

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 538**

51 Int. Cl.:

A61P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2013 PCT/FR2013/050001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13102727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2013 E 13701811 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2812014**

54 Título: **Extracto de semillas de Kniphofia uvaria, composición cosmética o dermatológica que lo contiene, y sus usos**

30 Prioridad:

04.01.2012 FR 1250077

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**LVMH RECHERCHE (100.0%)
185 avenue de Verdun
45800 Saint-Jean De Braye, FR**

72 Inventor/es:

**PECHER, VIRGINIE;
LEPLANQUAIS, VIRGINIE;
COLIN, ANNE-SOPHIE;
FRANCHI, JOCELYNE;
RENIMEL, ISABELLE y
LAZOU, KRISTELL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 656 538 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto de semillas de *Kniphofia uvaria*, composición cosmética o dermatológica que lo contiene, y sus usos

- 5 La invención se refiere a un extracto de semillas de la planta *Kniphofia uvaria*, una composición cosmética o dermatológica que comprende dicho extracto, y su uso en el tratamiento del envejecimiento de la piel, y de enfermedades inflamatorias cutáneas.

Estado de la técnica

- 10 La planta *Kniphofia uvaria* es una especie rizomatosa vivaz de la familia de las Liliaceae (clasificación clásica) y de las Asphodelaceae (clasificación filogenética). Esta especie rústica tiene hojas estrechas y caídas, que pueden alcanzar un metro de longitud. Las inflorescencias forman una espiga compuesta por numerosas flores tubulares de colores brillantes.

- 15 Las flores producen durante dos meses al año una gran cantidad de néctar, que contiene principalmente agua, aminoácidos, glucosa, fructosa, sales minerales y oligoelementos. Este néctar contiene por lo tanto todos los elementos básicos necesarios para la nutrición celular, pero también contiene la superoxidismutasa, una enzima que actúa contra la lipoperoxidación producida por los radicales libres.

- 20 Teniendo en cuenta su composición, el néctar de las flores de *Kniphofia uvaria* está especialmente adaptado al cuidado de las pieles secas para alimentarlas en profundidad y para revitalizarlas, y ya se ha incorporado en tratamientos cosméticos regeneradores y revitalizantes. También se ha propuesto en otros tratamientos cosméticos junto con sustancias activas antiedad, cuya acción complementa.

- 25 El solicitante ha puesto de manifiesto de forma totalmente sorprendente que un extracto de semillas de la planta *Kniphofia uvaria* está también provisto de una actividad antiedad, por lo que no es necesario añadir a este extracto en particular otra sustancia activa antiedad para proponer un tratamiento que permita luchar contra el envejecimiento cutáneo.

- 30 Hoy en día, no se ha descrito ningún proceso de extracción que utilice las semillas de la planta *Kniphofia uvaria*. Por tanto, es especialmente sorprendente haber puesto de manifiesto que dicho extracto tiene una actividad cosmética.

- 35 Los inventores de la presente invención, por tanto, han puesto de manifiesto en primer lugar que un extracto de semillas de la planta *Kniphofia uvaria*, en particular, el extracto lipófilo de dichas semillas, disminuye la producción de prox-Metaloproteinasa de la matriz de Tipo 1 (pro-MMP1), la encima clave responsable de la degradación de la matriz extracelular, cuya degradación se ve especialmente acelerada por la radiación UV.

- 40 También se ha demostrado que un tratamiento in vitro de fibroblastos con el extracto de la invención produce una fuerte inhibición de la expresión de las metaloproteinasas, más especialmente las MMP-2 y MMP-9, enzimas responsables de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular.

- 45 También se ha demostrado que un extracto de la invención es un agonista de los receptores activados por los proliferadores de los peroxisomas (PPAR) del que un isotipo β/δ es predominante en la epidermis. Esta interacción entre el agonista y el receptor PPAR produce la activación de la transcripción de genes diana, especialmente implicados en la diferenciación de los queratinocitos. Este proceso conduce a la formación del estrato córneo, especialmente al estimular la síntesis de lípidos epidérmicos, aumentando la formación y secreción de los cuerpos lamelares o aumentando también la actividad de las enzimas implicadas en el mecanismo de secreción extracelular de los lípidos en la capa córnea (Schmuth M. et al., J. Lipids Res., 2008, 49, 499-509).

- 50 Los PPAR también se conocen por su actividad antiinflamatoria (Man M. et al 2008, J. Invest. Dermatol., 128, 370-377), con una diana específica en las interacciones de neutrófilos y células endoteliales (Piqueras L. et al 2009, J. Leucocyte Biol., 86, 115-122).

- 55 Por otra parte, el estado microinflamatorio (o la noción de inflamación estéril) de los tejidos envejecidos cada vez está más reconocida, donde el fenotipo proinflamatorio de las células senescentes altera negativamente la homeostasia tisular. Los MMP forman parte de los factores secretados por las células senescentes como fuente de inflamación crónica dañina para las células circundantes y el tejido (Freund A. et al, 2010, Trends Mol. Med., 16, 238-246).

- 60 Para terminar, los inventores han demostrado que este extracto tiene la capacidad de modular la expresión de los genes que codifican determinadas proteínas implicadas en varios procesos biológicos relacionados con el envejecimiento de la piel, con el estado de hidratación de la piel y de los tejidos, o también con su nivel de firmeza y/o su elasticidad.

- 65 Por su actividad con respecto a estas dianas, un extracto de ese tipo tiene interés para su uso como principio activo

en composiciones cosméticas o dermatológicas, especialmente destinadas a luchar contra el envejecimiento cutáneo, para contribuir al mantenimiento de la firmeza, y/o para mantener la función de barrera de la piel.

