(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 645 011**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2011 PCT/US2011/062279**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12091832**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011 E 11853773 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2659004**

(54) Título: **Modulación de dineína en la piel**

(30) Prioridad:

30.12.2010 US 201061428272 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2017

(73) Titular/es:

AVON PRODUCTS, INC. (100.0%)
777 Third Avenue
New York, NY 10017, US

(72) Inventor/es:

ZHENG, QIAN;
LYGA, JOHN W. y
WYBORSKI, RUSSELL J.

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Modulación de dineína en la piel

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas. En particular, la invención se refiere a compuestos que modulan los niveles de dineína en la piel.

ANTECEDENTES

Las dineínas son una familia de proteínas que se mueven a lo largo de los microtúbulos en la dirección del extremo negativo. Las dineínas convierten la energía química de la hidrólisis de ATP en energía mecánica necesaria para el movimiento gradual a lo largo de los microtúbulos. La dineína axonémica encontrada solamente en las células que tienen cilios y flagelos, provoca el deslizamiento de los microtúbulos en los axonemos de esas estructuras. La dineína citoplásmica por otra parte, se cree que está presente en todas las células animales. Se identificó y caracterizó mucho más recientemente que la dineína axonémica. Ver Paschal B.M., Shpetner H.S., Vallee R.B., "MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties," J. Cell Biol, sep de 1987; 105(3): 1273-82; y Shpetner H.S., Paschal B.M., y Vallee R.B., "Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1 C)", J. Cell Biol., sep de 1988; 107(3): 1001-9. Los documentos WO2004026249 A1, US2005/136028 A1 y WO2009134404 A2 describen compuestos y métodos para mejorar la apariencia de la piel. Byers y colaboradores, J. Invest. Dermatology, vol. 121, p. 813-820, describen la influencia de la dineína en la protección UV y el transporte mediante el melanosoma.

Las dineínas citoplásmicas son motores moleculares citoesqueléticos que son responsables de mitosis, polarización de células, transporte intracelular de vesículas, endosomas y lisosomas, y otro movimiento dentro de la célula. La dineína citoplásmica tiene una masa molecular de aproximadamente 1.5 Megadaltons (MDa) y tiene doce o más subunidades de polipéptido que comprenden dos cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 530 kDa por cadena, dos cadenas intermedias de aproximadamente 74 kDa, cuatro cadenas intermedias entre aproximadamente 53 y 59 kDa, y varias cadenas ligeras de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 kDa. Las cadenas pesadas contienen cada una cuatro sitios de enlace ATP, que incluyen el sitio hidrolítico de ATP así como un sitio de enlace a microtúbulos. Se cree que las cadenas intermedias enlazan la dineína a su cargo.

Debido a que las proteínas de dineína generan el movimiento de una amplia variedad de materiales en las células, son esenciales para muchas funciones celulares y de desarrollo, que incluyen movimiento de organelos, localización de los determinantes de desarrollo, y señalización potencialmente de largo alcance en las neuronas. La dineína también se muestra que regula la reorientación del centrosoma, remodelación de citoesqueleto, formación del borde delantero y migración celular durante la sanación de heridas del cultivo celular monocapa. También media la agregación perinuclear de los melanosomas fagocitosados en los queratinocitos humanos, lo cual conduce a la formación de melanina supranuclear.

Las deficiencias en el funcionamiento de la dineína se han implicado en degeneraciones neuronales en enfermedades de las neuronas motoras provocadas por el transporte axonal deteriorado en estas neuronas. La interrupción de los genes que codifican las cadenas de dineína citoplásmica se han relacionado con la enfermedad respiratoria, discinesia ciliar primaria (Síndrome de Kartagener), y se pueden implicar en enfermedades de las neuronas motoras tal como esclerosis lateral amiotrófica. En la actualidad, la función de la dineína en el mantenimiento de piel sana y desaceleración del envejecimiento de la piel no se ha reconocido.

Es un objetivo de la divulgación proporcionar composiciones y métodos para tratar, mejorar, inhibir y/o prevenir signos dermatológicos de envejecimiento. El objetivo de la invención es proporcionar métodos para tratar, mejorar, inhibir y/o prevenir signos dermatológicos de envejecimiento al modular los niveles de dineína en las células de la piel. Otro objetivo de la invención es proporcionar métodos para identificar compuestos que sean útiles para tratar, mejorar, inhibir y/o prevenir signos dermatológicos de envejecimiento, con base en la capacidad de modular los niveles de la dineína en las células de la piel.

El planteamiento anterior se presenta solamente para proporcionar un mejor entendimiento de la naturaleza de los problemas que confrontan la técnica y no se deben considerar de ninguna manera como una admisión en cuanto a la técnica anterior.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con los objetivos anteriores y otros, la presente invención proporciona moduladores de dineína, preferiblemente dineína citoplásmica, para mejorar uno o más signos de envejecimiento dermatológico. Los moduladores pueden ya sea regular por incremento o regular por decremento los niveles de dineína en la piel, dependiendo del efecto deseado. Se cree que los reguladores por incremento de la dineína producida dentro de los fibroblastos dérmicos y queratinocitos conducirán a la producción incrementada de proteínas dentro de las células,

que incluyen las proteínas específicas de fibroblastos colágeno, elastina, y fibrilina, y la proteína de queratinocitos queratina. Dada la importancia de las proteínas producidas por fibroblastos a la resistencia y salud de la piel total, la regulación por incremento de las dineínas tendrá un efecto benéfico en la reducción de la apariencia de envejecimiento en la piel.

Las invenciones también abarcan moduladores que regulan por decremento los niveles de las dineínas en la piel. Debido a que la dineína también media la agregación perinuclear de los melanosomas fagocitosados en los queratinocitos humanos, lo cual conduce a la formación de melanina supranuclear, los reguladores por decremento de la dineína, particularmente en los queratinocitos y/o melanocitos, serán útiles para tratar manchas de la edad y otras formas de hiperpigmentación en la piel. También se contempla que los reguladores por decremento de la dineína serán efectivos en el tratamiento de desórdenes proliferativos en la piel, incluyendo psoriasis.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para clasificar sustancias candidato para identificar activos útiles para mejorar la apariencia estética de la piel. El método comprende someter a ensayo sustancias candidato para la capacidad de modular la expresión de dineína en un fibroblasto o queratinocito dérmico. El método implica típicamente incubar fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos con una sustancia candidato y medir subsecuentemente los niveles de mRNA que codifica la subunidad de cadena pesada de dineína citoplásmica DYNC1H1 por una técnica cuantitativa tal como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Por lo tanto se proporcionan métodos para mejorar la apariencia estética de la piel humana que comprenden aplicar tópicamente a un área de la piel en necesidad de los mismos una cantidad efectiva de una sustancia que module los niveles de dineína en los fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos. Los moduladores de dineína son referidos en la presente como “activos” y pueden ser ya sea reguladores por incremento o reguladores de decremento, y típicamente se formularán en un vehículo cosméticamente aceptable y se aplicarán tópicamente a un integumento humano, tal como la piel de la cara, cuello, manos, tórax, piernas, etc., durante un tiempo suficiente para mejorar la salud o apariencia estética de la misma.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar la apariencia estética de la piel humana que comprende aplicar tópicamente a un área de la piel en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un agente activo que module (por ejemplo, regule por incremento o regule por decremento) los niveles celulares de la dineína citoplásmica, en donde la capacidad del agente activo para modular la dineína citoplásmica se ha determinado por un ensayo que mide el nivel de expresión de la dineína citoplásmica en una célula que se ha puesto en contacto con el agente activo. La célula usada en el ensayo puede ser cualquier célula que exprese dineína, pero es preferiblemente de mamífero, y es más preferiblemente una célula humana o de ratón. La célula puede ser una célula de la piel, tal como un fibroblasto o queratinocito. El ensayo puede medir los niveles de cualquier fragmento o marcador de dineína, que incluye el complejo intacto, pero típicamente lo que se mide son los niveles de expresión de la subunidad de cadena pesada de la dineína citoplásmica DYNC1H1, que se expresa por el gen humano *DYNC1H1* o el gen de ratón *Dync1h1*. Los niveles de expresión del gen humano *DYNC1H1* o el gen de ratón *Dync1h1* se pueden determinar, por ejemplo, al medir los niveles de expresión del mRNA correspondiente mediante cualquier técnica adecuada, tal como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Se proporciona un método para tratar arrugas y/o líneas finas, que comprende aplicar tópicamente a un área de la piel en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un agente activo que regula por incremento la dineína, en donde la capacidad del agente activo para modular la dineína citoplásmica se ha determinado por un ensayo que mide el nivel de expresión de la dineína citoplásmica en una célula que se ha puesto en contacto con el agente activo. La etapa de ensayo comprende más típicamente incubar fibroblastos dérmicos humanos con una sustancia candidato y medir subsecuentemente los niveles de mRNA que codifican las subunidades de cadena pesada de dineína citoplásmica DYNC1H1, en donde la sustancia candidato se seleccionó para el uso como un agente activo, en parte, sobre la base de su capacidad de regular por incremento la expresión de dineína.

