«LOX», la isoforma de la proteína humana de la lisil oxidasa LOX, en particular definida por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1;

25 «NRAGE», la proteína humana NRAGE, en particular, definida por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2; «modular la expresión de LOX», la modulación del gen que codifica LOX, y particularmente, la modulación de la expresión del ARN mensajero que codifica LOX, aunque también la modulación de la síntesis de LOX a partir de este ARN mensajero, así como la modulación de la actividad de LOX;

30 «modular la expresión de NRAGE», la modulación del gen que codifica NRAGE, y particularmente, la modulación de la expresión del ARN mensajero que codifica NRAGE, aunque también la modulación de la síntesis de NRAGE a partir de este ARN mensajero, así como la modulación del efecto biológico NRAGE.

Estas modulaciones deben permitir reinducir un estado de equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis en situaciones en las que este equilibrio esté perturbado.

35 Es preferible considerar como eficaces sobre LOX los principios activos que permiten obtener de una diferencia de aproximadamente  $\pm 50\%$  de la expresión del ARNm de LOX y/o una diferencia de aproximadamente  $\pm 15\%$  de la expresión de LOX y/o de la actividad de LOX sobre un modelo, que comprende al menos un tipo celular que presenta una expresión y/o una actividad de LOX, en contacto con estos principios activos con respecto al nivel de expresión y/o de actividad de LOX en un modelo control (generalmente sin la puesta en contacto de principios activos).

45 Es preferible considerar como eficaces sobre NRAGE los principios activos que permiten obtener una diferencia de aproximadamente  $\pm 50\%$  de la expresión del ARNm de NRAGE y/o una diferencia de aproximadamente  $\pm 15\%$  de la expresión de NRAGE y/o del efecto biológico de NRAGE sobre un modelo, que comprende al menos un tipo celular que presenta una expresión y/o una actividad NRAGE, en contacto con estos principios activos con respecto a un nivel de expresión y/o de actividad de NRAGE en un modelo control (generalmente, sin la puesta en contacto de principios activos). Es por esto que la presente invención se refiere según un primer aspecto a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1. Ventajosamente, la expresión de LOX está estimulada en células epiteliales, en particular en queratinocitos.

La sustancia está destinada al tratamiento y/o a la prevención del envejecimiento de la piel.

55 Ventajosamente, la sustancia está destinada a disminuir la apoptosis a nivel de la epidermis en caso de fuerte apoptosis durante el envejecimiento de la piel.

Ventajosamente, la sustancia está destinada para aumentar la proliferación celular en caso de hipoproliferación celular a nivel de la epidermis durante el envejecimiento.

60 La sustancia está por tanto destinada a estimular la expresión de LOX, y eventualmente a inhibir la expresión de NRAGE, durante el envejecimiento de la piel.

Dicha composición es una composición cosmética.

65 Ventajosamente, el equilibrio celular entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis es el equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los queratinocitos.

Ventajosamente, la materia prima utilizada para la preparación del principio activo, se esteriliza o no por radiación, por ejemplo, beta o gamma, preferentemente a una dosis de 5 kGy y después se reduce en polvo, si fuera necesario, por ejemplo, triturando a temperatura ambiente. Después, el polvo se dispersa a razón de 2 a 5 % (peso/peso) de polvo, preferentemente 5 %, bien en un disolvente polar, por ejemplo, agua, alcohol, glicol, tal como butilenglicol o poliol, y/o en una mezcla de disolventes polares, ventajosamente una mezcla de agua/(alcohol, glicol o poliol) (tales como etanol, glicerol, butilenglicol y otros glicoles, xilitol etc.) en proporciones variables y preferentemente en una mezcla de agua/butilenglicol 75/25 o 50/50, bien en un disolvente apolar, como por ejemplo un alcano, bien en una mezcla de disolventes apolares, bien en una mezcla de disolventes polares y apolares. Después de una agitación, preferentemente, durante un mínimo de 2 horas, por ejemplo magnética, y eventualmente térmica, del disolvente, la muestra se clarifica preferentemente por decantación o centrifugación y después se filtra preferentemente a 0,45 µm o 0,22 µm.

Ventajosamente, el principio activo obtenido de acuerdo con uno de los métodos descritos anteriormente, se utiliza en una concentración final comprendida preferentemente entre 0,01 % volumen/volumen (v/v) y 10 % (v/v) y preferentemente comprendida entre 0,1 % y 1 % (v/v).

Dicha sustancia es un extracto de madera entera de Cuasia de Surinam (*Cassia amara*).

La invención se refiere, de acuerdo con otro aspecto, a un procedimiento de la preparación de una composición que comprende:

- la mezcla del principio activo con al menos un excipiente, para realizar una composición cosmética, destinada a prevenir o a tratar al menos un estado en el que el equilibrio celular entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis está ausente o está alterado.

Ventajosamente, los queratinocitos son queratinocitos humanos.

#### **Descripción detallada de la invención:**

Los inventores han descubierto, de manera inesperada, una interacción entre LOX y la proteína NRAGE. Este descubrimiento es importante y es el punto de partida de la presente invención. Representa, en efecto, como que LOX es la proteína que, situada en el cruce de las rutas de proliferación, diferenciación y apoptosis, es capaz de controlar la homeostasis celular.

Por otra parte, los inventores han descubierto que la proteína NRAGE está presente en particular a nivel de la epidermis y se expresa en particular en los queratinocitos. Este descubrimiento permite también hacer la interacción entre LOX y NRAGE una diana de acción de cuidados cosméticos o de tratamientos destinados a restablecer la homeostasis celular, en situaciones en la que está perturbada.

#### **1) Descubrimiento y caracterización de la interacción LOX/NRAGE *in vitro***

Habiendo descubierto previamente la presencia de LOX en la epidermis (Noblesse *et al*, Lysyl oxydase-like and lysyl oxydase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers, J. Invest. Dermatol. 122:621-630, 2004)), los inventores han investigado determinar la función (o funciones) que LOX podía desempeñar a este nivel, sabiendo que el papel principal que se le conoce actualmente - reticulación del colágeno y de la elastina – era poco verosímil en estas células que no forman (o muy poco) colágeno y elastina a nivel donde se ha localizado LOX.

En este objetivo, se han investigado los compañeros proteicos de LOX mediante la técnica de doble híbrido en levadura, se exploró una biblioteca de ADNC de queratinocitos de piel humana normal, utilizando en particular el cebo GAL4 BD hLOXmat, permitiendo de este modo poner de manifiesto NRAGE como posible compañero de LOX (véase el ejemplo 1).

A continuación los inventores han verificado, mediante la técnica de doble híbrido en células HeLa, que esta posible asociación también podría observarse en células de mamífero (véase el ejemplo 2).

La siguiente etapa consistió en determinar si la identificación de esta posible asociación ente LOX y NRAGE podía corresponder a una interacción física, directa, entre estas dos proteínas. Esto se realizó, en particular, mediante una técnica de co-inmunoprecipitación de proteínas LOX y NRAGE producidas después de la transfección de sus genes en células COS7. Los resultados obtenidos han confirmado, por un lado, la interacción física entre LOX y NRAGE y, por otro lado, han permitido precisar que LOX interaccionaba con una región particular de NRAGE, denominada IRD (dominio de repetición intercalado), que es una región específica de NRAGE en la familia de proteínas MAGE (véase el ejemplo 3).

En este ámbito, cabe destacar en ese estado que el descubrimiento de la interacción entre LOX y NRAGE reviste un interés muy particular cuando se considera de manera conjugada que, por un lado, la proteína NRAGE contiene dos

dominios ricos en restos lisilo, que podrían ser sitios propicios para su dimerización bajo la acción catalítica de LOX y que, por otro lado, está precisamente en forma de dímero que parece ejercer la funcionalidad de NRAGE.

5 Habiéndose descubierto también la existencia, *in vitro*, de una interacción física, directa, entre LOX y NRAGE, localizada a nivel de la región IRD de NRAGE, los inventores se han planteado la cuestión de saber si esta interacción intervendría también *in vivo*. Es esencial recordar en este estado que, contrariamente de lo que ocurre con LOX, la presencia NRAGE a nivel de la piel no se había descrito nunca antes.

## 10 **2) Manifestación de la presencia de NRAGE en la piel humana normal y en la piel humana normal reconstruida**

Los inventores han puesto de manifiesto la expresión de NRAGE en la piel, tanto a nivel de la dermis como de la epidermis (véanse los ejemplos 4 y 5).

15 En el ámbito de la presente invención, los inventores han realizado un método de localización de la expresión de NRAGE en la piel.

20 A nivel de la epidermis, los inventores han puesto de manifiesto, de manera inesperada, que NRAGE no se expresada de manera homogénea, como podía esperarse de una proteína cuya presencia se describe generalmente como ubicua, sino en forma de un gradiente de expresión.

Recordatorio sobre la estructura de la epidermis:

25 La epidermis es un epitelio estratificado que se sitúa sobre una membrana basal que la ancla a la dermis. Su espesor varía de 60 a 100  $\mu\text{m}$  como promedio, y está constituida por cuatro capas continuas, desde la más profunda a la más superficial, dando como resultado la diferenciación progresiva de queratinocitos:

- la capa basal (formada únicamente por células)
- la capa espinosa (de 5 a 6 basamentos celulares)
- 30 – la capa granulosa (de 1 a 3 basamentos celulares)
- la capa córnea o escamosa (de 5 a 10 basamentos celulares)

35 Por tanto NRAGE está ausente en la capa basal y aparece a nivel de las primeras capas de queratinocitos diferenciados, aumentando el marcaje en las capas escamosas. El marcaje de las primeras capas suprabasales de la epidermis corresponde al observado para LOX, LOX aparecía en la capa basal. Por otro lado, el marcaje de LOX disminuye en las capas superiores de la epidermis, donde NRAGE está presente, de ahí la distinción de 3 zonas

- 1 zona inferior de la epidermis que comprende la capa basal y las primeras suprabasales proliferativas donde solo se expresa LOX;
- 40 – 1 zona intermedia, que va desde las primeras capas suprabasales no proliferativas a los primeros basamentos escamosos, en la que se coexpresan LOX y NRAGE;
- 1 zona superior de la epidermis donde solo se expresa NRAGE.

45 Las observaciones a nivel celular muestran que LOX y NRAGE aparecían en la periferia de las células, en particular en la región submembranosa, NRAGE también aparecía a nivel del citoplasma. (Véanse los ejemplos 4 y 5)

50 Los inventores han demostrado así, por primera vez, la presencia de NRAGE a nivel de la piel, en la dermis y en la epidermis. También han mostrado que la epidermis comprende una parte en la que las dos proteínas LOX y NRAGE se expresan y comparten, a nivel celular, particularmente a nivel de queratinocitos, la misma localización: la zona periférica submembranosa (estando NRAGE adicionalmente presente a nivel citoplásmico).

55 Los inventores han puesto así de manifiesto que se reunían las condiciones para que pudiese darse la interacción directa, que habían puesto de manifiesto *in vitro*, en la epidermis, a nivel de la zona de colocalización de LOX y NRAGE.

## **3) Manifestación de perturbaciones de la expresión de LOX y/o de NRAGE a nivel de la epidermis con la edad y en determinadas situaciones patológicas**

60 Los inventores también han puesto de manifiesto, de manera inesperada, que el envejecimiento cutáneo, así como un determinado número de situaciones patológicas, vienen acompañados por perturbaciones de la expresión de LOX y/o de NRAGE a nivel de la epidermis.

### **3.1) Estado de LOX y de NRAGE en la epidermis**

#### **3.1.1) Piel de las personas de edad avanzada**

La piel de las personas de edad avanzada se caracteriza por una epidermis hipoproliferativa, muy fina (reducida a algunas capas celulares) e hiperqueratinizada.

5 Los inventores han puesto de manifiesto la ausencia total de LOX (detectable mediante las técnicas utilizadas) en esta piel. En cambio, NRAGE se expresa con intensidad, se localiza a nivel del citoplasma y aparece desde la primera capa suprabasal, sin gradiente de expresión.

10 De este modo, la presente invención permite estimular la expresión (y/o la actividad) de LOX, con o sin inhibición de la expresión (y/o actividad) de NRAGE, para re-inducir una zona de diferenciación y/o una zona de apoptosis regulada, particularmente por el restablecimiento de una zona de coexpresión de LOX y de NRAGE. Además, se obtiene así un espesamiento de la piel, particularmente de la epidermis.

15 De este modo, la presente invención está destinada particularmente a corregir los defectos del envejecimiento de la piel, o a prevenirlos.