- 5 Por otra parte, puesto que el extracto de acuerdo con la invención tiene una consistencia oleosa, su uso es especialmente interesante como excipiente cosmético, más especialmente como agente texturizante de fases grasas de composiciones cosméticas.

Fines de la invención

- 10 La invención tiene por objeto principal proporcionar un novedoso extracto de origen vegetal, especialmente útil como principio activo y/o excipiente en composiciones cosméticas o dermatológicas, especialmente destinadas a prevenir o retrasar la aparición de signos del envejecimiento cutáneo o ralentizar o atenuar los efectos.

- 15 La invención tiene también por objeto suministrar un novedoso extracto de origen vegetal para luchar contra los efectos inducidos por la exposición de las células de la piel a los UV, tales como la degradación de la matriz extracelular y/o la instalación de un estado microinflamatorio perjudicial a cierto plazo, o también para contribuir al mantenimiento de la firmeza y/o de la función de barrera de la piel.

- 20 La invención tiene también por objeto suministrar una composición cosmética que contiene este novedoso extracto, así como un método de tratamiento cosmético que utiliza esta composición. La invención también propone una composición dermatológica que contiene este novedoso extracto.

- 25 La invención tiene finalmente por objeto resolver el conjunto de los problemas técnicos mediante una solución sencilla, relativamente barata y de utilidad a escala industrial, especialmente en la industria cosmética.

Descripción de la invención

La invención es tal como se reivindica.

- 30 De este modo, según un primer objeto, la invención se refiere a un extracto de semillas de la planta *Kniphofia uvaria*. Este extracto se obtiene mediante la puesta en contacto de dichas semillas con dióxido de carbono en estado supercrítico como disolvente, o bien mediante prensado mecánico en frío de dichas semillas.

- 35 El extracto de semillas es, preferentemente, un extracto lipófilo. Por "extracto lipófilo", se entiende un extracto obtenido por puesta en contacto de las semillas con un disolvente apolar o por prensado mecánico de las semillas. De acuerdo con una realización preferida, el extracto de semillas es un aceite líquido a temperatura ambiente (25°C).

- 40 Previamente a la etapa de extracción mediante dióxido de carbono supercrítico o previamente al prensado mecánico, las semillas recolectadas se puede secar y/o triturar.

- 45 La invención tiene por objeto un extracto vegetal lipófilo de la planta *Kniphofia uvaria* obtenido mediante un proceso de extracción en el que el disolvente de extracción es dióxido de carbono en estado supercrítico. La parte de la planta utilizada es, preferentemente, las semillas.

El estado supercrítico de un fluido se define como el estado en que se encuentra este fluido cuando se somete a condiciones de temperatura y presión tales como la temperatura aplicada es superior a una temperatura crítica (Tc) y la presión aplicada es superior a una presión crítica (Pc), siendo estos valores críticos específicos de cada fluido.

- 50 Par el dióxido de carbono, la temperatura crítica Tc es igual a 31°C y la presión crítica Pc es igual a $7,38 \cdot 10^6$ Pa.

De acuerdo con una realización, el dióxido de carbono está en estado supercrítico a una temperatura comprendida de 35°C a 80°C, y una presión superior a $7,4 \cdot 10^6$ Pa.

- 55 Se define el estado subcrítico como el estado en el que se encuentra un fluido, cuando la temperatura a la que se somete es inferior a la temperatura crítica Tc (Tc=31°C para el dióxido de carbono), pudiendo ser la presión indiferentemente inferior o superior a la presión crítica (Pc= $7,38 \cdot 10^6$ Pa para el dióxido de carbono).

- 60 Las condiciones de temperatura y presión están adaptadas para poner el dióxido de carbono en el estado deseado, sin embargo, la presión puede tomar un valor que va hasta 300 veces la presión atmosférica (1 atm = $0,101 \cdot 10^6$ Pa), pero se utiliza preferentemente una presión comprendida entre $8 \cdot 10^6$ Pa y $30 \cdot 10^6$ Pa para una extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico, y comprendida entre $6,5 \cdot 10^6$ Pa y $10 \cdot 10^6$ Pa, para una extracción en estado subcrítico.

- 65 Ventajosamente, el dióxido de carbono está comprimido a una presión superior a $7,4 \cdot 10^6$ Pa, preferentemente, superior o igual a $18 \cdot 10^6$ Pa y de forma especialmente preferida, superior o igual a $25 \cdot 10^6$ Pa.

Más ventajosamente, la extracción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 35°C y 80°C.

Como medios opcionales y/o adicionales en un proceso de extracción de ese tipo, se pueden utilizar disolventes orgánicos como codisolventes o agentes de arrastre, para modificar la polaridad de la mezcla formada con el dióxido de carbono, reforzar la capacidad disolvente con respecto a determinadas moléculas poco o nada solubles en dióxido de carbono en estado supercrítico y/o para facilitar el arrastre de la mezcla formada.

Se cita como ejemplo el etanol como codisolvente de utilidad para modificar la polaridad de la mezcla con el dióxido de carbono, o bien de los ésteres de ácidos grasos tales como, por ejemplo, carbonato de dicarpililo (Cetiol CC®, Cognis GmbH), isononanoato de cetearilo Cetiol SN®, Cognis GmbH) o también el diglicéridos caprílico/cáprico (Mygliol 812®, Hüls AG), que se puede utilizar como agente de arrastre.

Cuando se utiliza uno de estos disolventes durante el procedimiento de extracción, su concentración es ventajosamente inferior o igual al 5% en peso con respecto al dióxido de carbono utilizado en la extracción.