También se proporciona un método para tratar hiperpigmentación, que comprende aplicar tópicamente a un área de la piel en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un agente activo que regula por decremento la dineína, en donde la capacidad del agente activo para modular la dineína citoplásmica se ha determinado por un ensayo que mide el nivel de expresión de la dineína citoplásmica en una célula que se ha puesto en contacto con el agente activo. La etapa de ensayo en esta implementación, comprende usualmente incubar queratinocitos dérmicos humanos con una sustancia candidato y medir subsecuentemente los niveles de mRNA que codifica la subunidad de cadena pesada de dineína citoplásmica DYNC1H1, en donde la sustancia candidato se seleccionó para el uso como un agente activo, en parte, sobre la base de su capacidad de regular por decremento la expresión de la dineína.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Todos los términos usados en la presente se proponen para tener su significado ordinario a menos que se especifique de otra manera. Por “cosméticamente aceptable” se entiende que un componente particular sea considerado generalmente como seguro y no tóxico en los niveles empleados. El término “prevenir”, como se usa en la presente, incluye retrasar el inicio o progresión de un signo particular del envejecimiento de la piel. El término “piel delgada” incluye piel que se vuelve más delgada con el envejecimiento cronológico así como piel prematuramente

adelgazada, que puede ser provocado, por ejemplo, por fotoenvejecimiento. La frase “individuo en necesidad del mismo” se refiere a un humano que podría beneficiarse de la apariencia dérmica o salud mejorada, que incluye hombres o mujeres. El término “piel” incluye, sin limitación, los labios, piel de la cara, manos, brazos, cuello y tórax. Como se usa en la presente, el término “que consiste esencialmente en” se propone para limitar la invención a los materiales o etapas especificados de aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reclamada, como se entiende a partir de la lectura de esta especificación.

Como se usa en la presente, el término dineína se refiere a dineína citoplásmica así como dineína axonémica, aunque los moduladores preferidos de acuerdo con la invención modularán los niveles de dineína citoplásmica. La dineína citoplásmica incluye complejo 1 de dineína citoplásmica, así como complejo de dineína citoplásmica 2, aunque los moduladores preferidos de acuerdo con la invención modularán los niveles del complejo de dineína citoplásmica 1. La dineína puede ser de cualquier animal, pero es típicamente dineína humana o de ratón, y preferiblemente dineína humana. La nomenclatura usada en la presente para describir la dineína citoplásmica es aquella de Pfister y colaboradores, “Cytoplasmic dynein nomenclature”, J. Cell Biol., 2005 7 de noviembre; 171(3): 411-13, que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Símbolo del Gen		Símbolo de la Proteína
humano	ratón	humano y de ratón
(complejo de dineína citoplásmica 1)		
DYNC1H1	*Dynclhl*	DYNC1H1
DYNC1I1	*Dynclil*	DYNC1I1
DYNC1I2	*Dyncli2*	DYNC1I2
DYNC1LI1	*Dynclli1*	DYNC1L11
DYNCJLJ2	*Dynclli2*	DYNC1LI2
DYNLT1	*Dynltl*	DYNLT1
DYNLT3	*Dynlt3*	DYNLT3
DYNLRB1	*Dynlrbl*	DYNLRB1
DYNLRB2	*Dynlrb2*	DYNLRB2
DYNLL1	*Dynlll*	DYNLL1
DYNLL2	*Dynll2*	DYNLL2
(complejo de dineína citoplásmica 2)		
DYNC2H1	*Dync2hl*	DYNC2H1
DYNC2LI1	*Dync2li1*	DYNC2LI1

El término “modulador” abarca cualquier sustancia, que incluye, sin limitación, moléculas orgánicas; biomoléculas (por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, oligómeros de ácido nucleico, etc.); y combinaciones de sustancias, tales como extractos botánicos. Los moduladores modulan los niveles celulares de las dineínas, lo que significa que los niveles celulares de la proteína dineína ya sea se incrementen o disminuyan por el agente activo. El término “modulación” puede referirse a la regulación por incremento, inducción, estimulación, potenciación, y/o alivio de la inhibición, así como también a inhibición, atenuación y/o regulación por decremento o supresión. Los moduladores pueden ser, sin limitación, inhibidores o antagonistas, que son, por ejemplo, compuestos que se enlazan a, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan por decremento los niveles de expresión de los genes o proteínas dineína o péptidos. Los moduladores también pueden ser, sin limitación, activadores o agonistas, los cuales son compuestos que, por ejemplo, se unen, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan por incremento los niveles de expresión de los genes o los péptidos o las proteínas de la dineína. Los mecanismos por los cuales el nivel de proteína se modula no son importantes.

Como se usa en la presente, el término “niveles de expresión” se refiere a una cantidad de un gen y/o proteína que

se expresa en una célula. Como se usa en la presente, un “gen” incluye un polinucleótido que contiene por lo menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido particular. Como se usa en la presente, el término “polinucleótido” es sinónimo con “oligonucleótido” e incluye formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos, que incluyen, sin limitación, mRNA, DNA, cDNA, cebadores, sondas y similares.

El descubrimiento de la correlación entre los niveles de expresión de la dineína y el envejecimiento dermatológico ha conducido a un método de clasificación para identificar los moduladores potenciales de dineína. En una realización, se proporciona un ensayo para determinar los niveles de expresión de la dineína después de que una célula se ha tratado, incubado, o de otra manera puesto en contacto con una sustancia candidato. El término “sustancia candidato” se refiere a cualquier sustancia que se somete a prueba para la actividad como un modulador de dineína, si se sospecha o no que la sustancia posee tal actividad. La célula puede ser cualquier célula que exprese dineína, preferiblemente dineína citoplásmica. En una realización, la célula es un fibroblasto de mamífero. En otra realización, la célula es un queratinocito de mamífero. Preferiblemente, la célula es una célula humana o de ratón. Después de que la célula se ha incubado con una sustancia candidato por una duración de tiempo suficiente para proporcionar un cambio medible en los niveles de expresión, que típicamente serán por lo menos una hora, y más típicamente de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 72 horas, luego se lisan para liberar los componentes celulares, tales como dineína y mRNA que codifica la dineína. La cantidad de proteína de dineína o cualquier subunidad de la misma entonces se puede medir por cualquier técnica adecuada para la detección y cuantificación de los péptidos y proteínas y/o polinucleótidos (por ejemplo, mRNA).