### **3.1.2) Reacción de injerto contra huésped- GVH (Graft Versus Host)**

20 La GVH es una enfermedad que puede producirse después de aloinjertos de células madre hematopoyéticas. Está relacionada con el efecto de las células inmunitarias (linfocitos) contenidas en el injerto contra los órganos normales del paciente (particularmente la piel, el hígado y el tubo digestivo). A nivel de la piel, se manifiesta por una erupción maculopapulosa, pruriginosa e inflamatoria.

Los pacientes con esta enfermedad tienen una piel muy fina, con una epidermis intensamente apoptótica.

25 El estudio histológico realizado por los inventores ha puesto de manifiesto la ausencia de LOX y una presencia muy marcada de NRAGE, localizada a nivel citoplásmico y que aparece desde las primeras capas suprabasales.

### **3.1.3) Liquen plano**

30 El liquen es una enfermedad de la piel, de causa desconocida, caracterizada por la presencia de papulas de algunos milímetros de diámetro, violáceas, aplastadas, delimitadas, secas, muy pruriginosas.

35 Los inventores han puesto de manifiesto una disminución muy intensa de la expresión de LOX, es decir, su ausencia total, así como una expresión muy irregular de NRAGE. Estas observaciones expresan, sin duda, un nivel de interacción inexistente, o muy débil, entre las dos proteínas estudiadas.

### **3.1.4) Soriasis**

40 La soriasis es una enfermedad crónica de la piel, caracterizada por lesiones eritematoescamosas. El elemento fundamental es un aumento de la velocidad de la duplicación de los queratinocitos, responsable de una renovación más rápida y de un espesamiento de la epidermis.

45 A nivel histológico, se observa una hiperproliferación de células comprometidas en las primeras etapas de diferenciación terminal, una diferenciación terminal incompleta, en la que se asocia una apoptosis ausente o muy poco marcada.

50 Los inventores han detectado una expresión muy intensa de LOX y una presencia moderada de NRAGE, con un marcaje más o menos homogéneo de zonas implicadas, que solo muestra gradiente de expresión. A estas características de intensidad de expresión, que varían de lo normal, se añaden anomalías mucho más importantes en cuanto a localización de las proteínas en cuestión. De este modo, en las pieles soriásicas, LOX se expresa esencialmente en la parte inferior de la epidermis y NRAGE únicamente en su parte superior, diferenciándose así la expresión de las proteínas, sin zona de recubrimiento, tal como normalmente se observa la piel sana. A nivel celular, NRAGE se observa únicamente a nivel citoplasmático y no en la zona periférica submembranosa.

55 Estas observaciones muestran que, en la soriasis, aunque las dos proteínas LOX y NRAGE, están presentes en la epidermis, no pueden interactuar de manera directa entre sí ya que no están presentes físicamente en el mismo lugar. Esta ausencia de interacción se traduce en disfunciones observadas a nivel de la epidermis, reflejando de este modo la función de la interacción entre LOX y NRAGE en el mantenimiento de la homeostasis epidérmica.

60 De este modo, la inhibición de la expresión (y/o actividad) de LOX, y/o eventualmente la estimulación, preferentemente parcial, de la expresión (y/o actividad) de NRAGE permite particularmente obtener una zona de recubrimiento de la expresión de LOX y de NRAGE para re-inducir una zona de proliferación regulada que permita disminuir la hiperproliferación favoreciendo la apoptosis a nivel de los queratinocitos.

65 Por otra parte, la estimulación de la expresión (y/o la actividad) de NRAGE y/o la inhibición, preferentemente parcial, de la expresión (y/o actividad) de LOX, permite particularmente obtener una zona de recubrimiento de la expresión

de LOX y de NRAGE para re-inducir una zona de proliferación regulada que permita disminuir la hiperproliferación favoreciendo la apoptosis a nivel de los queratinocitos.

### **3.1.5) Eccema**

El eccema es una afección de la piel que se caracteriza clínicamente por enrojecimiento, inflamación localizada más o menos extendida, así como por vesículas supurativas que forman después costras, acompañadas por un intenso picor. En su fase crónica el eccema se complica desde una modificación de la piel con espesamiento. A nivel de la epidermis, la apoptosis se reduce.

Los inventores han puesto de manifiesto una expresión muy intensa de LOX, localizada en la periferia de las células. En cambio, NRAGE se expresa poco y solo se observa a nivel citoplásmico, lo que se traduce ciertamente en un nivel de interacción inexistente, o muy débil, entre las dos proteínas estudiadas.

De este modo, la estimulación de la expresión (y/o actividad) de NRAGE, y/o la inhibición, preferentemente parcial, de la expresión (y/o actividad) de LOX, permite aumentar la apoptosis y reducir de este modo determinados efectos del eccema.

### **3.1.6) Cánceres cutáneos epiteliales.**

Se diferencian dos grandes tipos de carcinomas cutáneos epiteliales:

- el carcinoma basocelular (90 % de los casos) es un tumor de evolución lenta, esencialmente local, que casi nunca metastatiza. Se produce por una proliferación incontrolada de los queratinocitos de la capa basal.
- el carcinoma espinocelular (10 % de los casos) tiene una evolución local mucho más agresiva y puede metastatizar. Se origina por una proliferación incontrolada de los queratinocitos de la capa espinosa.

Los inventores han puesto de manifiesto la ausencia de LOX y de NRAGE en las células invasoras de dos tipos de cánceres estudiados (cánceres basocelulares y espinocelulares) con una pérdida progresiva de LOX y de NRAGE en la epidermis en las proximidades de los tumores. Los inventores también han observado que LOX se expresa intensamente en la reacción estromal alrededor de tumores, mientras que NRAGE está ausente.

Se puede observar en este estado que la pérdida de expresión de LOX, que nunca se había puesto de manifiesto anteriormente en el caso de estos dos tipos de cánceres, es inesperada y, puede ser, específica de los cánceres epiteliales, ya que generalmente se considera que LOX está presente en los cánceres *in situ*.

La pérdida de expresión de NRAGE es también completamente nueva, ya que nunca se había descrito en ningún cáncer.

De este modo, la estimulación de la expresión (y/o actividad) de NRAGE, y de la expresión (y/o actividad) de LOX, permite restablecer la homeostasis. Es posible invertir el fenotipo tumoral, particularmente a nivel de cánceres cutáneos epiteliales.

## **3.2) Conclusión de estudios en tejidos patológicos**

A partir de estas observaciones, los inventores han podido poner de manifiesto que las situaciones en las que interviene una desregulación del equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis, bien a nivel de la epidermis de sujetos de edad avanzada, o de sujetos que padecen diversas patologías que afectan particularmente a la epidermis, se caracterizaban de manera sistemática por defectos de la expresión de LOX y/o de NRAGE, cuyos defectos eran por naturaleza alterar o hacer imposible su interacción.

Esta constatación ha conducido a los inventores a investigar la manera de restablecer el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis utilizando el control ejercido por LOX o NRAGE, preferentemente utilizando el par LOX-NRAGE.

De este modo, a partir de estos descubrimientos inesperados, los inventores han realizado métodos de identificación de principios activos modulando la expresión de LOX y/o de NRAGE para restablecer el control ejercido por estas proteínas mediante de su interacción, con el objetivo de identificar principios activos para elaborar composiciones particularmente cosméticas o farmacéuticas.

De esta manera, en el caso de hipoproliferación epidérmica (pieles envejecidas, GVH), caracterizada por una epidermis extremadamente fina y por la ausencia de expresión de LOX, la expresión de LOX se estimula, con o sin inhibición de la expresión de NRAGE, con objeto de re-inducir, a través de la modulación de la coexpresión de LOX y de NRAGE, una zona de diferenciación y de apoptosis regulada, que conduce a un espesamiento de la piel.

En los casos de hiperproliferación epidérmica (soriasis, eccema), en los que NRAGE está infraexpresada, la expresión de NRAGE se estimula, con o sin inhibición (ligera) de la de LOX, para favorecer la apoptosis re-induciendo una zona de proliferación regulada (recubrimiento LOX/NRAGE) y permitiendo detener la hiperproliferación.

5 En los casos de apoptosis intensa a nivel de la epidermis (pieles envejecidas, exposición de la piel a un estrés, en particular exposición al calor, o exposición de la piel a una radiación, en particular radiación solar, o una exposición de la piel a un agente tóxico, por ejemplo, químico o microbiológico, o la enfermedad de injerto contra huésped-GVHD, por las siglas en inglés *Graft-Versus-Host Disease*), en los que NRAGE está sobreexpresada, la expresión de NRAGE se inhibe, con o sin estimulación de la expresión de LOX.

#### **4) Manifestación de la implicación de LOX en la apoptosis celular**

15 De manera inesperada, los inventores han puesto de manifiesto la existencia de una relación aún desconocida entre LOX y la apoptosis. De este modo, los datos obtenidos reflejan, en concreto, la función antiapoptótica de LOX en los queratinocitos, cuya función hace intervenir la regulación de la proteína proapoptótica NRAGE.

#### **5) Búsqueda de principios activos**

20 La puesta de manifiesto de principios activos se realizó en concreto mediante el análisis de la expresión de ARN mensajeros de LOX y de NRAGE, en particular en queratinocitos en cultivo, preferentemente queratinocitos humanos. Los principios activos, cuya actividad se va a ensayar, se ponen en contacto con los queratinocitos en cultivo durante un tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para que el contacto sea eficaz. Los principios activos se ensayan, preferentemente, a diferentes concentraciones para detectar eventualmente la influencia de la concentración.

30 Ventajosamente, los principios activos explorados son de origen vegetal, particularmente para evitar los problemas relacionados con la síntesis química. Las ventajas de los principios activos de origen vegetal son bien conocidas por el experto en la técnica, particularmente en farmacia, dermofarmacia, nutracéutica y cosmética.

La búsqueda de principios activos se efectúa en particular realizando la extracción de los ARN totales y después efectuando una RT-PCR cuantitativa. En particular, las secuencias de cebadores preferidas son las utilizadas en el ejemplo 13 sin estar limitadas a estas.

35 La cantidad de ADNc de cada ensayo se relaciona con la cantidad de ADNc de la actina. A continuación se compara el efecto de la presencia o no de los principios activos. Cuando la expresión y/o la actividad de NRAGE y/o LOX están moduladas (estimuladas o inhibidas) con respecto a los controles, se puede entonces calificar la sustancia de principio activo. Ventajosamente, un principio activo permite modular al menos un 50 % de la expresión del ARN mensajero de LOX y/o NRAGE, o al menos un 15 % de la expresión y/o de la actividad de LOX y/o de NRAGE.

40 El compuesto de acuerdo con la presente invención se preparó en forma de composición cosmética. Para ello, para esta composición, el excipiente contiene, por ejemplo, al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en conservantes, emolientes, emulsionantes, tensioactivos, hidratantes, espesantes, acondicionadores, agentes matificantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes texturizantes, agentes abrillantadores, agentes filmógenos, solubilizantes, pigmentos, colorantes, perfumes, y filtros solares. Estos excipientes se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en aminoácidos y sus derivados, poliglicérols, ésteres, polímeros y derivados de celulosa, derivados de lanolina, fosfolípidos, lactoferrinas, lactoperoxidasas, estabilizantes a base de sacarosa, vitamina E y sus derivados, ceras naturales y sintéticas, aceites vegetales, triglicéridos, insaponificables, fitosteroles, ésteres vegetales, siliconas y sus derivados, hidrolizados de proteínas, aceite de jojoba y sus derivados, ésteres lipo/hidrosolubles, betainas, aminóxidos, extractos de plantas, ésteres de sacarosa, dióxidos de titanio, glicinas y parabenos, e incluso preferentemente del grupo que consiste en butilenglicol, estearat-2, estearat-21, estearil éter glicol-15, alcohol cetearílico, fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, butilenglicol, tocoferoles naturales, glicerina, dihidroxietil sodico, hidroxietil éter isopropílico, glicol estearato, triisononoina, octil cocoato, poliácridamida, isoparafina, lauret-7, un carbomer, propilenglicol, glicerol, bisabolol, una dimeticona, hidróxido de sodio, PEG-30 dipolihidroxiesterato, los triglicéridos cáprico/caprílico, cetearil octanoato, dibutil adipato de, aceite de pepita de uva, aceite de jojoba, sulfato de magnesio, EDTA, una ciclometicona, goma xantana, ácido cítrico, lauril sulfato de sodio, ceras y aceites minerales, isostearil isostearato, dipalmonato de propilenglicol, isostearato de propilenglicol, PEG 8 cera de abeja, glicéridos de aceite de corazón de palma hidrogenado, glicéridos de aceite de palma hidrogenados, aceite de lanolina, aceite de sésamo, cetil lactato, alcohol de lanolina, aceite de ricino, dióxido de titanio, lactosa, sacarosa, polietileno de baja densidad, una solución isotónica salina.