Al finalizar la etapa de extracción propiamente dicha, una fase de reposo mediante disminución de la presión y opcionalmente de la temperatura, ocasiona el paso del dióxido de carbono del estado supercrítico al estado gaseoso, lo que permite eliminar completamente el dióxido de carbono del extracto obtenido. Durante esta etapa también se elimina el disolvente orgánico opcionalmente utilizado como agente de arrastre o de codisolvente.

El procedimiento de extracción puede completarse además mediante una etapa de eliminación parcial o total de los disolventes de extracción.

Esta etapa de secado consiste preferentemente en una operación de liofilización del extracto obtenido o en una etapa de calentamiento, ventajosamente al vacío.

Para mejorar el aspecto organoléptico del extracto, el procedimiento de obtención del extracto puede comprender ventajosamente además una etapa de desodorización y/o decoloración, mediante arrastre con vapor, mediante destilación molecular o decoloración con carbón activo.

El extracto de la invención se obtiene por puesta en contacto de las semillas de la planta *Kniphofia uvaria* con dióxido de carbono en estado supercrítico, en ausencia de codisolvente.

De acuerdo con un modo preferido, se utilizan semillas secadas previamente.

De acuerdo con una realización, la extracción se lleva a cabo con una temperatura comprendida entre 35°C y 80°C y, de forma especialmente preferida, de 60°C. Ventajosamente, la extracción de las semillas de la planta se realiza a temperatura de 60°C y a la presión de 290 bares (29.10⁶ Pa).

De acuerdo con una alternativa al proceso de extracción descrito anteriormente, el extracto de la invención se puede obtener sometiendo las semillas de la planta de un prensado mecánico. Este prensado se realiza en frío, preferentemente, en semillas no trituradas, que se pueden haber secado previamente.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un extracto vegetal de semillas de la planta *Kniphofia uvaria*, preferentemente un extracto oleoso de semillas, como principio activo y/o excipiente en una composición cosmética.

Este extracto es especialmente adecuado para uso cosmético, especialmente en composiciones cosméticas que comprenden al menos una fase grasa. Su consistencia le convierte en especialmente interesante para su uso como excipiente en composiciones cosméticas, especialmente, en las que comprenden al menos una fase grasa o están compuestos por una fase grasa.

De acuerdo con un segundo objeto, la invención se refiere a una composición cosmética o dermatológica que comprende el extracto anteriormente descrito y al menos un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable.

La composición comprende preferentemente una cantidad eficaz del extracto para obtener la eficacia buscada. De esta forma, la composición comprende preferentemente de 0,0001% a 10% en peso seco de extracto, preferentemente de 0,01% a 5% en peso, con respecto al peso total de la composición. Los porcentajes en peso seco se expresan sobre la base del peso del extracto sin incluir, o incluyendo solamente trazas, del disolvente de extracción.

A modo de ejemplo, el extracto vegetal lipófilo se puede incluir en la fase grasa de emulsiones de aceite en agua tales como las cremas de tratamiento de la piel, o en las fases grasas de composiciones de maquillaje tales como carmines de labios o máscaras.

Estas composiciones pueden comprender una fase acuosa o bien ser prácticamente anhidras, es decir, incluyendo solamente trazas de agua residual.

El extracto de la invención también puede asociarse a composiciones cosméticas o dermatológicas, con otros principios activos cosméticamente aceptables, en forma de moléculas purificadas y/o de extractos, especialmente de extractos vegetales, con efectos cosméticos similares y/o complementarios de los de dicho extracto de la invención.

- 5 Dichos principios activos se puede seleccionar entre sustancias que tengan una actividad aclarante de la piel; sustancias que tengan una actividad adelgazante; sustancias que tengan una actividad hidratante; sustancias que tengan una actividad calmante, calmante o relajante; sustancias que tengan una actividad

10 A modo de ejemplo, el extracto vegetal lipófilo se puede incluir en la fase grasa de emulsiones de aceite en agua tales como las cremas de tratamiento de la piel, o en las fases grasas de composiciones de maquillaje tales como carmines de labios o máscaras.

15 Estas composiciones pueden comprender una fase acuosa o bien ser prácticamente anhidras, es decir, incluyendo solamente trazas de agua residual.

El extracto de la invención también puede asociarse a composiciones cosméticas o dermatológicas, con otros principios activos cosméticamente aceptables, en forma de moléculas purificadas y/o de extractos, especialmente de extractos vegetales, con efectos cosméticos similares y/o complementarios de los de dicho extracto de la invención.

20 Dichos principios activos se puede seleccionar entre sustancias que tengan una actividad aclarante de la piel; sustancias que tengan una actividad adelgazante; sustancias que tengan una actividad hidratante; sustancias que tengan una actividad calmante, calmante o relajante; sustancias que tengan una actividad estimulante de la microcirculación cutánea para mejorar el brillo de la tez, en especial del rostro; sustancias que tengan una actividad reguladora del sebo para el cuidado de pieles grasas; sustancias destinadas a limpiar o purificar la piel; sustancias que tengan una actividad antirradicalaria; sustancias destinadas a atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento de la piel, en especial la formación de arrugas, mediante una actividad encaminada a favorecer el mantenimiento de la estructura de la piel y/o para limitar la degradación de la matriz extracelular de las capas superficiales de la dermis y epidermis y/o para obtener un efecto protector, corrector o de reestructuración de la piel; sustancias que tengan una actividad antiinflamatoria.

30 Ventajosamente, la composición de la invención comprende además al menos un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable que puede seleccionarse entre pigmentos, colorantes, polímeros, agentes tensoactivos, agentes de reología, perfumes, electrolitos, agentes de ajuste del pH, agentes antioxidantes, conservantes, y una cualquiera de sus mezclas.