Los métodos preferidos para medir los niveles de expresión de la dineína implican la cuantificación de la expresión de mRNA. Los métodos adecuados para determinar la expresión de mRNA incluyen PCR cuantitativa (QPCR), QPCR de tiempo real, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), y PCR de transcripción inversa cuantitativa (QRT-PCR), como son bien conocidos en la técnica. Como se describe con detalle en las patentes estadounidenses Nos. 7,101,663 y 7,662,561, una reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa cuantitativa (QRT-PCR) para detectar el mRNA puede incluir las etapas de: (a) incubar una muestra de RNA del lisado celular con una transcriptasa inversa y una alta concentración de un cebador de transcriptasa inversa específico de secuencia objetivo bajo condiciones adecuadas para generar el cDNA; (b) añadir subsecuentemente los reactivos de reacción en cadena de la polimerasa adecuados (PCR) a la reacción de la transcriptasa inversa, que incluye una alta concentración de un conjunto de cebadores de PCR específicos al cDNA y una DNA polimerasa termoestable a la reacción de transcriptasa inversa; y (c) ciclar la reacción de PCR para un número deseado de ciclos y bajo condiciones adecuadas para generar los productos de PCR (“amplicones”) específicos al cDNA. Los productos del proceso QRT-PCR se pueden comparar después de un número fijo de ciclos de PCR para determinar la cantidad relativa de las especies de RNA como es comparado con un gen reportero dado, por ejemplo, mediante la tinción Southern. Más típicamente, el progreso de la reacción de PCR se supervisa al analizar las velocidades relativas de la producción de amplicones para cada conjunto de cebadores de PCR, por ejemplo, por (1) tintes fluorescente no específicos que se intercalan con cualquier DNA de doble hebra, y/o (2) sondas de DNA específicas de secuencia que consisten en oligonucleótidos que se etiquetan con un reportero fluorescente que permite la detección solo después de la hibridación de la sonda con su DNA objetivo complementario.

El mRNA puede ser cualquier mRNA que se asocia con la dineína, que incluye los mRNAs que codifican las subunidades identificadas en la Tabla 1. En una realización, el mRNA codifica la subunidad de cadena pesada DYNC1H1, que es sinónimamente conocida en la literatura como “cadena pesada de la dineína citoplásmica 1” o “cadena pesada de la dineína citoplásmica convencional” entre otras. En una realización preferida, el mRNA codifica la DYNC1H1 humana.

El nivel de la expresión de mRNA se puede comparar con controles que no se tratan con la sustancia candidato para determinar el grado relativo de modulación. En algunas realizaciones, la sustancia candidato regulará por incremento la expresión de mRNA en al menos aproximadamente 10%, de manera más adecuada al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%. Preferiblemente, la sustancia candidato regulará por incremento la expresión de mRNA en al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 100%. En otras realizaciones, la sustancia candidato regulará por decremento la expresión de mRNA en al menos aproximadamente 10%, de manera más adecuada al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%), o al menos aproximadamente 50%. Las sustancias candidato que cumplen estos criterios se pueden seleccionar para el uso de la evaluación adicional.

Los moduladores de dineína identificados por el protocolo de clasificación anterior se pueden usar como agentes activos en la preparación cosmética y se pueden formular con otros componentes cosméticamente aceptables, tal como un vehículo, en una composición para la aplicación tópica a la piel. Las composiciones se aplican tópicamente a la piel en cantidades efectivas, por lo cual se propone una cantidad suficiente para lograr una mejora medible en la salud de la piel o reducción en uno o más signos dermatológicos de envejecimiento. Tales signos de envejecimiento de la piel incluyen sin limitación, lo siguiente:

(a) tratamiento, reducción, y/o prevención de líneas finas o arrugas,

(b) reducción del tamaño del poro de la piel,
(c) mejora en el grosor, gordura, y/o tirantez de la piel;
(d) mejora en la flexibilidad y/o suavidad de la piel;
(e) mejora en el tono, luminosidad, y/o claridad de la piel;
(f) mejora en la producción de procolágeno y/o colágeno;
(g) mejora en el mantenimiento y remodelación de elastina;
(h) mejora en la textura y/o promoción de retexturización de la piel;
(i) mejora en la reparación y/o función de la barrera de la piel;
(j) mejora en la apariencia de los contornos de la piel;
(k) restauración de lustre y/o brillo de la piel;
(l) reabastecimiento de nutrientes y/o constituyentes esenciales en la piel;
(m) disminuido por envejecimiento y/o menopausia;
(n) mejora en la hidratación de la piel;
(o) incremento en la elasticidad y/o resiliencia de la piel;
(p) tratamiento, reducción, y/o prevención de flacidez de la piel y/o
(q) reducción de manchas de pigmento.

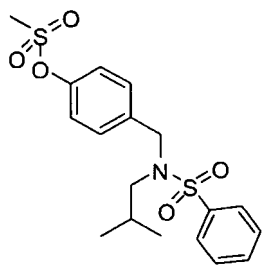
En la práctica, las composiciones de la invención, que incluyen agentes que modulan los niveles de expresión de la dineína, solos, o en vehículos cosméticamente aceptables, se aplican a la piel en necesidad de tratamiento. Es decir, la piel que padece de una deficiencia o pérdida en cualquiera de los atributos anteriores o que de otra manera se beneficiaría de la mejora de cualquiera de los atributos de la piel anteriores. La piel se trata generalmente una vez o dos veces al día. El tratamiento puede continuar durante una semana, dos semanas, cuatro semanas, ocho semanas, seis meses o más prolongado.

En una realización los agentes activos se aplican tópicamente, en un vehículo cosméticamente aceptable, a la piel que padece de líneas finas y/o arrugas para prevenir, tratar, y/o mejorar la apariencia de las líneas finas y/o arrugas en la piel. En este caso, las composiciones se aplican a la piel en necesidad de tratamiento, lo que se refiere a la piel que ya tiene arrugas y/o líneas finas o la piel que está en riesgo de desarrollar líneas finas y/o arrugas. Preferiblemente, las composiciones se aplican directamente a las líneas finas y/o arrugas de la piel de la cara, cuello, tórax y/o manos. Los agentes preferidos de acuerdo con esta realización son reguladores por incremento de la expresión de la dineína. En una realización, preferida, los reguladores por incremento de la expresión de la dineína conducen a una producción aumentada de colágeno, estatina y/o fibrilina en los fibroblastos dérmicos.

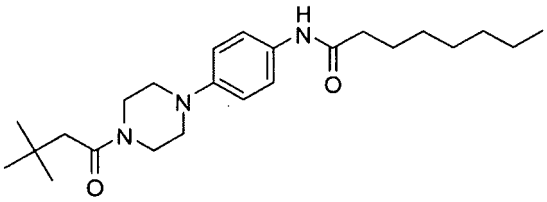
En una realización, la invención se dirige a un método para mejorar la apariencia estética de la piel al incrementar la producción de colágeno, elastina y/o fibrilina en la piel, donde el método comprende aplicar tópicamente a un área de la piel en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un agente que regula por incremento la expresión de la dineína, en donde dicho compuesto se ha identificado para el uso por un ensayo que determina la capacidad de una sustancia para modular los niveles de expresión de la dineína, que incluyen el ensayo descrito en la presente. Preferiblemente, el ensayo mide los niveles de expresión de mRNA de la dineína en los fibroblastos dérmicos.