65 Ventajosamente, la composición anteriormente citada se formula en una forma seleccionada del grupo que consiste en una solución, acuosa u oleaginosa, una crema o un gel acuoso o un gel oleaginoso, particularmente en un tarro o en un tubo, particularmente un gel de ducha, un champú; una leche; una emulsión, una microemulsión o una nanoemulsión, particularmente de aceite en agua o de agua en aceite o múltiple o siliconada; una loción, particularmente en un frasco de vidrio, de plástico o en un frasco dosificador o en aerosol; una ampolla ; un jarabe;

un jabón líquido; una barrita dermatológico; una pomada; una crema; una solución inyectable; un producto anhidro, preferentemente líquido, pastoso o sólido, por ejemplo, en forma de bastoncillo, particularmente en forma de pintalabios; un polvo; un comprimido.

#### 5 Sobre las Figuras:

- La figura 1 representa una secuencia y un esquema de la proteína NRAGE;
- La figura 2 representa la media de los resultados obtenidos en el ejemplo 2 para la interacción en doble híbrido;
- La figura 3 representa la puesta de manifiesto de la presencia de LOX y de NRAGE en la piel reconstruida;
- 10 - La figura 4 representa la localización con microscopía confocal de LOX y NRAGE en cortes de piel humana;
- La figura 5 representa una detección de LOX y de NRAGE en cortes de piel humana de un donante de 91 años;
- La figura 6 representa la detección de LOX y de NRAGE en la piel de una persona con enfermedad de respuesta de injerto contra huésped;
- La figura 7 representa la detección de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente que presenta un cáncer de tipo
- 15 basocelular o espinocelular;
- La figura 8 representa la detección de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con liquen plano;
- La figura 9 representa la puesta de manifiesto de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con soriasis;
- La figura 10 representa la puesta de manifiesto de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente
- 20 con eccema.
- La figura 11 presenta el marcaje global de la piel reconstruida con azul Evans (las capas epidérmicas de color rojo, las células de color azul, las fibras de sustrato dérmico de color rojo, la unión dermoepidérmica con una línea de puntos).
- La figura 12 presenta la detección inmunohistoquímica de la citoqueratina 10 sobre la piel reconstruida (las
- 25 células que expresan intensamente el marcador en color rojo, los núcleos en azul, la unión dermoepidérmica con una línea de puntos).
- La Figura 13 presenta la detección inmunohistoquímica de la transglutaminasa sobre la piel reconstruida (las células que expresan intensamente el marcador en color rojo, los núcleos en azul, la unión dermoepidérmica con una línea de puntos).

30 Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán claramente para el experto en la materia después de la lectura de la descripción explicativa que hace referencia a ejemplos que solo se proporcionan a modo ilustrativo y que de ninguna manera pretende limitar el alcance de la invención.

35 Los ejemplos forman parte integrante de la presente invención y cualquier característica que aparezca nueva con respecto a un estado de la técnica anterior, cualquiera que sea a partir de la descripción tomada en su conjunto, incluyendo los ejemplos, forma parte integrante de la invención en su función y en su generalidad.

40 De este modo, cada ejemplo tiene un alcance general.

Por otro lado, en los ejemplos, salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes se dan en peso, la temperatura se expresa en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica.

#### **Ejemplos**

45 **Ejemplo 1:** clonación de NRAGE por la técnica de doble híbrido en levadura.

Inicialmente consistió en buscar los posibles compañeros de LOX en los queratinocitos. Se empleó la técnica de doble híbrido en levadura (2HL). El sistema 2HL permite la identificación y la caracterización de interacciones entre una proteína "cebo" y los posibles compañeros "dianas". En este contexto, el cebo ha sido la región madura de LOX fusionada al dominio de unión (Binding Domain, BD) al ADN del gen Gal4. La diana o dianas han sido los genes codificados por un banco de ADN complementario de queratinocitos humanos, fusionados al dominio de activación (Activation Domain, AD) del gen Gal4. La interacción de dominios del cebo (LOX) con los dominios codificados por una secuencia del banco permite la unión y la activación del promotor Gal4, que controla diferentes genes que confieren la auxotrofia a las levaduras AH109, permitiendo el crecimiento en medio deficiente y la activación de las actividades galactosidasas. Un gen que codifica una proteína candidata para ser compañero de LOX también se ha puesto de manifiesto, gracias a esta técnica de selección de posibles interaccionantes: la proteína intracelular *Melanoma Associated Antigen D1* (MAGE-D1, antígeno D1 asociado a Melanoma) o NRAGE (Figura 1).

60 **Exploración de una biblioteca de queratinocitos de doble híbrido en levadura para el cebo GAL4 BD-hLOXmat (LOX humana madura).**

Se utilizó la biblioteca de ADNc de queratinocitos de piel humana normal en el vector pGAD-10. El cebo seleccionado para la exploración fue LOXmat, codificada por la región del ADNc humano de la enzima LOX sin el péptido señal ni la región pro. La secuencia nucleotídica se insertó en fase detrás del dominio de unión al ADN (en inglés *Binding Domaine*: BD) del factor de transcripción GAL4 en el vector pBD-Gal4 Cam. El fragmento LOX +494 a

+1254 a insertar se amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), detrás del dominio de unión de GAL4 en un vector pGal4-BD usando los siguientes cebadores:

- 5        1) ggg atc cgc atg gtg ggc gac gac (introduciendo Bam HI) (SEQ ID NO: 11)  
        2) ttg tcg act aat acg gtg aaa ttg tgc (introduciendo Sal I a nivel de terminación que está conservada) (SEQ ID NO: 12).

10 El fragmento amplificado se introdujo inicialmente en el vector TOPO, y después se insertó en pGal4-BD. Para validar la expresión de la proteína de fusión BD-LOXmat, las levaduras AH 109 se transformaron por el plásmido cebo pBD-LOXmat.

15 Se efectuó la exploración de las levaduras transformadas:  $6,88 \times 10^6$  (ufc) (crecimiento en medio deficiente) en la levadura AH 109, se seleccionaron 80 clones que crecieron en medio deficiente en adenina, histidina, triptófano y leucina, de los cuales 23 se conservaron por su fuerte crecimiento.

**Ejemplo 2: validación de la interacción entre LOX y NRAGE por la técnica de doble híbrido en mamífero (2HM).**

20 Se transfectaron células Hela, por un lado con los plásmidos pAct y pAct-NRAGE, y por el otro, con pBIND y pBIND-LOXmat en presencia de lipofectamina. La actividad luciferasa se ensayó después de 48 h, y los resultados se expresaron en relación con la actividad luciferasa con respecto al control (vector vacío pBIND). Los experimentos se efectuaron por triplicado, obteniéndose la media de los resultados representada en la Figura 2.

25 La secuencia hLOX utilizada en el ejemplo 1 para el doble híbrido en levadura se insertó en fase detrás del dominio de unión de Gal4 en el vector pBIND (Promega, Madison USA) para las interacciones de doble híbrido en mamífero.

La presa N-RAGE se insertó detrás de la activación del dominio VP16 Gal4 en el vector pAct (Promega). Esta comienza en el aminoácido 152 (nucleótido 458).

30 **Ejemplo 3: co-inmunoprecipitación de LOX y de NRAGE en células de mamífero.**

35 Células COS7 (células epiteliales de riñón de mamífero) se cotransfectaron para los genes LOX (completo humano, región madura humana y región madura murina) para las construcciones pcLOX32-V5His (LOX), o, pcLOX36-V5His o pcLOX27-V5His y para el gen NRAGE por pNM3-HA (NRAGE completa) o pNM7-HA (región IRD). La transfección se realizó en placas de Petri de 100 mm de diámetro utilizando lipofectamina. Después de 48 h, las células transfectadas se lisaron en 500  $\mu$ l de tampón de lisis. Las proteínas de los lisados celulares se incubaron con anti-V5 o con anti-HA; el anticuerpo monoclonal anti-V5 o anti-HA se añadió a 1/250 al lisado celular durante 1 h 30 con agitación a 4 °C.

40 Los complejos inmunitarios (CI) así formados se precipitaron por la proteína G-sefariosa con agitación a 4 °C durante 1 h. Después de tres lavados de 10 min en tampón de lisis y una elución en tampón de SDS-PAGE, se realizó una electroforesis de todos los CI en un gel de SDS-PAGE al 10 % seguido de una transferencia Western. Después de transferir los CI a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno), se realizó el revelado:

- 45 – para NRAGE, con el anti-HA diluido a 1/1.000 después del anti-ratón-HRP (peroxidasa de rábano picante) diluido a 1/20.000  
 – para LOX, por el anticuerpo V5-HRP diluido a 1/5.000

50 La detección final se realizó mediante quimioluminiscencia de la HRP.

Los resultados obtenidos demuestran que la forma completa de NRAGE (NM3-HA) coimmunoprecipita con la forma completamente humana de LOX (LOX 32H), de LOX humana madura (LOX 36H) y de LOX murina madura (LOX 27H). Además, NRAGE (NM7-HA), que corresponde a la región IRD, se coimmunoprecipita de la misma manera con esas tres proteínas recombinantes, mostrando la implicación de esta región en la interacción.

55 **Ejemplo 4: manifestación, por inmunohistoquímica, de la presencia de LOX y de NRAGE en un modelo de piel reconstruida.**

60 La manifestación se realizó en un modelo de piel reconstruida (MIMESKIN®, Engelhard Lyon, France) preparado a partir de un sustrato dérmico (colágeno/glucosaminoglucanos/quitosano, MIMEDISC®, Engelhard Lyon, Francia) sembrado con fibroblastos humanos normales, en cuya superficie se depositaron queratinocitos humanos normales.

65 Después de 45 días de cultivo, permitiendo la diferenciación de los queratinocitos por exposición a la interfaz aire-líquido, las muestras se fijaron en fijador de Bouin o en formaldehído, y después se incluyeron en parafina.

Los inmunomarcajes sobre cortes se realizaron con los anticuerpos descritos a continuación:

- anticuerpo anti-LOX obtenido y purificado de acuerdo con el método descrito por Sommer *et al.* (Transient expression of lysyl oxidase by liver myofibroblasts in murine schistosomiasis, Laboratory Investigation 69:460-470, 1993)
- anticuerpo anti-NRAGE (IgG policlonal de cabra),
- anticuerpo secundario de conejo anti-cabra.

Los inmunocomplejos se detectaron con una IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa, utilizando diaminobencidina como sustrato, y después efectuando una tinción de contraste con hematoxilina.

La **Figura 3** presenta la detección inmunohistoquímica de LOX y NRAGE en la piel reconstruida.

La posición de la unión dermoepidérmica se indica con una línea continua, la del sustrato dérmico con una flecha, y la localización de los queratinocitos se indica con una cabeza de flecha.

La expresión de LOX aparece desde la capa basal, persiste en las capas suprabasales y desaparece progresivamente en las capas diferenciadas. La expresión de NRAGE está ligeramente desfasada, se afirma desde las capas suprabasales no proliferativas y se intensifica fuertemente en las capas granulosa y escamosa, allí donde LOX no se expresa más.

Por tanto están asociadas en las capas suprabasales no proliferativas de la epidermis del modelo de piel reconstruido MIMESKIN®. Esta colocalización se ha confirmado en inmunohistología (IH) sobre la piel humana normal.

Los inventores también han puesto de manifiesto que las proteínas de LOX y NRAGE se expresan en la epidermis, con una zona de colocalización a nivel de las capas espinosas.

**Ejemplo 5: manifestación de la colocalización de LOX y de NRAGE en la piel humana normal con microscopía confocal.**

Se realizaron cortes congelados de muestras de piel humana normal obtenidas por resección quirúrgica (prepuccio). Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-LOX y anti-NRAGE del ejemplo 4 para detectar la expresión de LOX y de NRAGE. Los anticuerpos secundarios utilizados son:

- IgG anti-conejo de burro-F1TC, marcaje de fluoresceína de color verde;
- IgG anti-cabra de burro-R, marcaje de rodamina de color rojo.

Se realizó un control negativo sin anticuerpos primarios.

La observación de doble marcaje se realizó utilizando un microscopio directo confocal AXIOPLAN 2 LSM510 ZEISS, y la adquisición de las imágenes se realizó utilizando programa informático de ZEISS LSM5 Image Browser.

La **Figura 4** presenta la inmunodetección de LOX y de NRAGE en la piel humana normal con microscopía confocal.