35 La composición puede ser, por ejemplo, un sérum, una loción, una crema, una emulsión de aceite en agua, un hidrogel, una máscara, una emulsión de aceite en agua, o también presentarse en forma de una barrita, parche, o producto de maquillaje tales como carmines de labios, máscara o base de maquillaje.

40 El extracto también se puede utilizar en una composición dermatológica:

- para preservar la matriz extracelular de una degradación, especialmente acelerada por la radiación UV,
- para limitar el proceso de inflamación crónica dañina para la piel vinculada a las secreciones de las células sometidas a estrés por radicales libres endógenos o producidos por los rayos UV y/o senescentes,
- 45 - para calmar las pieles irritadas, por ejemplo, bajo el efecto de la radiación UV o el uso de alfa-hidroxiácidos, especialmente durante una exfoliación o un "peeling".

50 Finalmente, un cuarto objeto de la invención se dirige un método de tratamiento cosmético que comprende la aplicación en al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo que presenten signos del envejecimiento -como arrugas o laxitud- de una cantidad eficaz de una composición o de un extracto tales como se han definido anteriormente, para tratar los signos del envejecimiento intrínseco o extrínseco de la piel, o para tratar los problemas de sequedad cutánea vinculados con el envejecimiento que suponen una baja producción de lípidos, lo que contribuye a la perturbación de la función de barrera de la piel.

55 La invención tiene también por objeto una composición dermatológica para su uso en el tratamiento del proceso de inflamación crónica dañina para la piel vinculada a la secreción de células estresadas y/o senescentes, o en el tratamiento de la reactividad cutánea de las pieles sensibles y/o la irritación de la piel de un paciente.

60 La invención también se refiere a una composición dermatológica tal como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de los signos del envejecimiento intrínseco o extrínseco de la piel, y/o en el tratamiento de los procesos de inflamación crónica dañinos para la piel vinculados a las secreciones de las células sometidas a estrés y/o senescentes.

65 Ventajosamente, la composición dermatológica se aplica a una zona de la piel del cuerpo o del rostro que presenta signos visibles del envejecimiento tal como la presencia de arrugas o de pliegues, irritación, signos de inflamación, una pérdida de brillo de la tez, una pérdida de firmeza y/o de elasticidad de la piel u otros signos tales como una

disminución del espesor de la piel, un aumento de la sequedad o de la rugosidad cutánea.

Ventajosamente, la composición cosmética se aplica a una zona de la piel del cuerpo o del rostro que presenta signos perceptibles de incomodidad o sensibilidad.

5 Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán claramente a la luz de la descripción explicativa que sigue a continuación, hecha en referencia a los ejemplos de preparación del extracto y pruebas que ponen de manifiesto las propiedades del extracto y ejemplos de composición cosmética que utilizan dicho extracto, que se proporcionan como ilustración sin limitar sin embargo su alcance.

10 En los ejemplos, todos los porcentajes se proporcionan en peso, la temperatura es en grados centígrados, la presión es la presión atmosférica, salvo indicación en contrario.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de semillas de *Kniphofia uvaria*.

Preparación de extractos de la invención mediante un disolvente apolar.

20 Las semillas, recogidas de plantas de la especie *Kniphofia uvaria* se secaron y después se trituraron.

La materia vegetal resultante de esta trituración se extrajo mediante CO₂ en estado supercrítico, en ausencia de codisolvente.

25 Las condiciones del procedimiento de extracción son las siguientes:

Presión = 29 10⁶ Pa (290 bares)/Temperatura = 60°C (en estas condiciones de presión y temperatura, el dióxido de carbono está en estado supercrítico).

30 Se secó el extracto obtenido por destilación en el evaporador rotatorio, al vacío, a 50°C, en presencia de etanol (5% en peso con respecto al extracto).

El extracto obtenido (EXTRACTO 1) tras el secado era un aceite transparente de color naranja. El rendimiento de la extracción era del 25% en peso con respecto al material vegetal utilizado.

35 Preparación de extractos de la invención por prensado en frío.

Las semillas enteras y previamente secas se prensan mecánicamente en frío, mediante una prensa adaptada para este uso.

40 El aceite recogido se filtró.

Se le somete a una etapa de desodorización con vapor de agua, para mejorar sus propiedades organolépticas.

45 En los ejemplos siguientes, el término "extracto" utilizado en solitario se refiere a l extracto de la invención preparado según el ejemplo presente mediante uno u otro de los medios descritos.

Ejemplo 2 - Ensayos de actividad in vitro de un extracto de la invención

50 Marcadores MMP-2, MMP-9, pro MMP-1

1.1) *Actividades biológicas*

55 Antes del tratamiento, se preparó una solución madre del extracto del ejemplo 1 disuelto en DMSO a la concentración de 6,25 y 12,5 mg de extracto por ml de disolvente, o controles.

En el momento del tratamiento de las células con el extracto de la invención, la solución madre se diluyó al 1/1000^o en el medio de cultivo para alcanzar la concentración deseada.

60 Un extracto de *Anogeissus Leiocarpus* y resveratrol, del que se conoce la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas mediante fibroblastos en cultivo, se usaron como control positivos.

Los ensayos se realizaron sobre fibroblastos humanos normales (FHN).

65 Los FHN se sembraron a la densidad de 5000 células/pocillos y 200 µl/pocillos de medio de cultivo MEM (Gibco Invitrogen) complementado con glutamina (Gibco Invitrogen, concentración final 2 mM) y 10% de SFT (suero de feto

de ternera), en una microplaca de 96 pocillos (Falcon). La placa de cultivo se introdujo en la estufa durante 24 horas para obtener 80% de confluencia celular.