En una realización, el modulador de dineína comprende un material de planta natural tal como un extracto botánico. Entre los materiales de plantas naturales y extractos botánicos que regulan por incremento la dineína se puede hacer mención de extractos de las siguientes especies: *Orthosiphon grandiflorus*, *Clinacanthus nutans*, *Cistanche tubulosa*, *Erythrina indica*, *Operculina turpethum*, *Gynandropsis gynandra*, *Erthrina Flabelliformis*, *Helichrysum Odoratissimum*, *Desmanthus illinoensis*, *Ozothamnus Obcordatus*, *Tagetes erecta Linn*, *Caesalpinia sappan Linn*, *Medemia nobilis*, *Calatropis gigantean*, *Loropetalum chinense*, *Heliotropium indicum*, *Dianella ensifolia*, *Breynia fruticosa*, *Dendranthema indicum*, *Sambucus chinensis*, *Scoparis dulcis*, *Acacia melanoxylon*, *Clerodendrum floribundum*, *Commersonia bartramia*, *Dodonaea viscose*, *Duboisa myoporoides*, *Ehretia acuminate*, *Ficus coronata*, *Goodenia ovata*, *Hymenosporum flavum*, *Lavatera plebeian*, *Melaleuca quinquernervia*, *Omolanthes populifolius*, y combinaciones de los mismos.

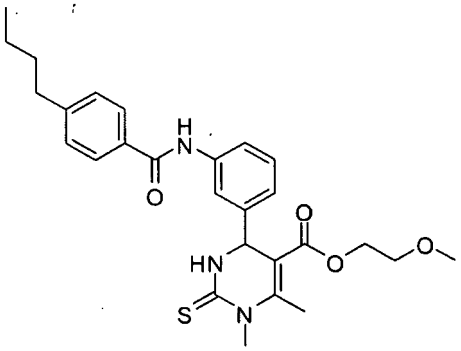
Otras sustancias que regulan por incremento la dineína incluyen lo siguiente:



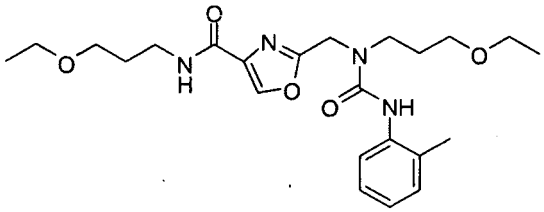
Compuesto 1



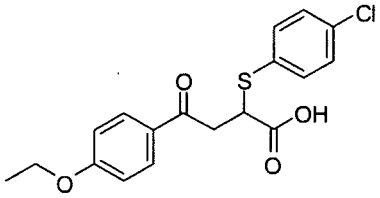
Compuesto 2



Compuesto 3



Compuesto 4



Compuesto 5

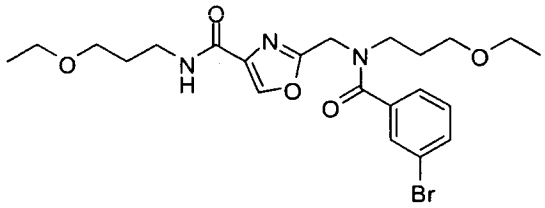
También adecuada para regular por incremento la dineína es la calmicrina, que es el 10-metil-*trans*-monociclofarnesol enlazado a d-manitol como un éter alílico aislado de *Chalara microspora*; particularmente, 1-O-[(E)-3-Metil-5-(2,5,6,6-tetrametil-1-ciclohexen-1-il)-2-pentenil]-D-manitol.

En una realización, la invención se dirige a un método para reducir la apariencia de manchas de la edad y otras manifestaciones de hiperpigmentación en la piel, el método que comprende aplicar tópicamente a una área de la piel en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un agente que regula por decremento la expresión de la dineína, en donde dicho compuesto se ha identificado para el uso por un ensayo que determina la capacidad de una sustancia de modular los niveles de expresión de la dineína, que incluyen en ensayo descrito en la presente. Preferiblemente, el ensayo mide los niveles de expresión de mRNA de la dineína en los queratinocitos dérmicos. Los reguladores por decremento de la dineína también pueden ser efectivos en el tratamiento de desórdenes proliferativos en la piel, incluyendo psoriasis.

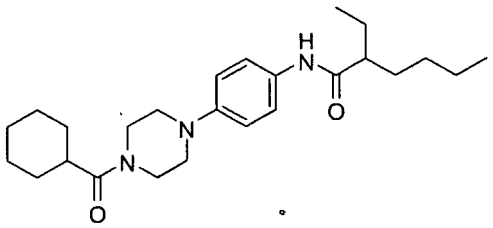
Entre los materiales de plantas naturales y extractos botánicos que regulan por decremento la dineína se encuentran

Amorphophallus campanulatus, *Gomphrena globosa Linn*., *Fibraretinum resica Pierre* (*Fibrauretine*), *Vernonia cinerea Linn*, *Less*, *Cayratia japonica*, *Pteris semipinnata*, y combinaciones de los mismos.

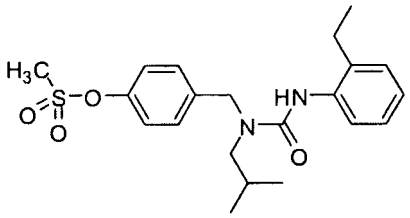
Otras sustancias que regulan por decremento la dineína incluyen ácido 5-cloro-salicílico, 3,6-Nonadienol, cis-6-nonenol y lo siguiente:



Compuesto 6



Compuesto 7



Compuesto 8

En una realización, un método para mejorar la apariencia estética de la piel humana y/o mejorar la apariencia de la piel envejecida y/o fotodañada comprende aplicar tópicamente una cantidad efectiva de una composición que comprende un extracto de plantas naturales seleccionado del grupo que consiste en *Mammea siamensis* (extracto de flor), *Medemia nobilis* (extracto de semilla), *Raphia farinifera* (extracto de semilla), *Erythrina indica* (extracto de hoja), *Clerodendron fragrans* (extracto de planta entera), *Operculina turpethum* (extracto de planta entera, sin raíces), o combinaciones de los mismos, y un vehículo cosméticamente aceptable.