Las observaciones confirman los resultados del ejemplo 4, que ilustran adicionalmente la colocalización de LOX y de NRAGE en las capas espinosa de la epidermis de piel humana normal, con una yuxtaposición de la expresión de LOX y de NRAGE casi perfecta. De este modo, las observaciones a nivel celular muestran que LOX y NRAGE aparecen en la periferia de la célula (en la zona periférica submembrana) apareciendo del mismo modo NRAGE a nivel del citoplasma.

Los inventores han puesto así de manifiesto que se reúnen las condiciones para que la interacción directa que habían puesto de manifiesto *in vitro* podía funcionar en la epidermis a nivel de la zona de colocalización de LOX de NRAGE.

**Ejemplo 6: manifestación de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de personas con edades diferentes.**

Se realizó un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4, en cortes de piel humana que provenían de 2 donantes de clases de edades diferentes (menos de 20 años y más de 60 años).

La Figura 5 presenta un marcaje efectuado en la piel de un donante de 91 años. Las observaciones muestran una epidermis hipoproliferativa, muy fina (reducida a algunas capas celulares) e hiperqueratinizada.

Los inventores han puesto de manifiesto la ausencia total de LOX (detectable por las técnicas utilizadas). En cambio,

NRAGE, localizada a nivel del citoplasma, se expresaba con intensidad y aparecía en la primera capa suprabasal, sin gradiente de expresión.

**Ejemplo Comparativo 7: detección de LOX y de NRAGE en la piel de una persona con enfermedad de respuesta de injerto contra huésped (o GVHD: *graft versus host*).**

Se realizó un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4, en cortes de piel humana de pacientes con enfermedad de reacción de injerto contra huésped (GVHD). En este estudio participaron 5 donantes diferentes.

La **Figura 6** pone de manifiesto una desaparición casi total de LOX en la epidermis (sin modificación de su expresión a nivel dérmico) y una presencia muy marcada de NRAGE, localizada a nivel citoplásmico y apareciendo en las primeras capas suprabasales.

**Ejemplo Comparativo 8: detección de LOX y de NRAGE en la piel de una persona que presenta un cáncer de tipo basocelular y espinocelular.**

Se llevó a cabo un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4 en muestras de piel de pacientes que presentaban un cáncer basocelular o espinocelular.

La **Figura 7** pone de manifiesto, en los dos tipos de cáncer estudiados:

- una disminución progresiva de la expresión de LOX y de NRAGE, en la epidermis, en la periferia de los tumores,
- una ausencia de LOX y de NRAGE a nivel de células invasivas epidérmicas.
- una fuerte expresión de LOX a nivel de la reacción estromal dérmica, alrededor de los tumores,
- la ausencia de NRAGE a nivel de la reacción estromal dérmica, alrededor de los tumores.

**Ejemplo comparativo 9: detección de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con liquen plano.**

Se realizó un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4, en cortes de piel de 3 pacientes con liquen plano.

La **Figura 8** muestra una disminución muy fuerte de la expresión de LOX en la epidermis, es decir su ausencia total. Esta perturbación se correlaciona con una irregularidad de la expresión de NRAGE en la epidermis.

**Ejemplo comparativo 10: manifestación de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con soriasis.**

Se realizó un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4, en cortes de piel de 5 pacientes con soriasis.

La **Figura 9** es representativa del conjunto de cortes observados y muestra, a nivel de la epidermis, una expresión muy fuerte de LOX y una presencia moderada de NRAGE, con un marcaje más o menos homogéneo de zonas afectadas, no mostrando gradiente de expresión. A estas características de intensidad de expresión que varían de lo normal, se añaden anomalías mucho más importantes en lo que se refiere a la localización de las proteínas implicadas. De este modo, en las pieles soriásicas, LOX se expresa esencialmente en la parte inferior de la epidermis y NRAGE únicamente en su parte superior, diferenciándose así la expresión de las proteínas, sin zona de recubrimiento, tal como normalmente se observa la piel sana. A nivel celular, NRAGE se observa únicamente a nivel citoplasmático y no en la zona periférica submembranosa.

**Ejemplo comparativo 11: manifestación de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con eccema.**

Se realizó un estudio inmunohistológico utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 4 en cortes de piel de pacientes con eccema.

La **Figura 10** manifiesta, a nivel epidérmico, una expresión muy fuerte pericelular de LOX. En cambio, NRAGE se expresa poco y se observa a nivel citoplásmico únicamente, lo que se traduce en una pérdida de la colocalización a nivel celular.

**Ejemplo 12: manifestación de la implicación de LOX en la inhibición de la apoptosis.**

El estudio se realizó en cultivos de queratinocitos humanos diferenciados en monocapa y a confluencia. El efecto de LOX sobre la apoptosis se puso de manifiesto inhibiendo su actividad, añadiendo  $\beta$ -APN (0,02 % p/v- (peso/volumen)), en condiciones normales o proapoptóticas (choque térmico provocado por una exposición a una temperatura de 45 °C +/-0,5 °C durante 1h30).

La detección y la cuantificación de la muerte celular por apoptosis utilizan la técnica TUNEL (por sus siglas en inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*, marcado de final de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal) que se basa en el marcaje de deleciones del ADN acompañante de la apoptosis.

5 La primera etapa consiste en marcar las roturas del ADN con TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) que cataliza la polimerización de nucleótidos marcados con fluoresceína en el extremo 3'-OH libre del ADN. La segunda etapa consiste en detectar la fluoresceína incorporada por un anticuerpo anti-fluoresceína, conjugado con fosfatasa alcalina, después de incubación con el sustrato de esta última.

10 La experimentación se validó con un control positivo obtenido por fragmentación del ADN a través de una solución de DNasa y de un control negativo obtenido depositando tampón fosfato.

15 Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 1**

|                  | Sin choque térmico (% de células marcadas) | Con choque térmico (% de células marcadas) |
|------------------|--|--|
| Sin $\beta$ -APN | 6 %  | 39 %                                       |
| Con $\beta$ -APN | 56 %                                       | 81 %                                       |

Los resultados obtenidos demuestran que:

- 20
- el choque térmico (45 °C +/- 0,5 °C durante 1h30) induce una apoptosis celular marcada,
  - la inhibición de la actividad enzimática de LOX por  $\beta$ -APN conlleva a un aumento significativo de la apoptosis.

Estos resultados ponen de manifiesto un efecto antiapoptótico de la actividad de LOX.

25 **Ejemplo comparativo 13: Análisis de la expresión de los ARN mensajeros de LOX y de NRAGE por queratinocitos en cultivo, diferenciados en medio cálcico, con y sin puesta en contacto de principios activos cuya actividad va a ensayarse (Análisis realizado, por ejemplo, por RT-PCR cuantitativa, exploración de principios activos).**

30 Los principios activos se ensayaron en queratinocitos de prepucio humano normal de sujetos jóvenes (*pooled normal human epidermal keratinocytes foreskin-Clonetics*).

Los queratinocitos se amplificaron, por ejemplo, en medio K-SFM (keratinocytes sérum free médium, medio asérico sin queratinocitos) complementado con antibióticos hasta el tercer pase a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

35 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, por ejemplo, a razón de 40.000 células por cm<sup>2</sup> y se cultivaron hasta aproximadamente 80 % de confluencia. A continuación las células se cultivaron en medio de hipercálcico (CaCl<sub>2</sub>-1,7 mM a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %) para inducir una diferenciación de las células.

40 La materia prima utilizada para la preparación de los principios activos, cuando se trata de plantas (preferentemente raíces, tallos, corteza, flores, frutos, granos, semillas, gomas, exudados, hojas o la planta entera) o de proteínas, se esterilizó, o no, por radiación, por ejemplo, beta o gamma, a una dosis preferentemente de 5 kGy, y después se redujo en polvo, si fuera necesario, por ejemplo, triturando a temperatura ambiente. Después, el polvo se dispersó a razón de 2 a 5 % (peso/peso) de polvo, preferentemente 5 %, bien en un disolvente polar, por ejemplo, agua o butilenglicol, y/o en una mezcla de disolventes polares, ventajosamente una mezcla de agua/(alcohol, glicol o poliol) (tales como etanol, glicerol, butilenglicol y otros glicoles, xilitol etc....), en proporciones variables y preferentemente en una mezcla de agua/butilenglicol 75/25 o 50/50, o en un disolvente apolar, como por ejemplo un alcano, o en una mezcla de disolventes apolares o una mezcla de disolventes polares y apolares. Después de agitar durante un mínimo de 2 horas, por ejemplo con agitación magnética, la muestra se clarificó por decantación o centrifugación y después se filtró preferentemente a 0,45  $\mu$ m o 0,22  $\mu$ m.

45 La materia prima utilizada para la preparación de los principios activos, cuando se trata de moléculas caracterizadas (por ejemplo, moléculas obtenidas por síntesis o hemisíntesis, moléculas biológicas obtenidas por purificación) se diluye en un disolvente, preferentemente agua o dimetilsulfóxido (concentración preferentemente comprendida entre 10<sup>-6</sup>M y 10<sup>-2</sup>M, y preferentemente del orden de 10<sup>-4</sup> M, o preferentemente comprendida entre 1 % en peso/peso y 5 % en peso/peso, en función de las moléculas). La solución obtenida a continuación se filtra eventualmente, preferentemente, a 0,45  $\mu$ m o 0,22  $\mu$ m.

60 Los principios activos obtenidos de acuerdo con uno de los métodos descritos anteriormente, se ensayaron después a una concentración final preferentemente comprendida entre 0,01 % volumen/volumen (v/v) y 10 % (v/v) y ventajosamente comprendida entre 0,1 % y 1 % (v/v), por ejemplo al 1 % (v/v).

La incubación en presencia de células se realizó ventajosamente durante 24 horas en medio K-SFM hipercálcico sin factores de crecimiento. Las células se congelaron en seco a -80 °C después de un aclarado en tampón fosfato a pH de 7,4.

5 Extracción de los ARN totales

Los ARN totales se extrajeron con el sistema SV Total RNA Isolation System (Promega, Meylan, Francia) para las condiciones de las placas de 96 pocillos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 La modificación de la expresión de genes se realizó por RT-PCR en tiempo real midiendo la expresión de cada gen relacionado con la actina (*housekeeping gene*, gen constitutivo) y expresado en % del control negativo no tratado.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)

15 Se añadieron 10 µl de ARN totales 5 ng/µl a 40 µl de mezcla de PCR (compuesta por 25 µl de SYBR Green Buffer Mix 2X, 0,5 µl de mezcla de enzima, 0,5 µM de cebador final en sentido y 0,5 µM de cebador final antisentido, ARNasa agua y DNasa libre csp para 40 µl).

20 La RT-PCR se lleva a cabo en diferentes etapas tal como retrotranscripción a 50 °C, 30 min, activación de la polimerasa 95 °C, 15 min, realización de ciclos de PCR (95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) x 50 ciclos

Realización de la curva de fusión

25 90 °C, 1min  
30 °C, 1min  
50 °C a 95 °C, 10 s/°C (curva de fusión)

El porcentaje de estimulación o de inhibición se expresa en relación con el control no tratado tratar (en ausencia de la sustancia a ensayar).

30 Gen de Actina - Hibridación a 60 °C

sentido GTGGGGCGCCCCAGGCACCA (SEQ ID NO 7)  
antisentido CTCCTTAATGTACGCACGATTTC (SEQ ID NO 8)

35 Gen de LOX - Hibridación 60 °C

sentido ACGTACGTGCAGAAGATGTCC (SEQ ID NO 3)  
antisentido GGCTGGGTAAGAAATCTGATG (SEQ ID NO 4)

40 Gen de NRAGE-Hibridación a 60 °C

sentido TGCACAGACATCAGCAGATGG (SEQ ID NO 5)  
antisentido TTCACGGATGATATCTCTCAGC (SEQ ID NO 6)

45 Gen de Involucrina-Hibridación a 60 °C

sentido TGTTCCCTCCTCCAGTCAATACCC (SEQ ID NO 9)  
antisentido ATTCCTCATGCTGTTCCCAGTGC (SEQ ID NO 10)

50 Para tener en cuenta la población celular presente, todos los resultados se generaron como señal de "actina", utilizada como gen constitutivo (*Housekeeping gene*). De acuerdo con la experimentación, el umbral de medición de C(T) (en inglés = *Cycle Threshold*, umbral de ciclo) se fijó para un T (*Threshold*, umbral en español) comprendido entre 0,05 y 0,01 y finalmente después se calculó una unidad arbitraria de medición para cada gen de acuerdo con la fórmula:

$$S_{\text{gen «x»}} = 10^7 \times (1/2)^{C(T)_{\text{gen«x»}}}$$

60 En la que, C(T) gen «x», significa el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia de 0,01-0,05 del gen «x».