5 Las células se trataron con *Anogeissus Leiocarpus* a 25 µg/ml y un control disolvente (DMSO). También se preparó un control UV-B sometiendo los fibroblastos a UV-B, de manera que se validara la estimulación de la secreción de MMP por las células bajo la influencia de este factor.

10 El extracto de diferentes concentraciones, el control positivo y el control de disolvente, cada uno de ellos, se evaluó en 4 pocillos de FHN.

Después de 48 horas de tratamiento, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron a -20°C. Se utiliza la técnica inmunoenzimática del "sándwich", que permite dosificar en los sobrenadantes, por medición espectrofotométrica a 450 nm, las cantidades respectivas de MMP-2, MMP-9 y pro-MMP-1. Las dosificaciones de MMP-2, 9 y pro MMP-1 se realizan según los protocolos descritos en los kits Quantikine (R&D Systems).

15 **1.2) Resultados**

Los resultados se presentan en las tablas siguientes

20 **Tabla 1: Dosis MMP-9**

	T DMSO	T+UVB	T+	EXTRACTO 1	EXTRACTO 1
Dosis (µg/ml)				6,25	12,5
media (ng MMP-9/µg prot)	0,0202	0,0539	0,0251	0,0449	0,0369
desviación típica	0,0005	0,0017	0,0010	0,0046	0,0003
% inhibición			53,46	16,73	31,52

Leyendas de la tabla:

25 *T DMSO = control disolvente de disolución, (DMSO),*
T+UVB = control positivo de estimulación con UVB que produce un aumento del índice de MMP-9,
T+ = control positivo de la prueba (anogelina),

Tabla 2: Dosis MMP-2

	T DMSO	T+	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml
media (ng MMP-2/µg prot)	0,1437	0,0416	0,1281	0,1215
% inhibición		71,07	10,86	15,44

30 **Tabla 3: Dosis pro MMP-1**

	T DMSO	T+UVB	T+	12,5 µg/ml
med (ng MMP1/µg prot)	0,0196	0,0291	0,0137	0,0017
% inhibición			52,8	94,1

1.2) Conclusiones

35 MMP-2 se expresa en los fibroblastos durante el desarrollo y la regeneración tisular. Con la MMP-9, esta proteína degrada el colágeno tipo IV, compuesto principal de las membranas basales y de la gelatina (colágeno desnaturalizado). También puede degradar otros tipos de colágenos (V, VII y X) tales como enastila y fibroblastos. Los sustratos de MMP-9 pueden ser colágenos nativos tipo IV, V, VII, X y XI, la fibronectina. La MMP-1 es una enzima mayor implicada en la degradación de la matriz extracelular. A diferencia de MMP-2, la producción de MMP-1 está controlada por el factor de transcripción AP-1, que está directamente afectado por los estreses ambientales, como la radiación UV, que aceleran el envejecimiento cutáneo.

40 El tratamiento de las células mediante una solución del extracto de semillas de *Kniphofia uvaria* ha permitido inhibir significativamente la secreción de metaloproteinasas y de Pro-MMP1.

45 Derivado de esta actividad del extracto de la invención, es interesante usarlo en composiciones cosméticas para limitar los efectos del envejecimiento cutáneo, especialmente provocado o acelerado por la radiación UV, y contribuir así a limitar el proceso de inflamación crónica dañino para el tejido vinculado a las secreciones de las células

sometidas a estrés y/o senescentes.

2) Ligando de PPAR

5 2.1) Protocolo

El ensayo se lleva a cabo sobre una línea celular transfectada estable (Seimandi et al., Analytical Biochemistry, 2005, 344, 8-15) que tiene un sistema indicador PPAR β/δ , que expresa una proteína quimérica que contiene el dominio de unión al ligando del PPAR β/δ humano fusionado con el dominio de unión al ADN del factor de transcripción de levadura GAL-4 (DBD).

El gen indicador de la luciferasa está bajo el control de un pentámero de la secuencia de reconocimiento GAL-4 situado antes del promotor de la β -globulina. (Normand et al., Proceedings MipTec - The 9th International Conference and Exhibition on Drug Discovery, 08.05.2006 - 11.05.2006, P 105).

Los compuestos se sometieron a ensayos en placas de 96 pocillos en los que se sembraron las células. Estas se incubaron durante 24 horas con el activo probado. Las células se llevaron a una confluencia superior al 80%. El extracto del ejemplo 1 se disolvió en DMSO y después se diluyó en el medio de cultivo para alcanzar la concentración buscada. Se midió la actividad luciferasa por luminiscencia. La selectividad de los compuestos para los receptores PPAR se determina por comparación con un patrón y un control negativo (DMSO al 0,1%).

Para determinar la actividad del extracto de la invención sobre los subtipos de receptores PPAR, se realizó seguimiento de la luciferasa por luminiscencia, correspondiente a la activación del PPAR β/δ . Los valores obtenidos se expresaron en % de actividad luciferasa del ligando probado en comparación con la actividad de un agonista de referencia fijado al 100% (L16541 1 μ M, TEBU-BIO).

2.2) Resultados

Para el extracto de *Kniphofia uvaria* del ejemplo 1, el ensayo proporcionó los valores de actividad siguientes:

- a 10 μ g/ml en el medio de cultivo: la respuesta representa un 14% del efecto del control positivo (100% agonista).
- a 30 μ g/ml en el medio de cultivo: la respuesta representa 37% del efecto del control positivo.
- a 50 μ g/ml en el medio de cultivo: la respuesta representa un 43 % del efecto del control positivo (100% agonista).