Los materiales de plantas pueden estar en cualquier forma que incluyen, pero no se limitan a, la planta entera, una planta seca, una planta molida, o partes de la misma, que incluyen pero no se limitan a, semillas, acículas, hojas, raíces, corteza, conos, tallos, rizomas, células de callo, protoplastos, flores, y meristemos, o componentes y/o constituyentes encontrados en, o aislados de, el material de plantas naturales, y/o porciones de la planta, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el material de plantas naturales está en la forma de un extracto derivado de la planta entera o de una porción seleccionada de la planta, tales como las hojas de la planta. Se sobreentiende que “material de planta natural” también incluye un ingrediente, componente, constituyente, o extracto derivado del material de planta natural. En otra realización, el extracto de planta como se usa en la presente, también incluye extractos “sintéticos”, es decir, varias combinaciones de componentes y/o constituyentes de plantas conocidos que se combinan para imitar sustancialmente la composición y/o actividad de un extracto de planta de origen natural. Tales extractos sintéticos se incluyen en el término “extracto de planta”. Los extractos sintéticos tendrán dos o más, tres o más, o cuatro o más ingredientes activos en común con una planta. De la manera más preferible, los extractos sintéticos tendrán sustancialmente el mismo número de ingredientes activos como un extracto natural. La correspondencia de la incidencia numérica de los ingredientes activos entre los extractos sintéticos y la planta o un extracto natural también se pueden describir en términos de “porcentaje de similitud”. Preferiblemente, el extracto sintético tiene aproximadamente 50 por ciento o más de similitud con la composición química de una planta o extracto natural. En otras palabras, el extracto sintético tiene aproximadamente 50 por

ciento o más de los ingredientes activos encontrados en la planta o un extracto natural. Más preferiblemente, la composición química del extracto sintético tiene aproximadamente 70 por ciento o más de similitud con la composición química de una planta o un extracto natural. Óptimamente, un extracto sintético tiene aproximadamente 90 por ciento o más de similitud con la composición química de una planta o un extracto natural.

Para el uso en las composiciones de esta descripción, el extracto de planta o componentes y/o constituyentes activos se derivan preferiblemente de manera directa de la planta. Los componentes pueden estar en una forma pura, una forma semi-pura, o una forma no purificada. En una realización, los componentes están en la forma de un extracto obtenido por extracción con solvente acuoso u orgánico. Ejemplos no limitantes de solventes orgánicos incluyen ácido acético, acetato de etilo, alcoholes inferiores (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, butanol), diclorometano, hexano, tolueno, xileno, éter de petróleo, y combinaciones de los mismos. El solvente puede ser polar o no polar, prótico o aprótico, miscible en agua o inmiscible en agua. El pH puede ser ácido, neutro, o alcalino. Los métodos bien conocidos en la técnica se pueden usar para la extracción con solvente acuoso u orgánico. Un tiempo de extracción entre aproximadamente 1-8 horas a una temperatura entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 90°C es típicamente adecuado. El extracto recolectado luego se filtra bien para remover los restos, y se puede usar directamente, o se concentra, por ejemplo al destilar el solvente o mediante otro procesamiento convencional, y el extracto también se puede proporcionar en forma de polvo.

Las composiciones cosméticas de acuerdo con la invención se pueden formular en una variedad de formas para la aplicación tópica y comprenderán de aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 90% en peso de uno o más activos que modulan la dineína, y comprenderán preferiblemente tales activos en una cantidad de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 25% en peso, y más preferible de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1% en peso.

Las composiciones pueden incluir un vehículo cosméticamente aceptable. Tales vehículos pueden tomar la forma de cualquiera conocido en la técnica adecuado para la aplicación a la piel y pueden incluir, pero no se limitan a, agua; aceites vegetales, aceites minerales; ésteres tales como palmitato de octalo, miristato de isopropilo y palmitato de isopropilo; éteres tales como éter dicaprílico e isosorbida de dimetilo; alcoholes tales como etanol e isopropanol; alcoholes grasos tales como alcohol cetílico, alcohol cetearílico, alcohol estearílico y alcohol bifenílico; isoparafinas tales como isooctano, isododecano y hexadecano; aceites de silicona tales como ciclometicona, aceites de hidrocarburo tales como aceite mineral, petrolato, isoeicosano y poliisobuteno; polioles tales como propilenglicol, glicerina, butilenglicol, pentilenglicol y hexilenglicol; liposomas; ceras; o cualquier combinación o mezclas de lo anterior.

El vehículo puede comprender una fase acuosa, una fase de aceite, un alcohol, una fase de silicona o mezclas de los mismos y puede estar en la forma de una emulsión. Ejemplos no limitantes de emulsiones adecuadas incluyen emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de silicona en agua, emulsiones de agua en silicona, emulsiones de glicerina en aceite, emulsiones de cera en agua, emulsiones triples de agua-aceite-agua o similares. La emulsión puede incluir un emulsificante, tal como un surfactante no iónico, aniónico o anfotérico, o un agente gelificante.

La composición tópica tendrá típicamente un intervalo de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, con un pH en el intervalo de 3 a 7 que es preferido. En alguna realización, la composición tendrá un pH en el intervalo de 3.5 a 5.5. Los ajustadores de pH adecuado tales como ácido cítrico y trietanolamina se pueden adicionar para llevar el pH dentro del intervalo deseado.

En una realización de la invención, las composiciones pueden incluir activos de la piel adicionales, que incluyen pero no se limitan a, botánicos, agentes queratolíticos, agentes de descamación, potenciadores de proliferación de queratinocitos, inhibidores de colagenasa, inhibidores de elastasa, agentes de despigmentación, agentes anti-inflamatorios, esteroides, agentes anti-acné, antioxidantes, e inhibidores de producto final de glicación avanzada (AGE).

La composición puede comprender ingredientes activos adicionales que tienen beneficios anti-envejecimiento, ya que se contempla que las mejoras sinérgicas se pueden obtener con tales combinaciones. Los componentes anti-envejecimiento ejemplares incluyen, sin limitación, botánicos (por ejemplo, extracto de Butea Frondosa); fitol; ácido tiodipropiónico (TDPA) y ésteres de los mismos; retinoides (por ejemplo, ácido 9-*cis*-retinoico, ácido 13-*cis*-retinoico, ácido todo-*trans*-retinoico y derivados de los mismos, ácido fitánico, retinol (Vitamina A) y ésteres de los mismos, tales como palmitato de retinol, acetato de retinol y propionato de retinol, y sales de los mismos y otros); hidroxi ácidos (que incluyen alfa-hidroxiácidos y beta-hidroxiácidos), ácido salicílico y salicilatos de alquilo; agentes exfoliantes (por ejemplo, ácido glicólico, ácido 3,6,9-trioxaundecanodióico, etc.), compuestos estimuladores de estrógeno sintetasa (por ejemplo, cafeína y derivados); compuestos capaces de inhibir la actividad de la 5 alfa-reductasa (por ejemplo, ácido linolénico, ácido linoleico, finasterido, y mezclas de los mismos); y agentes mejoradores de la función de barrera (por ejemplo, ceramidas, glicéridos, colesterol y sus ésteres, ácidos grasos alfa-hidroxi y omega-hidroxi y ésteres de los mismos, etc.), por nombrar algunos. Los retinoides ejemplares incluyen, sin limitación, ácido retinoico (por ejemplo, todo *trans* o 13-*cis*) y derivados de los mismos, retinol (Vitamina A) y ésteres del mismo, tales como palmitato de retinol, acetato de retinol y propionato de retinol, y sales de los mismos.

En otra realización, las composiciones tópicas de la presente invención también pueden incluir uno o más de lo siguiente: un potenciador de penetración de la piel, un emoliente, tal como miristato de isopropilo, petrolato, siliconas, (por ejemplo, meticona, dimeticona), aceites, aceites minerales, y ésteres de ácido graso; un humectante, tal como glicerina o caprililglicol, un atirantador de la piel, tal como oligopéptido de palmitoílo, colágeno, o agentes potenciadores de colágeno y/o glicosaminoglicano (GAG), un bloqueador solar, tal como avobenzona, un agente exfoliante, y un antioxidante.