Los valores de los genes de interés se generaron como señal de «actina» calculando la relación:

$$R = S_{\text{gen «x»}} / S_{\text{actina}}$$

65

Estas relaciones se compararon entre las muestras tratadas y no tratadas, siendo «x» el gen de actina, de LOX o de NRAGE.

#### Exploración de principios activos:

5 Las cantidades de ADNc de cada ensayo se relacionaron con la cantidad de ADNc de la actina y finalmente con controles negativos (sin principios activos). Los resultados se consideran como significativos cuando el efecto medido alcanza un factor de aproximadamente 2. Sobre 120 principios activos ensayados, 3 corresponden a estos criterios, a las concentraciones ensayadas y en las condiciones definidas. Estos principios activos son los siguientes y son el objeto de la siguiente tabla:

**Tabla 2**

| Nombre | NRAGE Control multiplicado por: | LOX Control multiplicado por: |
|--------|---------------------------------|-------------------------------|
| Efedra | 2                               | 2                             |
| Soja   | 2,5                             | 1                             |
| Lúpulo | 1                               | 2                             |

15 Preferentemente, el extracto de efedra se extrae de toda la planta, particularmente por una extracción con un disolvente polar como el agua o una mezcla de agua/butilenglicol (por ejemplo, 75/25 o 50/50), preferentemente agua.

20 Preferentemente, el extracto de lúpulo se extrae de conos, particularmente por una extracción con un disolvente polar como el agua o una mezcla de agua/butilenglicol (75/25 o 50/50), preferentemente agua.

Preferentemente, el extracto de soja se extrae de la semilla, particularmente por una extracción con un disolvente polar como el agua o una mezcla de agua/butilenglicol (75/25 o 50/50), preferentemente agua.

#### Conclusiones

25 A partir del banco de 120 principios activos y en las condiciones tenidas en cuenta:

- 1 principio activo puede activar significativamente la tasa de síntesis de ARNm de los genes que codifican NRAGE y LOX,
- 30 – 1 principio activo puede activar significativamente la tasa de síntesis de ARNm del gen que codifica NRAGE, sin tener efecto sobre el gen que codifica LOX,
- 1 principio activo puede activar significativamente la tasa de síntesis de ARNm del gen que codifica LOX, sin tener efecto sobre el gen que codifica NRAGE.

35 Este estudio ha permitido seleccionar principios activos susceptibles de modular, al menos a nivel de los queratinocitos, el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis.

40 El extracto de efedra puede utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, preferentemente cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares) o liquen plano, o eventualmente para tratar determinadas manifestaciones cutáneas del GVH, o incluso para reducir los efectos del envejecimiento de la piel.

45 El extracto de soja puede utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, como los cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares), el GVH, o el liquen plano, o para combatir o prevenir el envejecimiento. El extracto de soja puede utilizarse particularmente para combatir la hiperproliferación celular.

50 El extracto de lúpulo puede utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, como los cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares), eccema, soriasis. El extracto de lúpulo puede utilizarse particularmente para combatir la hiperproliferación celular.

El extracto de soja y el extracto de lúpulo pueden utilizarse en asociación, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, como los cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares), o el liquen plano.

55 El extracto de soja y el extracto de efedra pueden utilizarse en asociación, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, como los cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares), o el liquen plano.

El extracto de lúpulo y el extracto de efedra pueden utilizarse en asociación, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, como los cánceres epiteliales cutáneos (basocelulares o espinocelulares), o el liquen plano.

5 **Ejemplo comparativo 14: análisis de la cinética de la expresión de los ARN mensajeros, por RT-PCR cuantitativa, de NRAGE y de LOX sobre queratinocitos durante la diferenciación cálcica. Efecto de los principios activos sobre la cinética de expresión.**

10 Las condiciones experimentales aplicadas para obtener células en confluencia al 80 % son idénticas a las descritas en el ejemplo comparativo 13. La diferenciación se efectúa en presencia calcio (CaCl<sub>2</sub> 1,7 mM) y del principio activo. Se efectúa un análisis después de 2, 3 y 4 días de incubación por Q-RT-PCR (método descrito en el ejemplo 13).

15 También se ensayaron otras nueve sustancias. Una de ellas, un extracto de canela, permite tener una inhibición de LOX y de NRAGE en las condiciones experimentadas tenidas en cuenta.

**Tabla 3**

| Nombre   | NRAGE<br>Control multiplicado por | LOX<br>Control multiplicado por |
|----------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Canela   |                                   |                                 |
| 2 D      | 0,9                               | 0,5                             |
| 3 D      | 0,7                               | 0,7                             |
| 4 D      | 0,2                               | 0,5                             |
| (D=Días) |                                   |                                 |

20 Preferentemente, el extracto de canela es extracto de la corteza, particularmente por una extracción con un disolvente polar como el agua o una mezcla de agua/butilenglicol (75/25 o 50/50), preferentemente agua.

Conclusión

El extracto de canela puede utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como la soriasis.

25 El extracto de canela y el extracto de soja (cuyo efecto se ha detectado en el ejemplo comparativo anterior) pueden utilizarse en asociación, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades tales como el tratamiento de determinadas manifestaciones cutáneas de GVH, un eczema, una soriasis, o incluso para reducir los efectos del envejecimiento de la piel.

30 **Ejemplo 15: Análisis de la expresión de los ARN mensajeros de LOX por queratinocitos en cultivo en ausencia de diferenciación cálcica, con y sin puesta en contacto de principios activos cuya actividad se va a ensayar (Análisis realizado por ejemplo por RT-PCR cuantitativa, exploración de principios activos).**

35 Los principios activos se ensayaron en queratinocitos humanos normales de sujetos jóvenes obtenidos por extracción enzimática de biopsias humanas recogidas después de resección quirúrgica y cultivados en monocapas en medio definido K-SFM (medio asérico con queratinocitos con complementos) complementado con antibióticos a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%.

40 Las células se sembraron al segundo pase en placas de 24 pocillos, por ejemplo, a razón de 30.000 células por cm<sup>2</sup> y se cultivaron hasta aproximadamente una confluencia del 95 %. Los sedimentos celulares se aclararon en tampón fosfato pH 7,4 preferentemente con calcio y magnesio, antes de poner en contacto con los principios activos a ensayar o con los controles positivos de referencia diluidos en el medio K-SFM preparados sin complementos pero con antibióticos.

45 Se ensayaron principios activos de diferentes orígenes (vegetal, biotecnológico o moléculas de síntesis, por ejemplo) de 0,1 % volumen/volumen (v/v) a 1 % (v/v). Los principios activos de origen vegetal se ensayaron, por ejemplo, a 1 % (v/v) y las moléculas de síntesis se ensayaron, por ejemplo, a 0,1 % (v/v).

50 En particular, los principios activos de origen vegetal son extractos que se obtienen macerando las plantas (preferentemente raíces, rizomas, tallos, cortezas, flores, frutos, granos, semillas u hojas) a 2-5 % (p/p) en un disolvente o en una mezcla de disolventes, ventajosamente una mezcla de agua/(alcohol, glicol o polioliol) (tales como etanol, glicerol, butilenglicol y otros glicoles, xilitol etc..) de 100/0 a 0/100 (v/v). A continuación los extractos obtenidos se filtran o destilan para recuperar la fracción soluble que después se filtra preferentemente a 0,45 µm. Los hidrolizados biotecnológicos se obtienen por fermentación de extractos vegetales en presencia de  
55 microorganismos ventajosamente de la familia de *Lactobacillus* o *Saccharomyces*. Estos hidrolizados se filtran

después preferentemente a 0,45 µm.

5 La incubación se realiza ventajosamente durante 24 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio K-SFM sin factores de crecimiento con antibióticos. Los controles negativos son bien el medio de cultivo solo, bien el medio de cultivo que contiene de 0,1 % (v/v) a 1 % (v/v) de disolvente utilizado durante el procedimiento de extracción de los extractos ensayados. El control positivo de referencia utilizado para inducir una diferenciación de las células es una solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>- a una concentración final de 1,7 µml).

10 Las células no tratadas (control NT) se congelaron en seco a -80 °C después de aclarar en tampón fosfato a pH 7,4. Después de tratamiento durante 24 h en presencia de principios activos o controles, las células se congelaron en seco a -80 °C después de aclarar en tampón fosfato a pH 7,4.

Extracción de ARN totales

15 Los ARN totales se extraen usando el sistema SV Total RNA Isolation System (Promega, Meylan, Francia) para las condiciones de placas de 24 pocillos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 La modificación de la expresión de los genes se realiza por RT- PCR en tiempo real midiendo la expresión de cada gen en relación con la actina (gen conservador) y se expresa en % del control negativo no tratado (NT).

RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)

25 Se añadieron 10 µl de ARN totales 5 ng/µl a 40 µl de mezcla de PCR (compuesta por 25 µl de SYBR Green Buffer Mix 2X, 0,5 µl de mezcla de enzima, 0,5 µM de cebador final en sentido y 0,5 µM de cebador final antisentido, ARNasa agua y DNasa libre csp para 40 µl).

La RT-PCR se lleva a cabo en diferentes etapas tal como retrotranscripción a 50 °C, 30 min, activación de la polimerasa 95 °C, 15 min, realización de ciclos de PCR (95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) x 50 ciclos

30 Realización de la curva de fusión

- 90 °C, 1min
- 30 °C, 1min
- 50 °C a 95 °C, 10 s/°C (curva de fusión)

35 Cebadores utilizados:

Gen de Actina-Hibridación 60 °C

40 Sentido GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA (SEQ ID NO: 7)  
Antisentido CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC (SEQ ID NO: 8)

Gen de LOX - Hibridación 60 °C

45 Sentido TAC CAG CAG AAG ATG GTG dirección TCC (SEQ ID NO: 3)  
Antisentido GGC TGG AGA GTA AAT CTG ATG (SEQ ID NO: 4)

50 Para tener en cuenta la población celular presente, todos los resultados se generaron como señal de "actina", utilizada como gen constitutivo (*Housekeeping gene*). De acuerdo con la experimentación, el umbral de medición de C(T) (en inglés = *Cycle Threshold*, umbral de ciclo) se fijó para un T (*Threshold*, umbral en español) comprendido entre 0,05 y 0,01 y finalmente después se calculó una unidad arbitraria de medición para cada gen de acuerdo con la fórmula:

$$S_{gen \text{ «LOX»}} \cdot 10^7 \times (1/2)^{C(T)_{gen \text{ «LOX»}}}$$

55 C(T)gene «LOX», significa el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia de 0,01-0,05 del gen «LOX».

60 Los valores de los genes de interés se generaron como señal de «actina» calculando la relación:

$$R = S_{gen \text{ «LOX»}} / S_{actina}$$

Estas relaciones se compararon con las muestras tratadas y no tratadas.