2.3) Conclusiones

Los receptores activados por los proliferadores de los peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Los PPAR se fijan en una región específica del ADN situada en la región reguladora de genes diana, principalmente involucrados en el metabolismo de los lípidos. El PPAR β/δ representa el isotipo predominante en la epidermis humana, con una fuerte tasa de los queratinocitos (Girroir et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2008, 371, 456-461).

Como se explica en la introducción, los PPAR ejercen un papel capital en la fisiología de la epidermis, en particular, en lo que respecta a su calidad de función barrera y su papel regulador del estado inflamatorio y por tanto, es también muy interesante identificar agonistas de estos receptores.

El aceite de *Kniphofia* es un potente agonista de origen vegetal de los PPAR β/δ , con un efecto dependiente de la dosis.

Esta actividad con respecto a los receptores PPAR convierte este extracto en útil en cosmética en aplicaciones destinadas a tratar trastornos cutáneos, en especial los problemas de sequedad cutánea, opcionalmente vinculados con el envejecimiento, que suponen una baja producción de lípidos que contribuye a la perturbación de la función de barrera de la piel (Ghadially R. et al, J. Clin. Invest., 1995, 95, 2281-2290, Seyfarth F. et al., Clinics Dermatol., 2011, 29, 31-36).

El potencial antiinflamatorio de este extracto, agonista de PPAR β/δ , permite estudiar además su utilización como principio activo, especialmente para modular la reactividad cutánea de las pieles sensibles, para calmar las pieles irritadas, por ejemplo, por los efectos de los UV, o también para limitar el ciclo dañino de microinflamación crónica que inician las pieles senescentes en las pieles envejecidas.

Ejemplo 3 - Efecto del tratamiento de fibroblastos humanos normales con el extracto de la invención sobre la expresión génica.

El fin de este estudio era estudiar la actividad biológica de un extracto de la invención, sobre la expresión de genes que codifican las proteínas implicadas en los procesos biológicos relacionados con el envejecimiento cutáneo o el

estado de hidratación de piel en un cultivo de fibroblastos humanos normales (FHN) cultivados en monocapa.

La tecnología TLDA, que son las siglas de Taqman Low density Array, permite el estudio de la modulación de la expresión de un panel de genes, que codifican proteínas específicas de rutas biológicas relacionadas con los fibroblastos, en respuesta a un tratamiento con una duración de 24 h mediante el extracto obtenido en el ejemplo 1 (EXTRACTO 1).

1. Materiales y métodos

10 Cultivo celular

Los fibroblastos humanos normales (FHN), procedentes de un donante adulto caucásico, se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de $2.5 \cdot 10^4$ células/pocillos en el medio 1 de con la siguiente composición:

<u>Medio 1</u>		
	<i>Proveedor</i>	<i>Concentración final</i>
SVF	Biowest	10%
DMEM	Fisher	cs

15 Se sembraron tres pocillos de FHN para cada condición de cultivo.

24 horas antes del tratamiento, en la confluencia, las células pasaron a privación de suero de feto de ternera (medio 2) de la composición siguiente:

<u>Medio 2</u>	
	<i>Proveedor</i>
DMEM	Fisher

2. Tratamiento

Después de 24 horas de cultivo sin suero de feto de ternera, las células se trataron con el EXTRACTO 1 de la invención, a un 0,1% en peso en medio 2. Después de 24 horas de tratamiento, las células se recuperaron para extraer el ARN total.

También se analizó un control no tratado realizado en las mismas condiciones.

30 **3. PCR Taqman con matriz de baja densidad**

3.1 Obtención de los ARN totales

35 Se eliminó el medio de cultivo celular, y se añadieron 250 μ l de tampón de lisis RLT (suministrado en el kit Nucleospin RNA). Las células se rasparon con un *Cell Scraper* y posteriormente el lisado celular, recupero en un pocillo de 1,2 ml de profundidad (suministrado en el kit). Los ARN totales se extrajeron mediante un Epimotion 5075 (Eppendorf) con el kit Nucleospin RNA trace (Macherey Nagel).

40 Las soluciones de ARN totales obtenidas se dosificaron, y se comprobó su calidad, mediante el Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Este aparato esta conectado a un ordenador que tiene el programa informático específico para análisis de los resultados (programa informático 2100 expert). La técnica necesita una microplaca de 12 pocillos (RNA 6000 NanoChips) y un kit de reactivos (RNA 6000 Nano Reagents & Supplies), específicos de la dosificación de los ARN totales eucariotas

45 3.2 Síntesis de los ADN complementarios

El kit de transcripción inversa (RT) utilizado era el kit de transcripción High Capacity cDNA (APPLIED IOSYSTEMS). 100 ng de ARN totales, se diluyeron en agua para obtener un volumen final de 50 μ l. A continuación se incubaron durante 10 minutos a 25°C después 2 horas a 37°C con 50 μ l de mezcla de reacción del kit de transcripción inversa High capacity 2X previamente preparado como se indica a continuación.

<i>Reactivos</i>	<i>volumen</i>
<i>tampón RT</i>	10 μ l
<i>tampón dNTP</i>	4 μ l
<i>Cebador aleatorio</i>	10 μ l
<i>RNAse out</i>	1 μ l
<i>TA</i>	5 μ l

<i>Reactivos</i>	<i>volumen</i>
<i>H₂O</i>	<i>20 µl</i>

3.3 PCR Taqman con matriz de baja densidad

5 Se tomaron 50 µl de cada RT y se mezclaron con 50 µl de "Taqman Gene Expression master mix". Tras la homogeneización, los 100 µl se depositaron sobre tarjetas de microfluidos, estas últimas se centrifugaron y posteriormente se sellaron.