Los agentes exfoliantes adecuados incluyen, por ejemplo, alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, oxa-ácidos, oxadiácidos, y sus derivados tales como ésteres, anhídridos y sales de los mismos. Los hidroxiácidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 2-hidroxialcanoico, ácido mandélico, ácido salicílico y derivados de los mismos. Un agente exfoliante preferido es ácido glicólico. Cuando está presente, el agente exfoliante puede comprender de aproximadamente 0.1% en peso a aproximadamente 80% en peso de la composición.

Los ejemplos de antioxidantes que se pueden usar en las presentes composiciones incluyen compuestos que tienen funciones de hidroxi-fenólico, tales como ácido ascórbico y sus derivados/ésteres; beta-caroteno; catequinas; curcumina; derivados de ácido ferúlico (por ejemplo, ferulato de etilo, ferulato de sodio); derivados de ácido gálico (por ejemplo, galato de propilo); licopeno; ácido redúctico; ácido rosmarínico; ácido tánico; tetrahidrocurcumina; tocoferol y sus derivados; ácido úrico; o cualquiera de las mezclas de los mismos. Otros antioxidantes adecuados son aquellos que tienen una o más funciones de tiol (-SH), en forma ya sea reducida o no reducida, tal como glutationa, ácido lipoico, ácido tioglicólico, y otros compuestos de sulfhidrilo. El antioxidante puede ser inorgánico, tal como bisulfitos, metabisulfitos, sulfitos, u otras sales inorgánicas y ácidos que contienen azufre. Las composiciones de la presente invención pueden comprender un antioxidante de manera preferible de aproximadamente 0.001% en peso a aproximadamente 10% en peso, y de manera más preferible de aproximadamente 0.01% en peso a aproximadamente 5% en peso, del peso total de la composición.

Otros aditivos convencionales incluyen: vitaminas, tales como tocoferol y ácido ascórbico; derivados de vitamina tal como monopalmitato de ascorbilo; espesantes tales como hidroxialquil celulosa; agentes gelificantes; agentes de estructuración, agentes quelantes de metal tales como EDTA; pigmentos; colorantes, y ajustadores de pH. La composición puede comprender opcionalmente otros componentes conocidos por aquellas personas expertas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, formadores de película, humectantes, minerales, modificadores de viscosidad y/o reología, agentes antiacné, repelentes de insectos, compuestos de enfriamiento de la piel, protectores de la piel, lubricantes, fragancias, conservadores, estabilizantes, y mezclas de los mismos. Además de lo anterior, las composiciones cosméticas de la invención pueden contener cualquier otro compuesto para el tratamiento de desórdenes de la piel.

La composición se puede formular en una variedad de formas de producto, tales como, por ejemplo, una emulsión, loción, crema, suero, rocío, aerosol, torta, ungüento, esencia, gel, pasta, parche, lápiz, toallita, máscara, barra, espuma, elíxir, concentrado, y similares, particularmente para la administración tópica. Preferiblemente la composición se formula como una emulsión, loción, crema, ungüento, suero o gel.

La invención proporciona un método para tratar el envejecimiento de la piel al aplicar tópicamente una composición que comprende un agente activo que modula la dineína, preferiblemente en un vehículo cosméticamente aceptable, sobre el área afectada durante un período de tiempo suficiente para reducir, mejorar, revertir o prevenir los signos dermatológicos de envejecimiento.

En general, la mejora, en la condición y/o apariencia estética se selecciona del grupo que consiste en: reducir los signos dermatológicos del envejecimiento cronológico, fotoenvejecimiento, envejecimiento hormonal, y/o envejecimiento actínico; prevenir y/o reducir la aparición de líneas y/o arrugas; reducir la notabilidad de líneas faciales y arrugas, arrugas faciales sobre las mejillas, frente, arrugas perpendiculares entre los ojos, arrugas horizontales encima de los ojos, y alrededor de la boca, líneas de marioneta, y particularmente arrugas profundas o surcos; mejorar la apariencia de las líneas suborbitales y/o líneas periorbitales; reducir la apariencia de las patas de gallo; rejuvenecer y/o revitalizar la piel, particularmente envejecimiento de la piel; reducir la fragibilidad de la piel; prevenir y/o revertir la pérdida de glicosaminoglicanos y/o colágeno; mejorar los efectos del desequilibrio de estrógenos; prevenir la atrofia de la piel; prevenir, reducir, y/o tratar hiperpigmentación o hipopigmentación; minimizar la decoloración de la piel; mejorar el tono, luminosidad, claridad y/o tirantez de la piel; prevenir, reducir y/o mejorar la flacidez de la piel; mejorar la firmeza, gordura, flexibilidad y/o suavidad de la piel; mejorar la producción de pro-colágeno y/o colágeno; mejorar la textura de la piel y/o promover la retexturización; mejorar la reparación y/o función de la barrera de la piel; mejorar la apariencia de los contornos de la piel; restaurar el lustre y/o brillo de la piel; minimizar los signos dermatológicos de fatiga y/o estrés; resistir el estrés ambiental; reabastecer los ingredientes en la piel disminuidos por el envejecimiento y/o menopausia; mejorar la comunicación entre las células de la piel; incrementar la proliferación y/o multiplicación celular; incrementar el metabolismo de las células de la piel disminuido por el envejecimiento y/o menopausia; retardar el envejecimiento celular; mejorar la hidratación de la piel; aumentar el espesor de la piel; desacelerar o detener el adelgazamiento de la piel; incrementar la elasticidad y/o resiliencia de la piel; aumentar la exfoliación; mejorar la microcirculación; disminuir y/o prevenir la formación de

celulitis; y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, las composiciones comprenderán de aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 20%, más típicamente de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 10%, que incluye de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso de un modulador en la dineína. Preferiblemente el modulador puede ser un regulador por incremento de dineína en los fibroblastos. También preferiblemente, el modulador puede ser un regulador por incremento de dineína en los queratinocitos. El modulador puede ser un regulador por decremento de dineína en los queratinocitos. Menos preferiblemente, aunque aún dentro del alcance de la invención, el modulador puede ser un regulador por decremento de dineína en los fibroblastos. En una realización, el modulador es un regulador por incremento de dineína en ambos fibroblastos y queratinocitos. Las combinaciones de los moduladores también se contemplan. En una realización, el modulador es una combinación de dos o más sustancias que son reguladoras por incremento de la dineína en los fibroblastos y/o queratinocitos.

La composición se aplicará típicamente a la piel, una, dos o tres veces al día siempre y cuando sea necesario para lograr los resultados deseados. El régimen de tratamiento puede comprender aplicación diaria durante por lo menos una semana, por lo menos dos semanas, por lo menos cuatro semanas, por lo menos ocho semanas, o por lo menos 12 semanas o más. Los regímenes de tratamiento crónicos también se contemplan. El efecto de una composición en la formación o apariencia de líneas finas y arrugas se puede evaluar cualitativamente, por ejemplo, por inspección visual, o cuantitativamente, por ejemplo, por mediciones asistidas por microscopio o computadora de la morfología de la arruga (por ejemplo, el número, profundidad, longitud, área, volumen y/o ancho de las arrugas por área unitaria de la piel). En una realización, la composición de la invención se aplicará a la piel en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 mg/cm^2, de manera más típica de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/cm^2, y de manera preferible de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/cm^2.