65

Exploración de principios activos:

5 Las cantidades de ADNc de cada ensayo se relacionaron con la cantidad de ADNc de la actina y finalmente con controles negativos (NT). Los resultados se consideran como significativos cuando el efecto medido es una modulación de un factor de aproximadamente 2 (estimulación) o 0,5 (inhibición). Sobre 60 principios activos ensayados, 30 corresponden a estos criterios, en las condiciones definidas. Estos principios activos son los siguientes y son el objeto de la siguiente tabla:

**Tabla 1**

| <b>Descripción</b>         | <b>Nombre en latin</b>                    | <b>Modulación de LOX frente a NT</b> | <b>Parte de la planta utilizada preferentemente</b> |
|----------------------------|---|--------------------------------------|---|
| Saponaria blanca           | Gypsophila ssp                            | 0,4                                  | raíz  |
| Sándalo rojo               | Pterocarpus santalinus                    | 0,4                                  | madera entera                                       |
| Brionia                    | Bryonia dioica                            | 0,5                                  | raíz  |
| Acebo enano                | Ruscus aculeatus                          | 2,0                                  | raíz  |
| Limón                      | Citrus limonia                            | 2,0                                  | fruto   |
| Mandaria                   | Citrus reticulata                         | 2,1                                  | fruto   |
| Etil trans 3 hexenoato     | hexenoato                                 | 2,3                                  | -   |
| Khella                     | Amni visnaga                              | 2,4                                  | fruto   |
| Ácido alginico             |   | 2,4                                  | -   |
| Zanahoria                  | Daucus Carota                             | 2,4                                  | raíz  |
| 2 Metil butirato de metilo | /   | 2,5                                  | -   |
| Badianier de china         | Illicium verum                            | 2,5                                  | fruto   |
| Ciprés                     | Cupressus semperviren                     | 2,6                                  | fruto   |
| Goma asafoétida            |   | 2,6                                  | -   |
| Xilitol                    | /   | 2,8                                  | -   |
| Lúpulo                     | Humulus lupulus                           | 2,8                                  | fruto   |
| Endrino                    | Prunus spinosa                            | 3,1                                  | fruto   |
| Madroño                    | Arbutus unedo                             | 3,3                                  | hoja  |
| Pyrole                     | Chimaphila umbellata                      | 3,4                                  | planta  |
| Alhuceña aromática         | Asperula odorata                          | 4,7                                  | planta  |
| Artemisa                   | Artemisia vulgaris                        | 4,7                                  | raíz  |
| Sáuco                      | Sambucus nigra                            | 5,0                                  | fruto   |
| Col china                  | Brassica Brassica campestris var. Pekinen | 5,3                                  | planta  |
| Canela                     | Cinnamomum spp                            | 5,5                                  | tallo leñoso  |
| Efedra                     | efedra sinica                             | 6,0                                  | planta  |
| Casia de Surinam           | Cassia amara                              | 6,2                                  | madera entera                                       |
| Cacaotero                  | Theobroma cacao                           | 7,4                                  | cáscara de fruto                                    |

| Descripción       | Nombre en latin     | Modulación de LOX frente a NT | Parte de la planta utilizada preferentemente |
|-------------------|---------------------|-------------------------------|--|
| Espiga            | Serica              | 7,9                           | -  |
| Zarzaparilla roja | Smilax ornata       | 9,0                           | raíz   |
| Grosella          | Ribes rubrum        | 9,1                           | fruto  |
| Piretro           | Anacyclus pyrethrum | 9,8                           | raíz   |
| Hinojo            | Foeniculum          | 10,2                          | planta                                       |

### Conclusiones

A partir del banco de 60 principios activos y en las condiciones tenidas en cuenta:

- 5
- 3 principios activos pueden inhibir significativamente la tasa de síntesis de ARNm del gen que codifica LOX,
  - 28 principios activos, incluida la Cuasia de Surinam, pueden activar significativamente la tasa de síntesis de ARNm del gen que codifica LOX,
- 10 Este estudio ha permitido seleccionar principios activos susceptibles de modular, al menos a nivel de queratinocitos, el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis.

**Ejemplo comparativo 16: Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la regulación de la homeostasis proliferación/diferenciación epidérmica en un modelo de piel reconstruida con y sin puesta en contacto con principios activos, cuya actividad se ensaya mediante histología (ejemplo el extracto de efedra).**

La manifestación de marcadores de proliferación o diferenciación se realizó en un modelo de piel reconstruida (MIMESKIN®, Engelhard Lyon, Francia) preparado a partir de un sustrato dérmico (colágeno/glucosaminoglucano/quitosano, MIMEDISC®, Engelhard Lyon, Francia) sembrado por fibroblastos humanos normales, en cuya superficie se depositaron queratinocitos humanos normales, extrayéndose las células por tratamiento enzimático de biopsias obtenidas por resección quirúrgica.

El modelo de piel reconstruida se realiza en particular de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 25
- de 0,5 a  $1.10^6$  fibroblastos de piel humana normal se sembraron en un sustrato matricial a base de colágeno/glucosaminoglucanos/quitosano, después se cultivaron en un medio nutritivo, por ejemplo DMEM-Glutamax complementado con 10 % de suero de ternero; ácido ascórbico, preferentemente a una concentración final de 1 mM; EGF (factor de crecimiento epidérmico), preferentemente a una concentración final de 10 ng/ml; Normocina, preferentemente a una concentración final de 100 µg/ml, durante 21 días.
  - de 0,5 a  $1.10^6$  queratinocitos humanos normales se sembraron en el equivalente dérmico, después se cultivaron en un medio nutritivo, por ejemplo DMEM-Glutamax/Ham F-12 (proporción 3/1 v/v) complementado con suero de ternero; ácido ascórbico, preferentemente a una concentración final de 1 mM; EGF (factor de crecimiento epidérmico), preferentemente a una concentración final de 10 ng/ml; hidrocortisona, preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml; umulina, preferentemente a una concentración final de 0,12 UI/ml; isuprel, preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml; triyodotironina, preferentemente a una concentración final de  $2.10^{-9}$  M; adenina, preferentemente a una concentración final de 24,3 µg/ml; Normocina, preferentemente a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo prosiguió durante 7 días en inmersión. A continuación los cultivos se colocaron en la interfaz aire-líquido durante 14 días más en el mismo medio que el cultivo en inmersión, sin incluir suero de ternero, hidrocortisona, isuprel, triyodotironina y umulina.

El principio activo (extracto de efedra) se diluyó ventajosamente en los medios de cultivo anteriormente descritos a 0,5 y 1 % y se utilizó 3 días después de la siembra respectiva de fibroblastos y de queratinocitos (es decir, los días 3 a 21 y los días 24 a 42). El control positivo se realizó preferentemente añadiendo cloruro de calcio 1,5 mM en una concentración final durante la fase emergente de pieles reconstruidas (los días 28 a 42) para estimular la diferenciación epidérmica.

Al final del cultivo, las muestras se congelaron, se incluyeron en una resina termosensible y después se crioseccionaron a 5 µm.

Los marcajes sobre los cortes se realizaron con los reactivos descritos a continuación:

- anticuerpo primario anti-transglutaminasa humana
  - anticuerpo primario anti-citoqueratina 10 humana
  - anticuerpos secundarios acoplados a alexa-flúor
  - azul de Evans
- 5 - Dapi

La visualización de los inmunomarcajes se realizó al microscopio fotónico (Axioskop2plus - Zeiss, alemania) y la cuantificación de los inmunomarcajes de transglutaminasa se realizó por análisis de imágenes (Lucia - Nikon, Francia) y se evaluaron los efectos del tratamiento por el principio activo (ensayo estadístico Holm-sidak, p<0,01).

10

**Tabla 1:** Cuantificación de la intensidad de marcaje de la transglutaminasa.

| INTENSIDAD                   | No tratada   | Calcio       | Efedra al 0,5 % | Efedra al 1 % |
|------------------------------|--------------|--------------|-----------------|---------------|
|                              | 0,149        | 0,061        | 0,082           | 0,276         |
|                              | 0,099        | 0,076        | 0,126           | 0,196         |
|                              | 0,092        | 0,064        | 0,094           | 0,192         |
| <b>Media</b>                 | <b>0,113</b> | <b>0,067</b> | <b>0,100</b>    | <b>0,221</b>  |
| Desviación típica            | 0,031        | 0,008        | 0,023           | 0,048         |
| <b>Variación frente a NT</b> | <b>100 %</b> | <b>59 %</b>  | <b>88 %</b>     | <b>196 %</b>  |
| Significatividad frente a NT | -            | Non          | Non             | Oui           |
| <b>Variación frente a Ca</b> | <b>169 %</b> | <b>100 %</b> | <b>149 %</b>    | <b>330 %</b>  |
| Significatividad frente a Ca | No           | -            | No              | Si            |

Estos resultados indican que el principio activo induce el mismo tipo de diferenciación epidérmica que el control positivo con una relación dosis-efecto. En efecto, las pieles tratadas presentan un mayor número de capas queratinocitarias que expresan la transglutaminasa, en particular en la capa denominada granulosa. Por otro lado, el marcaje obtenido es más intenso y más definido, tal como se ilustra en el engrosamiento de la parte epidérmica. La cuantificación demuestra claramente la inducción de la forma proteica después de tratamiento en particular, a la concentración de principio activo de 1 % (introducción de 2 veces).

15

La **Figura 11** presenta el marcaje global de la piel reconstruida con azul de Evans (capas epidérmicas en color rojo, las células en azul, las fibras del sustrato dérmico en rojo, la unión dermoepidérmica con una línea de puntos).

20

Estos resultados indican que el principio activo induce el mismo tipo de diferenciación epidérmica que el control positivo con una relación dosis-efecto. En efecto, las pieles tratadas presentan un mayor número de capas queratinocitarias diferenciadas y en particular se observarse un aumento del espesor de la capa denominada granulosa. Por otro lado, también se obtiene un efecto interesante sobre la densidad fibroblástica a nivel de las dermis tratadas con efedra.

25

La **Figura 12** presenta la detección inmunohistoquímica de la citoqueratina 10 sobre piel reconstruida (células que expresan intensamente el marcador en rojo, el núcleo en azul, la unión dermoepidérmica con línea de puntos).

30

Estos resultados indican que el principio activo induce el mismo tipo de diferenciación epidérmica que el control positivo con una relación dosis-efecto. En efecto, las pieles tratadas presentan un mayor número de capas queratinocitarias que expresan la citoqueratina 10 y en particular en la capa denominada granulosa.

35

La **Figura 13** presenta la detección inmunohistoquímica de la transglutaminasa sobre la piel reconstruida (células que expresan intensamente el marcador en rojo, el núcleo en azul, la unión dermoepidérmica con línea de puntos).

**Ejemplo 17: utilización de productos de la invención en formulaciones cosméticas o farmacéuticas de tipo emulsión de aceite en agua**

40

**Formulación 17a:**

|   |                             |         |
|---|-----------------------------|---------|
| A | Agua                        | csp 100 |
|   | Butilenglicol               | 2       |
|   | Glicerina                   | 3       |
|   | Dihidroxicetil sódico       | 2       |
|   | Fosfato,                    |         |
|   | Isopropil Hidroxicetil Éter |         |

|   |   |             |
|---|---|-------------|
| B | Glicol Estearato SE   | 14          |
|   | Triisononaína   | 5           |
|   | Octil Cocoato   | 6           |
| C | Butilenglicol,<br>Metilparabeno,<br>Etilparabeno, Propilparabeno, pH ajustado a 5,5 | 2           |
| D | Productos de la invención   | 0,01 – 10 % |

**Formulación 17b:**

|   |  |               |
|---|--|---------------|
| A | Agua   | csp 100       |
|   | Butilenglicol  | 2             |
|   | Glicerina  | 3             |
|   | Poliacrilamida, Isoparafina,<br>Lauret-7   | 2,8           |
| B | Butilenglicol,<br>Metilparabeno,<br>Etilparabeno, Propilparabeno;<br>Fenoxietanol,<br>Metilparabeno,<br>Propilparabeno, Butilparabeno,<br>Etilparabeno | 2<br>2<br>0,5 |
|   | Butilenglicol  |               |
| D | Productos de la invención  | 0,01 – 10 %   |

**Formulación 17c:**

|   |   |             |
|---|---|-------------|
| A | Carbomer  | 0,50        |
|   | Propilenglicol  | 3           |
|   | Glicerol  | 5           |
|   | Agua  | csp 100     |
| B | Octil Cocoato   | 5           |
|   | Bisabolol   | 0,30        |
|   | Dimeticona  | 0,30        |
| C | Hidróxido de Sodio  | 1,60        |
| D | Fenoxietanol,<br>Metilparabeno,<br>Propilparabeno, Butilparabeno,<br>Metilparabeno,<br>Etilparabeno | 0,50        |
| E | Perfume   | 0,30        |
| F | Productos de la invención   | 0,01 – 10 % |

5

**Ejemplo 18 de la invención: Utilización de productos de la invención en una formulación de tipo agua en aceite**

|   |   |     |
|---|---|-----|
| A | PEG 30 -  | 3   |
|   | Dipolihidroxiestearato  |     |
|   | Triglicéridos Cápricos  | 3   |
|   | Cetearyl Octanoato  | 4   |
|   | Dibutil Adipato   | 3   |
|   | Aceite de Semilla de Uva  | 1,5 |
|   | Aceite de Jojoba  | 1,5 |
|   | Fenoxietanol,<br>Metilparabeno,<br>Propilparabeno, Butilparabeno,<br>Etilparabeno | 0,5 |
| B | Glicerina   | 3   |
|   | Butilenglicol   | 3   |

## ES 2 622 114 T3

|   |                           |           |
|---|---------------------------|-----------|
|   | Sulfato de Magnesio       | 0,5       |
|   | EDTA                      | 0,05      |
|   | Agua                      | csp 100   |
| C | Ciclometicona             | 1         |
|   | Dimeticona                | 1         |
| D | Perfume                   | 0,3       |
| E | Productos de la invención | 0,01-10 % |