10 Se utilizaron genes de control para la normalización de los resultados. La PCR se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por Applied Biosystems en el sistema de detección del aparato ABI Prism 7900HT Sequence. Las etapas de la qPCR fueron 2 min a 50°C, 10 min a 94,5°C después 30 s a 97°C y 1 min a 59,7°C para 40 ciclos.

3.4 Análisis de los resultados

15 En el método de RT-PCR TLDA, la cuantificación se realiza usando el método comparativo de ΔCt. Este método determina el número de ciclos (CT) de cada gen en la tarjeta utilizando el programa informático RQ Manager que tiene en cuenta el ruido de fondo para cada gen. Este número de ciclos (Ct) se normalizaron con respecto al Ct de un gen constitutivo GAPDH invariante de las células.

4. Resultados

20 El análisis realizado sobre diferentes genes implicados en los procesos relacionados con el envejecimiento cutáneo, la hidratación de la piel o el mantenimiento de su elasticidad y de su firmeza se estudiados por el método descrito a continuación.

25 Metaloproteinasa 1 (MMP-1)

30 La metaloproteinasa 1 (MMP-1) actúan en la degradación de los colágenos y más particularmente de los colágenos 1 y 3. Se induce especialmente durante el envejecimiento cutáneo y en respuesta a la exposición al UV. Por tanto, es estratégico desear inhibir la expresión de esta proteína, de forma que se controle la degradación de la matriz extracelular dérmica. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los FHN con el extracto de la invención permite disminuir significativamente (- 84%) la expresión de la MMP-1 después de 24 horas de tratamiento, con respecto al control.

35 El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de esta metaloproteinasa es especialmente interesante para prevenir o ralentizar el envejecimiento cutáneo, limitando la degradación de la MEC.

Proteína relacionada con el receptor de proteína de baja densidad 1 (LRP-1).

40 El tratamiento de los FHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+190%) la expresión de la proteína codificada por el gen LRP-1 con respecto al control.

Este gen LRP-1 codifica un receptor del LDL, descrito por tener una acción en la endocitosis de los MMP en exceso en el espacio pericelular.

45 El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de este gen es, por tanto, especialmente interesante para prevenir o ralentizar el envejecimiento cutáneo, actuando positivamente sobre la degradación de la MEC.

Elastina (ELN)

50 El tratamiento de los FHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+135%) la expresión de la tropoelastina codificada por el gen ELN con respecto al control.

El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de este gen es, por tanto, especialmente interesante para prevenir o ralentizar el envejecimiento cutáneo, actuando positivamente sobre la síntesis de elastina.

55 Colágeno 1A1

El tratamiento con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+103%) la expresión del colágeno 1A1 por estimulación del gen COL A1A.

60 El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de este gen es, por tanto, especialmente interesante para prevenir o ralentizar el envejecimiento cutáneo, actuando positivamente sobre la síntesis de colágeno en la matriz extracelular.

Ejemplo 4 - Efecto del tratamiento de queratinocitos humanos normales con el extracto de la invención sobre la expresión génica.

5 El fin de este estudio era estudiar el efecto de un extracto de la invención, sobre la expresión de genes que codifican las proteínas implicadas en procesos relacionados con el envejecimiento o la hidratación de la piel.

1. Cultivo celular

10 Los queratinocitos humanos normales (KHN) procedentes de un donante adulto caucásico se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de $2.5 \cdot 10^4$ células/pocillos en medio 1. Se sembraron tres pocillos de KHN para cada condición de cultivo, y esto para un tratamiento de 8 horas.

2. Tratamiento

15 Al 80 % de confluencia, las células se trataron con el extracto de la invención del ejemplo 1, a un 0,1% en peso en el medio 1 siguiente:

	<i>Proveedor</i>
Epilife	Fisher
Complementos	Fisher

20 Después de 24 horas de tratamiento, las células se recuperaron para extraer el ARN total.

3. PCR Taqman con matriz de baja densidad

El protocolo es idéntico al descrito en el ejemplo anterior.

4. Resultados

25 Como en el ejemplo anterior, el análisis se realiza sobre genes implicados en la expresión de proteínas implicadas en procesos relacionados con el envejecimiento cutáneo, la hidratación de la piel o el mantenimiento de su elasticidad y de su firmeza.

30 TIMP-2

35 Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los KHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+ 30%) la expresión de las proteínas inhibitoras de la metaloproteinasas de tipo 2 después de 24 horas de tratamiento, con respecto al control.

40 Esta proteína inhibe principalmente las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9. El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de esta metaloproteinasas es especialmente interesante para prevenir o ralentizar el envejecimiento cutáneo, limitando la degradación de las fibras elásticas de la Matriz Extracelular (MEC).

Colágeno 4A1

45 Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los KHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+ 39%) la expresión del colágeno de tipo 4. Este colágeno desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la unión dermoepidérmica.

50 El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de este colágeno es especialmente interesante para mantener la integridad de la matriz extracelular (MEC) y luchar de esta forma contra los efectos del envejecimiento de la piel.

Aceptoras 3

55 Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los KHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+ 160%) la expresión de acuaporina de tipo 3. Este colágeno desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la unión dermoepidérmica.

El efecto del extracto de la invención sobre la expresión de esta acuaporina en los queratinocitos permite favorecer la transferencias de agua celular y mejorar el estado de hidratación de las capas superficiales de la piel.

60 Hialuronano sintasa 3

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los KHN con el extracto de la invención permite

aumentar significativamente (+ 240%) la expresión de la proteína codificada por el gen HAS3. Esta enzima está implicada en la síntesis de ácido hialurónico, que desempeña un papel importante en el mantenimiento del estado de hidratación de las células cutáneas.