También se contempla que las composiciones de la invención serán útiles para tratar piel delgada al aplicar tópicamente la composición a la piel delgada de un individuo en necesidad de la misma. Se pretende que “piel delgada” incluya la piel que se adelgaza debido al envejecimiento cronológico, menopausia, o fotodaño la piel que se adelgaza prematuramente. En algunas realizaciones, el tratamiento es para piel delgada en hombres, mientras que otras realizaciones tratan la piel delgada en mujeres, premenopáusicas o posmenopáusicas, ya que se cree que la piel se adelgaza de forma diferente con la edad en hombres y mujeres y, en particular, en las mujeres en diferentes etapas de la vida.

El método de la invención se puede emplear profilácticamente para prevenir el envejecimiento que incluye individuos que no tienen signos manifiestos de envejecimiento de la piel, más comúnmente en individuos de menos de 25 años de edad. El método también puede revertir o tratar signos de envejecimiento una vez manifestados como es común en individuos de más de 25 años de edad, o para desacelerar la progresión de envejecimiento dermatológico en tales individuos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen aspectos específicos de la invención para ilustrar la invención pero no se deben considerar como limitantes de la invención, ya que los ejemplos proporcionan simplemente una metodología específica útil en el entendimiento y la práctica de la invención y sus diversos aspectos.

Ejemplo 1

Expresión relacionada con la edad de la dineína en los fibroblastos dérmicos.

Los fibroblastos dérmicos normales de donadores neonatales (n=3) y de mujeres de 31-39 años (n=3) se colocaron en placas en cajas de 10 cm en DMEM (FBS al 10%, 4.5g/L de glucosa) y se desarrollaron a su confluencia. Las células se lavaron con PBS frío y el RNA se aisló usando un equipo acuoso de RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad y concentración del RNA se verificaron con el Bioanalizador Agilent 2100 usando un Nano Chip de RNA. Se llevaron a cabo los análisis de expresión génica usando el RNA aislado y una máquina de RT-PCR ABI 7900 HT. La sonda de dineína usada fue la DYNC1H1 de cadena pesada citoplásmica, de *Homo sapiens*, con la DYNC1H1-Hs00300243_ml de código ABI. Se incluyó el control interno y la expresión génica de la dineína se normalizó contra GAPDH. Una reducción significativa (~14%) de la expresión de la dineína se encontró en las células de donadores de 30+ años de edad que se comparan a las células neonatales. Los niveles de expresión génica intrínseca (normalizada) se proporcionan a continuación en la Tabla 1.

En otro experimento, se analizaron las biopsias humanas para la expresión de DYNC1H1 después de la exposición a radiación de UV. Se recolectaron las biopsias de la piel de la biopsia exploratoria de los antebrazos dorsales (foto-expuesto) y los brazos superiores-inferiores (foto-protegido) de donadores caucásicos femeninos sanos jóvenes (de 18-25 años de edad, n=15) y viejos (45-65 años de edad, n=15), se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina. Se cortaron cinco microsecciones y se colocaron en portaobjetos. Se llevó a cabo la IHC usando un anticuerpo policlonal de conejo contra la dineína y se visualizó usando un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con azul vector. De la cohorte más joven, 62% de los sujetos mostraron expresión incrementada de

dineína, mientras que solamente 33% de los sujetos más viejos mostraron un incremento. Estos datos muestran que la piel más vieja es mucho menos efectiva en la producción de dineína cuando es necesario. El incremento en los niveles de la expresión génica en la exposición UV también se proporciona a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2.

Edad	Expresión normalizada de la DYNC1H1	% de individuos que muestran un incremento de DYNC1H1 con exposición de UV
Joven	1.61	62
Adulta	1.39	33

Los datos en la Tabla 2 indican que la expresión de la dineína citoplásmica disminuye con la edad, ya que la capacidad de la piel de regular por incremento la expresión de la dineína en respuesta como al factor de estrés, tal como exposición a UV. Por lo tanto se cree que la modulación de la dineína es un procedimiento racional para combatir el envejecimiento por la edad y relacionado con el medio ambiente de la piel.

EJEMPLO 2

Ensayo de la modulación de la dineína

Se cultivaron fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos normales en placas tratadas con cultivo de tejido de 96 cavidades, que contienen un medio de cultivo apropiado. La solución madre de los activos se hizo en un vehículo apropiado (agua/Etanol/Propilenglicol). Las células se trataron con material de prueba o control de vehículo respectivo diluido en medio de crecimiento durante 24 horas en una incubadora a 37°C humidificada con CO_2 al 10%. Después de la incubación, se removió el medio de crecimiento de cada placa y 100 µl de solución amortiguadora de lisis se adicionó a las cavidades y se colocaron en una incubadora a 37°C con CO_2 al 10% durante 30 minutos. Al final de la incubación, las células se recolectaron en placas de congelador y se colocaron en un congelador a -80°C, hasta el análisis. Los cambios en el mRNA para la Dineína después del tratamiento se analizaron usando un ensayo multiplex Panomics Quantigene que emplea una tecnología de DNA ramificado, siguiendo las instrucciones del fabricante (Affymetrix, CA). El porcentaje de incremento (regulación por incremento) o disminución (regulación por decremento) en el mRNA para la DYNC1H1 de cadena pesada de la dineína citoplásmica se calculó al comparar los resultados de prueba al control. El porcentaje de regulación por incremento o regulación por decremento se convierte a un registro escalado como se muestra a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3.

% de regulación por incremento	Escala de regulación por incremento	% de regulación por decremento	Escala de regulación por decremento
0-20	0	0-20	0
21-40	+	21-40	-
41-60	++	41-60	--
61-80	+++	61-80	------
>81	++++	>81	---------

EJEMPLO 3

Regulación por incremento de las dineínas

Se sometieron a prueba una variedad de extractos botánicos para la capacidad de regular por incremento la dineína de acuerdo con el método del Ejemplo 2. Los resultados se proporcionan a continuación en la Tabla 4. Las concentraciones de cada extracto se proporcionan con base en el peso seco del extracto de planta dado, lo que se refiere al peso del extracto después de que los solventes de extracción volátiles se han removido. Las células sometidas a prueba fueron ya sea queratinocitos (K) o fibroblastos (F).

Tabla 4.

Extracto de Planta	Concen. (%)	Tipo de Célula	Efecto
Orthosiphon grandiflorus	0.0001	K	+++
Clinacanthus nutans	0.01	K	++++
Cistanche tubulosa	0.01	K	++++
Erythrina indica	0.1	K	+++
Erythrina indica	0.01	F	+
Erythrina indica	0.001	F	+
Operculina turpethum	0.1	K	
Gynandropsis gynandra	0.1	K	+++
Erthrina Flabelliformis	0.01	F	++++
Erthrina Flabelliformis	0.001	K	++++
Helichrysum Odoratissimum	0.01	K	++++
Desmanthus illinoensis	0.01	F	++++
Ozothamnus Obcordatus	0.01	K	+++
Tagetes erecta Linn	0.01	K	++
Tagetes erecta Linn	0.001	K	+++
Caesalpinia sappan Linn	0.01	K	++++
Medemia nobilis	0.01	K	++++
Calatropis gigantea	0.001	F	H 1—1—h
Calatropis gigantea	0.0001	F	++++
Loropetalum chinense	0.1	K	~\—1—b
Heliotropium indicum	0.1	K	+++
Heliotropium indicum	0.01	K	+
Dianella ensifolia	0.1	K	H—1—h
Breynia fruticosa	0.1	K	+++
Dendranthema indicum	0.1	K	+++
Dendranthema indicum	0.01	K	+
Sambucus chinensis	0.1	K	++++
Sambucus chinensis	0.01	K	+
Scoparis dulcis	0.1	K	H—bH—h
Scoparis dulcis	0.01	K	++
Acacia melanoxylon	0.001	K	+++