**Ejemplo 19 de la invención:** Utilización de productos de la invención en una formulación de tipo champú o gel de ducha

|   |  |          |
|---|--|----------|
| A | Goma Xantana   | 0,8      |
|   | Agua   | csp 100  |
| B | Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno | 0,5      |
|   | Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno | 0,5      |
|   | Etilparabeno   |          |
| C | Ácido Cítrico  | 0,8      |
| D | Lauret Sulfato Sódico                                      | 40,0     |
| E | Producto de la invención                                   | 0,0-10 % |

5

**Ejemplo 20 de la invención:** Utilización de productos de la invención en una formulación de tipo pintalabios y otros productos anhidros

|   |  |          |
|---|--|----------|
| A | Cera mineral                                 | 17,0     |
|   | Isostearil Isostearato                       | 31,5     |
|   | Propilenglicol Dipelargonato                 | 2,6      |
|   | Propilenglicol Isostearato                   | 1,7      |
|   | PEG 8 Cera de Abeja                          | 3,0      |
|   | Aceite de Semilla de Palma Hidrogenado       | 3,4      |
|   | Glicéridos, Glicéridos de Palma Hidrogenados |          |
|   | Aceite de Lanolina                           | 3,4      |
|   | Aceite de Sésamo                             | 1,7      |
|   | Cetil Lactato                                | 1,7      |
|   | Aceite Mineral, Alcohol de Lanolina          | 3,0      |
| B | Aceite de Ricino                             | csp 100  |
|   | Dióxido de Titanio                           | 3,9      |
|   | CI 15850:1                                   | 0,616    |
|   | CI 45410:1                                   | 0,256    |
|   | CI 19140:1                                   | 0,048    |
|   | CI 77491                                     | 2,048    |
| C | Productos de la invención                    | 0,01-5 % |

10

**Ejemplo 21 de la invención:** Utilización de productos de la invención en una formulación de geles acuosos (contornos de ojo, adelgazantes, etc...)

|   |  |         |
|---|--|---------|
| A | Agua   | csp 100 |
|   | Carbomer   | 0,5     |
|   | Butilenglicol  | 15      |
|   | Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno | 0,5     |

B |Productos de la invención 0,0 - 10 %

**Ejemplo 22 de la invención:** Utilización de productos de la invención en una formulación de tipo emulsión triple

|   |  |                         |
|---|--|-------------------------|
|   | Emulsion primaria  | W1/O                    |
| A | PEG 30 -<br>dipolihidroxiestearato<br>Triglicéridos Cápricos<br>Isohexadecano<br>PPG-15 Estearil Éster         | 4<br>7,5<br>15<br>7,5   |
| B | Agua   | 65,3                    |
| C | Fenoxietanol,<br>Metilparabeno<br>Propilparabeno, Butilparabeno,<br>Etilparabeno                               | 0,7                     |
|   | Emulsión secundaria W1/O/W2  |                         |
| A | Emulsión primaria  | 60                      |
| B | Poloxamer 407<br>Fenoxietanol,<br>Metilparabeno,<br>Propilparabeno,<br>2-bromo- 2 nitropropan-1,3 diol<br>agua | 2<br>0,3<br><br>csp 100 |
| C | Carbomer   | 15                      |
| D | Trietanolamina   | PH 6,0-6,5              |

5 **Ejemplo comparativo 23:** Preparación de formulaciones farmacéuticas que contienen el producto de la invención

**Formulación comparativa 23a: preparación de comprimidos**

|   |                            |                     |
|---|----------------------------|---------------------|
| A | Excipientes                | En g por comprimido |
|   | Lactosa                    | 0,359               |
|   | Sacarosa                   | 0,240               |
| B | Productos de la invención* | 0,001 -0,1          |

\*El producto de la invención se obtiene, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 13 seguido de una etapa de secado.

**Formulación comparativa 23b: preparación de una pomada**

|   |                              |            |
|---|------------------------------|------------|
| A | Excipientes                  |            |
|   | Polietileno de baja densidad | 5,5        |
|   | Parafina líquida             | cps 100    |
| B | Productos de la invención*   | 0,001 -0,1 |

\*El producto de la invención se obtiene, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 13 seguido de una etapa de secado.

10

**Formulación comparativa 23c: preparación de una fórmula inyectable**

|   |                            |            |
|---|----------------------------|------------|
| A | Excipientes                |            |
|   | Solución Isotónica salada  | 5,5 ml     |
| B | Productos de la invención* | 0,001 -0,1 |

\*El producto de la invención se obtiene, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 13 seguido de una etapa de secado.

**Ejemplo 24: Evaluación de la aceptación cosmética de una preparación que contiene el sujeto de la invención**

- 5 Los ensayos de toxicología se realizaron sobre el compuesto obtenido según el ejemplo 2 incorporado a 10 % en un gel de xantana a 0,5 %, para una evaluación ocular en el conejo, estudiando la ausencia de toxicidad anómala por administración oral única en la rata y estudiando el poder sensibilizante en la cobaya.

**Evaluación de la irritación primaria cutánea en el conejo:**

- 10 Las preparaciones descritas anteriormente se aplicaron sin dilución a la dosis de 0,5 ml en la piel de 3 conejos según el método recomendado por la Directiva OECD concerniente al estudio del "efecto irritante/corrosivo agudo sobre la piel".

- 15 Los productos se clasificaron de acuerdo con los criterios definidos por el decreto del 1/02/1982 publicado en JORF del 21/02/82.

Los resultados de estos ensayos, permiten llegar a la conclusión de que los productos de la invención estaban clasificados como **no irritantes** para la piel.

- 20 **Evaluación de irritación ocular en el conejo:**

Las preparaciones descritas anteriormente se instilaron puras una sola vez, a razón de 0,1 ml, en el ojo de 3 conejos de acuerdo con el método recomendado por la directiva de la OCDE N.º 405 del 24 de febrero 1.987 concerniente al estudio del "efecto irritante/corrosivo agudo sobre ojos."

- 25 Los resultados de este ensayo permiten llegar a la conclusión de que las preparaciones pueden considerarse como **no irritantes** en los ojos, según la directiva 91/326 CEE utilizadas puras o sin dilución.

**Ensayo sobre la ausencia de toxicidad anómala por administración oral única en la rata:**

- 30 Las preparaciones descritas se administraron en una vez por vía oral a la dosis de 5 g/kg de peso corporal, a 5 ratas macho y 5 ratas hembra de acuerdo con un protocolo inspirado de la directiva de la OCDE N.º 401 del 24 febrero de febrero de 1987 y adaptado a productos cosméticos.

- 35 Las (Dosis Letales) DL0 y DL50 eran superiores a 5.000 mg/kg. Por tanto, las preparaciones ensayadas no se clasificaron como peligrosas por ingestión.

**Evaluación del potencial de sensibilización cutánea en la cobaya:**

- 40 Las preparaciones descritas se sometieron al ensayo de maximización descrito por Magnusson y Kligmann, protocolo de acuerdo con la línea directriz n.º 406 de la OCDE.

Las preparaciones se clasificaron como no sensibilizantes por contacto con la piel.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de una sustancia que estimula la expresión de la proteína LOX que tiene la secuencia ID NO: 1 para el tratamiento o la prevención del envejecimiento de la piel, siendo dicha sustancia un extracto de madera entera de Cuasia de Surinam (*Cassia amara*), preparándose dicha sustancia en forma de composición cosmética.
2. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la composición cosmética comprende 0,01 % y 10 % (v/v) de dicha sustancia.
- 10 3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la composición cosmética comprende 0,1 % y 1 % (v/v) de dicha sustancia.
- 15 4. Utilización, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** una planta se reduce a polvo y el polvo se dispersa a razón de 2 a 5 % (peso/peso) de polvo en un disolvente polar, ventajosamente en una mezcla de agua/(alcohol, glicol o poliol), y preferentemente en una mezcla de agua/butilenglicol de 75/25 o 50/50, para preparar dicha sustancia.
- 20 5. Utilización, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** dicho extracto de Cuasia de Surinam (*Cassia amara*) se obtiene macerando la planta a un 2-5 % (p/p) en un disolvente o en una mezcla de disolventes, filtrándose o destilándose después el extracto obtenido para recuperar la fracción soluble que después se filtra preferentemente a 0,45  $\mu\text{m}$ , pudiendo dicho extracto activar significativamente la tasa de síntesis de ARNm del gen que codifica LOX por queratinocitos en cultivo en ausencia de diferenciación cálcica.
- 25 6. Utilización, de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** la composición comprende al menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste en conservantes, emolientes, emulsionantes, tensioactivos, hidratantes, espesantes, acondicionadores, agentes matificantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes texturizantes, agentes abrillantadores, agentes filmógenos, solubilizantes, pigmentos, colorantes, perfumes y filtros solares.



Figura 3: Manifestación de la presencia de LOX y de NRAGE en la piel reconstruida (objetivo de 25).

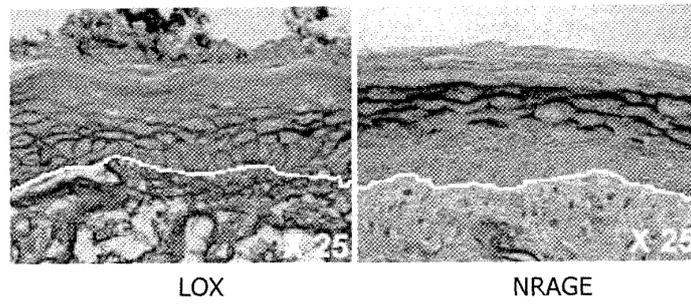


Figura 4: Colocalización con microscopía confocal de LOX y NRAGE en cortes de piel humana.

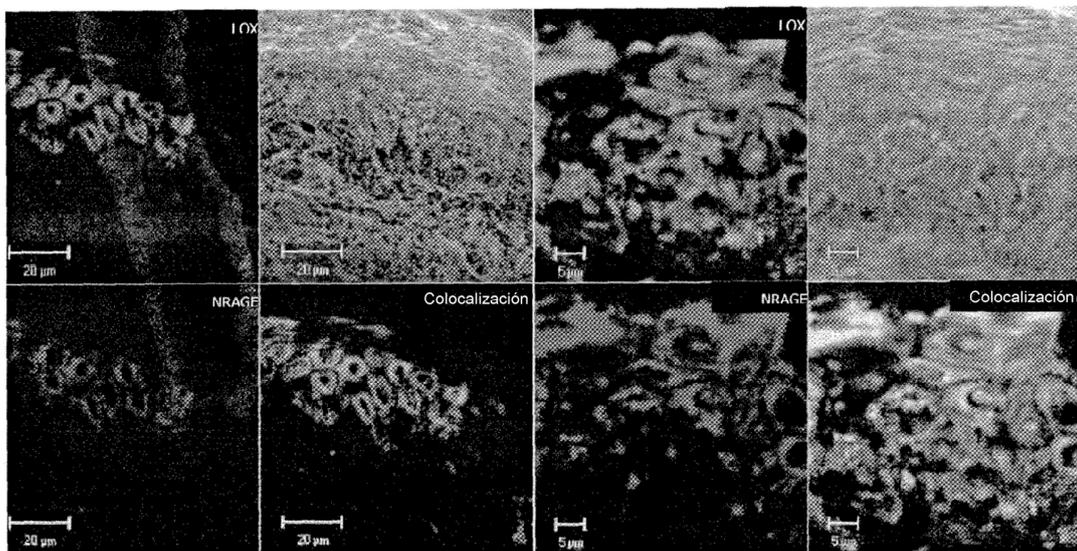


Figura 5: Inmunodetección de LOX y NRAGE en cortes de piel humana (donante de 91 años).

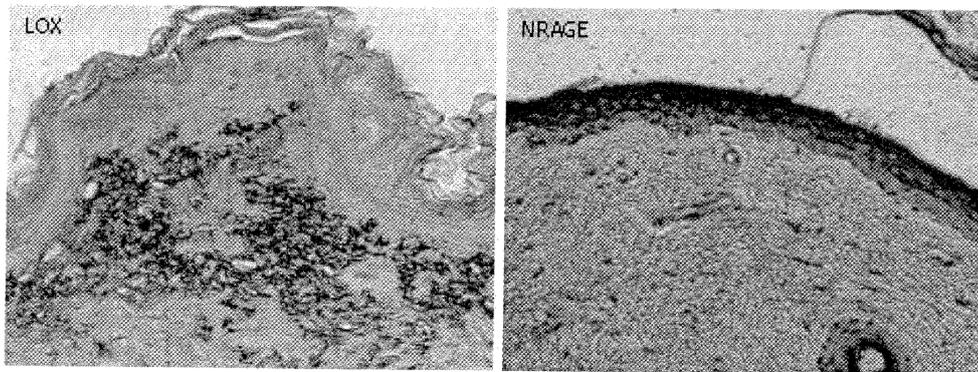


Figura 6: Detección de LOX y de NRAGE en la piel de una persona con enfermedad de respuesta de injerto contra huésped (o GVH: *graft versus host*).