5 CD-44

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de los KHN con el extracto de la invención permite aumentar significativamente (+45%) la expresión de este receptor de ácido hialurónico. Este efecto significativo permite mejorar o mantener el estado de hidratación de las células cutáneas tratadas con un extracto de la invención.

Ejemplo 5 - Crema para el rostro

15 El extracto de semillas de *Kniphofia uvaria* se obtuvo reproduciendo el procedimiento del ejemplo 1. Se realizó además sobre el EXTRACTO 1, una etapa adicional de desodorización por arrastre con vapor, para mejorar las características organolépticas del extracto utilizado en la composición cosmética siguiente.

20 Se usó una solución del extracto como principio activo para la preparación de la composición cosmética siguiente (% expresado en peso con respecto a la composición final):

<u>Fase A</u>	
Fenoxietanol	0,5
Goma xantana	0,2
Polímeros reticulados de acrilato/acrilato de alquilo C20-30	0,2
EDTA tetrasódico	0,1
Agua	cs
cs: cantidad suficiente para solubilizar los compuestos de la fase A.	
<u>Fase B</u>	
Extracto de <i>Kniphofia uvaria</i> de acuerdo con la invención	1
Poliisobuteno hidrogenado	4
Escualano	3
Triglicérido caprílico/cáprico	3
Pentilenglicol	3
Estearato de glicerilo	3
Estearato PEG-100	2,5
Cera de abeja	1,5
Carbonato de dicaprililo	1,5
Alcohol cetílico	1
Alcohol estearílico	1
Dimeticona	1
<u>Fase C</u>	
Hidróxido de sodio	0,04
Agua	cs 100
cs 100: cantidad suficiente para el 100% de la composición final	

Los excipientes de la fase A se dispersaron en agua, después se calentaron a 80°C.

25 Los componentes de la fase B, incluido el extracto de *Kniphofia uvaria*, se calentaron a 85°C para formar una fase homogénea. Se emulsionó la fase B en la fase A con un mezclador Ystral.

La emulsión de aceite en agua sí obtenida finalmente se neutralizó mediante una solución acuosa de hidróxido de sodio al 0,04 % p/p (fase C), y después se enfrió.

30 La composición obtenida se puede utilizar como crema destinada a su aplicación sobre todo o parte del rostro.

Esta crema permite obtener un efecto de prevención o retardo del envejecimiento cutáneo, y también produce igualmente un efecto de calmar la piel con respecto a las especies que producen un efecto inflamatorio en la piel.

35 Se reproduce la fórmula sustituyendo el EXTRACTO 1 por el EXTRACTO 2 obtenido por prensado. La composición presenta el mismo aspecto que la preparada anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de semillas de la planta *Kniphofia uvaria* obtenido
 - 5 - por prensado mecánico en frío de dichas semillas, o
 - por puesta en contacto de dichas semillas con dióxido de carbono en estado supercrítico como disolvente, en ausencia de codisolvente, dicha puesta en contacto va seguida de la eliminación de dicho disolvente.
- 10 2. Extracto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el dióxido de carbono en estado supercrítico tiene una temperatura comprendida de 35°C a 80°C, y una presión superior a $7,4 \cdot 10^6$ Pa.
3. Extracto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el prensado mecánico se realiza en frío sobre semillas enteras no previamente trituradas.
- 15 4. Composición cosmética o dermatológica que comprende el extracto tal como se define en una de las reivindicaciones anteriores y al menos un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable seleccionado entre pigmentos, colorantes, polímeros, agentes tensioactivos, agentes de reología, perfumes, agentes de ajuste del pH, agentes antioxidantes, conservantes, y una cualquiera de sus mezclas.
- 20 5. Composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado por que** comprende de 0,0001% a 10% en peso seco, de extracto con respecto al peso total de la composición.
- 25 6. Utilización de una composición cosmética de al menos un extracto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3,
 - como agente destinado a prevenir o retrasar la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo provocado o acelerado por radiación UV, y/o
 - como agente mejorador de la elasticidad o la firmeza de la piel, y/o
 - 30 - como agente hidratante.
7. Composición dermatológica que contiene al menos un extracto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso:
 - 35 - para preservar la matriz extracelular de una degradación acelerada por la radiación UV,
 - para calmar las pieles irritadas bajo el efecto de la radiación UV o el uso de alfa-hidroxiácidos durante una exfoliación o un "peeling".
- 40 8. Composición dermatológica que contiene al menos un extracto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento del proceso de inflamación crónica dañina para la piel vinculada a la secreción de células estresadas y/o senescentes, o en el tratamiento de la reactividad cutánea de pieles sensibles.
- 45 9. Método de tratamiento cosmético para tratar los signos del envejecimiento intrínseco o extrínseco de la piel que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de una composición como se define en una de las reivindicaciones 4 o 5 sobre al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo que presenten signos del envejecimiento tales como las arrugas, una laxitud, una pérdida de brillo de la tez, una pérdida de firmeza y/o elasticidad de la piel, una disminución del espesor de la piel, un aumento de la sequedad o un aumento de la rugosidad cutánea.
- 50 10. Método de tratamiento cosmético para tratar los problemas de sequedad cutánea vinculados con el envejecimiento, que suponen una baja producción de lípidos que contribuye a la perturbación de la función de barrera de la piel, que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de una composición como se define en una de las reivindicaciones 4 o 5 sobre al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo que presenten signos del envejecimiento tales como las arrugas, una laxitud, una pérdida de brillo de la tez, una pérdida de firmeza y/o elasticidad de la piel, una disminución del espesor de la piel, un aumento de la sequedad o un aumento de la rugosidad cutánea.