Clerodendrum floribundum	0.01	K	++++
Clerodendrum floribundum	0.001	K	+
Commersonia bartramia	0.001	K	+++
Dodonaea viscosa	0.01	F	++++
Dodonaea viscosa	0.001	K	+
Dodonaea viscosa	0.0001	K	+++
Duboisa myoporoides	0.01	F	H—1—\—h
Duboisa myoporoides	0.01	K	++++
Duboisa myoporoides	0.001	F	++
Duboisa myoporoides	0.001	K	++++
Ehretia acuminate	0.01	K	++
Ehretia acuminate	0.001	F	++++
Ehretia acuminate	0.001	K	+
Ficus coronata	0.001	F	+
Ficus coronata	0.001	K	++
Ficus coronata	0.0001	F	+++
Ficus coronata	0.0001	K	+
Goodenia ovata	0.01	F	++
Goodenia ovata	0.001	K	++++
Goodenia ovata	0.0001	K	+++
Hymenosporum flavum	0.01	F	+
Hymenosporum flavum	0.001	F	++++
Hymenosporum flavum	0.001	K	++++
Lavatera plebeia	0.01	F	+
Lavatera plebeia	0.01	K	++++
Melaleuca quinquernervia	0.001	K	++++
Melaleuca quinquernervia	0.0001	K	+++
Omolanthes populifolius	0.0001	K	+++
Melicope hayesii	0.01	K	++++
Medemia nobilis	0.01	K	++++

Los compuestos 1-5 y la calmicrina también se sometieron a prueba para la capacidad para regular por incremento la dineína de acuerdo con el método del Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.

Extracto de Planta	Concen. (%)	Tipo de Célula	Efecto
Compuesto 1	0.00005	F	++
Compuesto 2	0.0005	K	++
Compuesto 3	0.00005	F	++
Compuesto 4	0.00005	F	++
Compuesto 5	0.00001	F	++
Calmicrina	0.0001	K	++++

EJEMPLO 4

Regulación por decremento de las dineínas

Se sometieron a prueba una variedad de compuestos y extractos botánicos para la capacidad de regular por decremento la dineína de acuerdo con el método del Ejemplo 2. Los resultados se proporcionan a continuación en la Tabla 6, donde las concentraciones de los extractos botánicos se proporcionan con base en el peso seco del extracto de planta dado. En cada caso se logró una importancia estadística en el nivel $p < 0.05$ o mejor.

Tabla 6.

Extracto de Planta	Concen. (%)	Tipo de Célula	Efecto
ácido 5-Clorosalicílico	0.1	K	--
Amorphophallus campanulatus	0.01	K	-
Gomphrena globosa Linn.	0.01	F	-
Compuesto 6	0.0005	K	-
Compuesto 7	0.00005	K	-
Compuesto 8	0.0005	F	-
3,6-Nonadienol	0.01	F	-
Fibraretinum resica Pierre	0.001	F	-
Tiliacora Triandra	0.0001	F	-
Vernonia cinerea (Linn.) Less.	0.01	K	-
cis-6-Nonenol	0.0001	K	-
Derris Scandens	0.001	K	-
Cayratia japonica	0.01	F	-

El derivado de ácido salicílico proporcionó el grado más grande de regulación por decremento del mRNA para la DYNC1H1 de cadena pesada de la dineína citoplásmica, produciendo una reducción de 45.03% ($p = 0.02$) en queratinocitos, seguido por *Tliliacora Triandra* que dio una reducción de 36.7% en fibroblastos ($p = 0.01$).

EJEMPLO 5

Regulación por incremento in vivo en la dineína

Se sometieron a prueba extractos botánicos para la capacidad de regular por incremento la dineína in vivo. 33 sujetos caucásicos mujeres sanas de 30-65 años de edad con tipo de piel II o III se trataron con ingredientes en el antebrazo dorsal durante 3 semanas (3 rondas consecutivas de parches de 5 x 24 horas bajo semi-oclusión). Los

artículos y vehículos de prueba se aplicaron en una asignación aleatorizada en cinco sitios en cada antebrazo. La dosis de aplicación fue de 2 mg/cm^2. Después del tratamiento, se obtuvo una biopsia por punción de 2 mm de cada sitio de tratamiento y se fijó en 4% de paraformaldehído y se procesó para estudios IHC. La IHC se llevó a cabo usando un anticuerpo policlonal de conejo contra la dineína y se visualizó usando un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con azul vector, y se describe en el Ejemplo 1. Los resultados mostrados a continuación en la Tabla 7 se expresan como el número (N) de pacientes que muestran regulación por incremento, sin cambio, o regulación por decremento en los niveles de dineína.

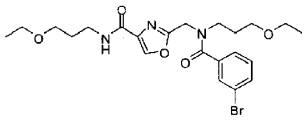
Tabla 7.

Extracto de Planta	Regulado por incremento (N)	Sin cambio (N)	Regulado por decremento (N)
Melicope hayesii	9	7	3
Mammea siamensis	10	7	2
Operculina turpethum	3	13	4
Erythrina indica	6	7	4
Raphia farinifera U	7	7	4
Medemia nobilis X	5	11	3
Compuesto 1	10	6	2

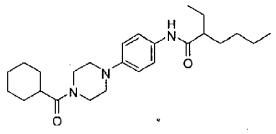
Como se muestra en la Tabla 7, casi todos los extractos botánicos sometidos a prueba regulan por incremento la dineína in vivo cunado se aplican tópicamente a la piel. Mientras que el *Operculina turpethum* no mostró regulación por incremento o regulación por decremento significativa en este estudio, con base en su potencia in vitro, se cree que los resultados se mejorarían con el uso de un potenciador de penetración para mejorar el suministro en la piel y/o una dosis o duración de tratamiento incrementados.

REIVINDICACIONES

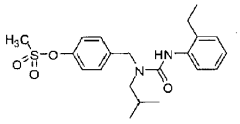
1. Un método cosmético para mejorar la hiperpigmentación de la piel humana que comprende aplicar tópicamente a un área de la piel que lo necesite una cantidad efectiva de un agente activo seleccionado del grupo de extractos botánicos de *Amorphophallus campanulatus, Gomphrena globose* Linn., *Fibraretinum resica Pierre* (Fibrauretina), *Vernonia cinerea* Linn. Less, *Cayratia japonica, Pteris semipinnata* y ácido 5-clorosalicílico, 3,6-nonadienol, *cis*-6-nonenol y los compuestos:



Compuesto 6



Compuesto 7



Compuesto 8

y combinaciones de los mismos.

2. Un método para identificar agentes activos útiles para mejorar la hiperpigmentación de la piel humana que comprende someter a ensayo sustancias candidato para determinar la capacidad de regular por decremento los niveles celulares de dineína citoplasmática, en el que la capacidad de dicho agente activo para regular por decremento la dineína citoplasmática se determina mediante un ensayo in vitro que mide el nivel de expresión de la dineína citoplasmática en una célula queratinocítica dérmica humana o de ratón que se ha puesto en contacto con dicho agente activo, en el que el ensayo in vitro mide los niveles de expresión del gen humano *DYNC1H1* o el gen de ratón *Dync1h1* que codifican una subunidad de cadena pesada DYNC1H1 midiendo los niveles de expresión del mRNA correspondiente con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR); y en el que el agente activo regula por decremento los niveles de expresión del mRNA correspondiente en al menos 10%.