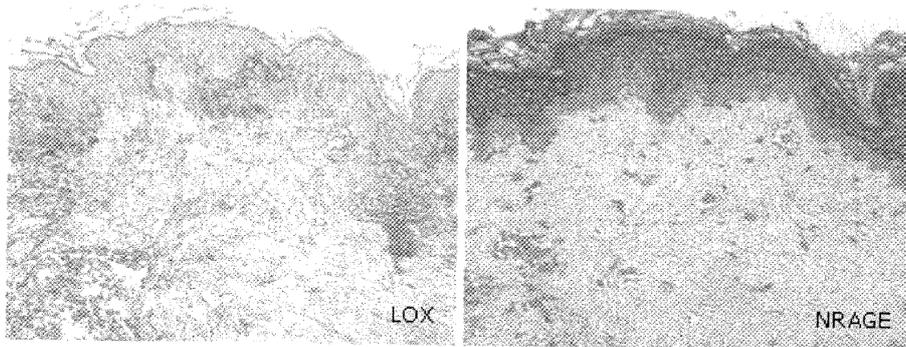


Figura 7: Detección de LOX y de NRAGE en la piel de una persona que presenta un cáncer de tipo basocelular y espinocelular

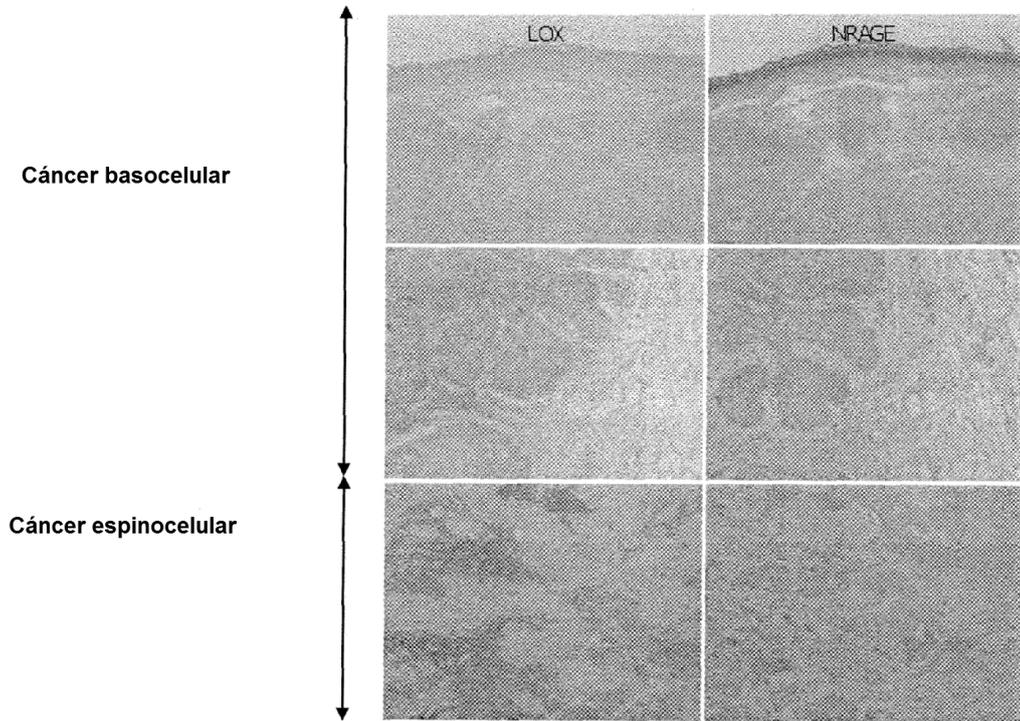
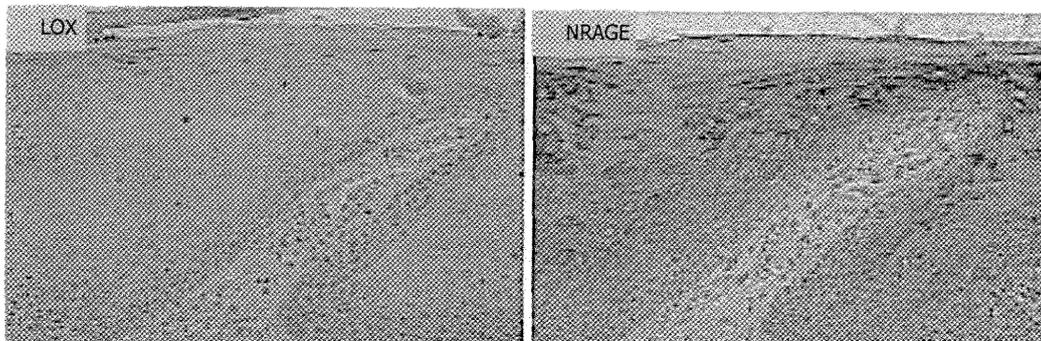
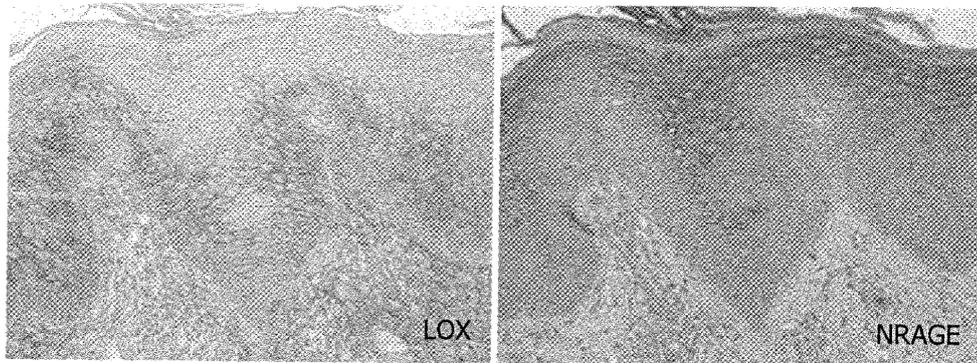


Figura 8: Detección de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con liquen plano.



**Figura 9: Manifestación de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con soriasis.**



**Figura 10: Manifestación de la localización de LOX y de NRAGE en la piel de un paciente con eccema.**

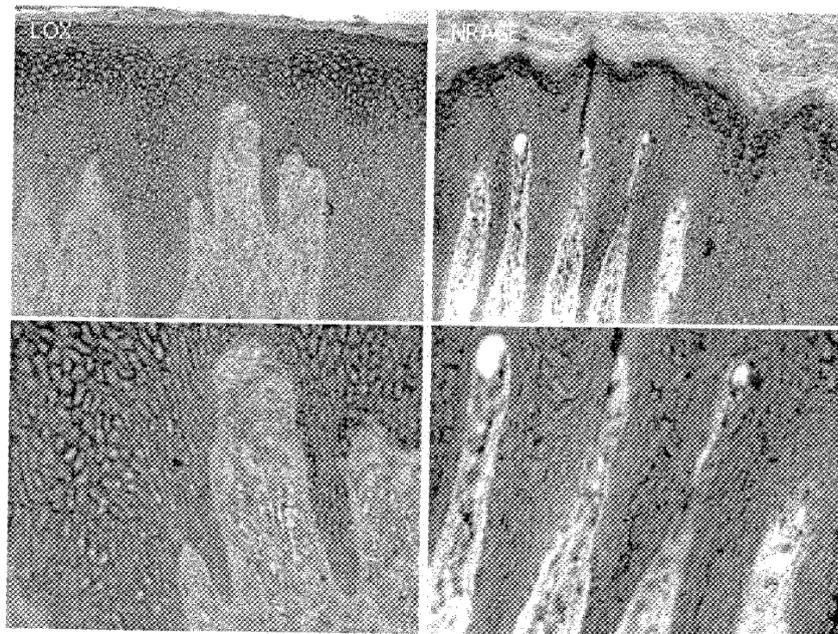


Figura 11

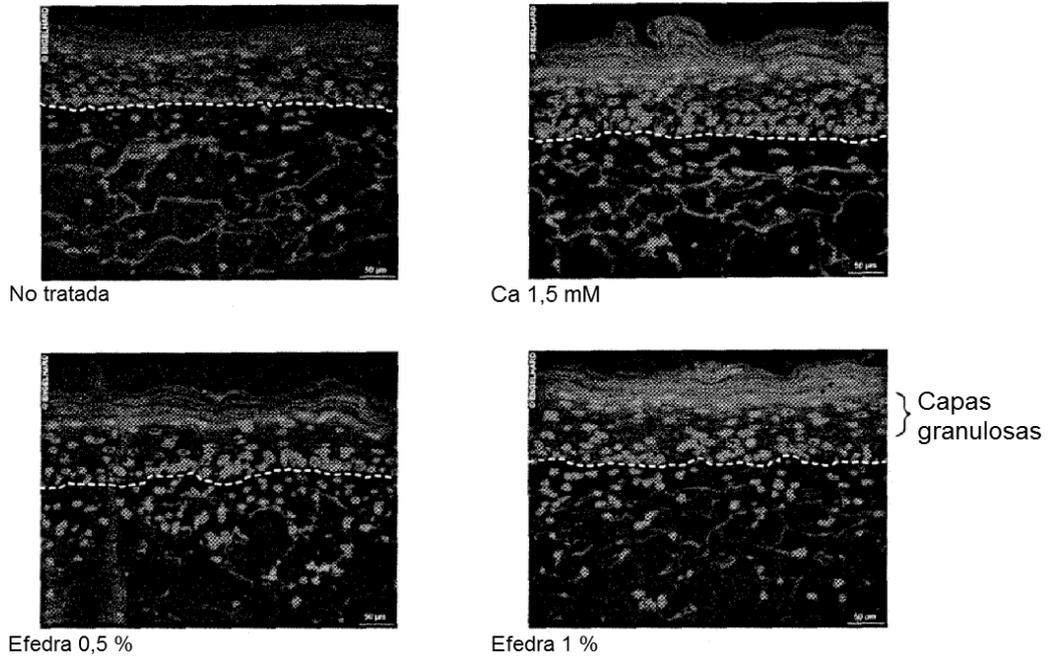


Figura 12

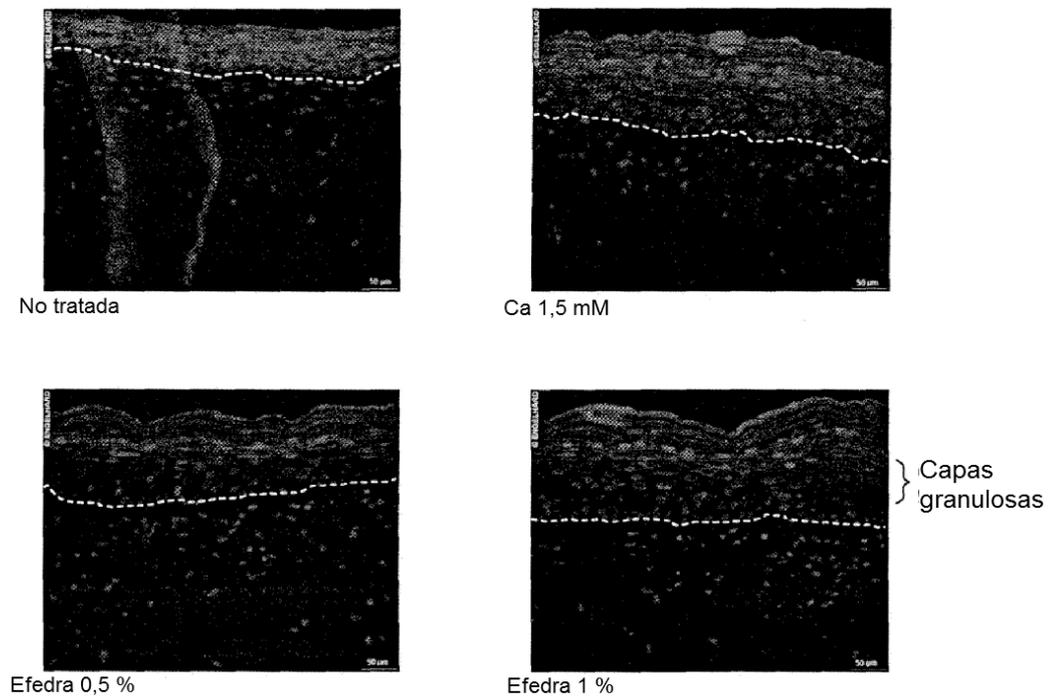


Figura 13

