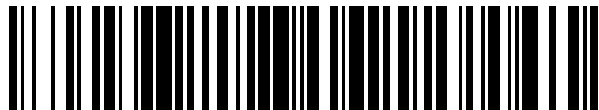


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 466**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 8/92** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2014 PCT/EP2014/071009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2014 E 14780462 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 3052199**

54 Título: **Utilización de una composición oleosa que contiene un extracto de Hemerocallis para mejorar la firmeza de la piel**

30 Prioridad:

**02.10.2013 FR 1359549**

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

**22.03.2018**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DE RECHERCHE COSMÉTIQUE  
S.À.R.L. (100.0%)  
4 Place de Paris  
2314 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**LECONTE, NADINE y  
ROSSIGNOL-CASTERA, ANNE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 660 466 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

Utilización de una composición oleosa que contiene un extracto de Hemerocallis para mejorar la firmeza de la piel

5 La presente invención se refiere al campo técnico general de los productos cosméticos para uso tópico, utilizables en particular sobre la piel.

10 Más precisamente, la presente invención se refiere a la utilización de una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de Hemerocallis como ingrediente activo para la preparación de una composición cosmética para uso tópico destinada a mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel, a un procedimiento cosmético no terapéutico para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel que utiliza tal composición cosmética, así como a la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que comprende un extracto lipófilo de Hemerocallis para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.

15 La piel es un verdadero órgano que comprende varias capas integradas, que van desde la capa superficial, la epidermis, hasta las capas más profundas, la dermis y la hipodermis, y cada una de estas capas posee unas propiedades específicas que permiten al conjunto reaccionar y adaptarse a las condiciones de su entorno.

20 La hipodermis, que es la capa más profunda de la piel, contiene los adipocitos que producen los lípidos para que el tejido subcutáneo fabrique una capa grasa que proteja los músculos, los huesos y los órganos internos contra los choques.

25 La epidermis está principalmente compuesta de queratinocitos (el 90% de las células epidérmicas) que sintetizan la queratina, de melanocitos (del 2 al 3% de las células epidérmicas) responsables de la pigmentación de la piel, y las células de Langerhans, que tienen un papel inmunológico. La epidermis, cuyo grosor es variable según las diferentes partes del cuerpo, constituye la capa externa de la piel y, en consecuencia, tiene un papel fundamental para asegurar la protección y el mantenimiento de una buena troficidad.

30 La dermis es un tejido conjuntivo que forma una capa más gruesa que la de la epidermis, rica en nervios, en vasos sanguíneos y en glándulas sudoríparas. Se compone de 2 regiones:

35 - la zona superficial: entre las crestas epidérmicas, o "dermis papilar" formada de tejido conjuntivo laxo. La zona superficial contiene en primer lugar unas fibras de colágeno, finas, aisladas y orientadas, pero también las asas de capilares terminales y las terminaciones nerviosas;

40 - la zona más profunda: o "dermis reticular" está formada de un tejido conjuntivo denso en el que las fibras de colágenos más gruesas en haces y las fibras elásticas se entrecruzan en todas las direcciones en los planos aproximadamente paralelos a la superficie cutánea. La dermis reticular contiene también pequeñas arteriolas y vénulas, pequeños nervios de los folículos pilo-sebáceos.

La dermis comprende:

45 - unas macromoléculas de tipo proteico, en particular unas fibras de colágeno, elastina y fibronectina, que confieren a la piel flexibilidad, elasticidad y asentamiento;

- unos mucopolisacáridos, tipo de gel en el que se bañan las macromoléculas – este "gel" está formado de glicosaminoglicanos, proteínas que, a modo de una esponja, captan el agua en la dermis y actúan así como reserva de hidratación;

50 - diversas células, entre ellas los fibroblastos, que participan en la síntesis de las macromoléculas y las células del sistema inmunitario (linfocitos mastocitos, macrófagos tisulares).

55 La red elástica de la dermis comprende 3 grandes tipos de fibras: las fibras de oxitalan, las fibras de elaunina, y las fibras elásticas propiamente dichas, maduras. Las fibras de oxitalan están situadas en la dermis papilar. Forman unas finas arborizaciones perpendiculares a la unión dermo-epidérmica (JDE). Las fibras de oxitalan de la dermis papilar están exclusivamente constituidas de microfibrillas. Las fibras de elaunina son unas fibras elásticas inmaduras, más cortas y menos anchas que las fibras elásticas maduras y con unas zonas amorfas menos desarrolladas que las zonas fibrilares. Finalmente, las "fibras elásticas" están situadas a nivel de la dermis reticular, unos septos interlobulares de la hipodermis, con un refuerzo alrededor de los folículos pilosos, unas glándulas sebáceas y unas glándulas sudoríparas. Están principalmente constituidas de elastina y se presentan como unos haces ondulados situados entre las fibras de colágeno.

65 Las fibras de colágeno, que representan el 70% del peso seco de la dermis, aseguran la resistencia mecánica y la textura de la piel, la elastina es responsable de la elasticidad, los proteoglicanos tienen un papel importante de estructura y de hidratación de la piel, y las glicoproteínas, tales como la fibrilina y los filamentos de vimentina, están altamente implicadas en el mantenimiento de la elasticidad y en la organización de la contracción y de la cohesión

de la dermis.

Más particularmente, la fibrilina (o fibrilina-1) es una glicoproteína de 340 kDa. Las fibras de oxitalan son unas fibras muy ricas en fibrilina-1. Estas fibras tienen un papel crucial en el mantenimiento de las funciones de la dermis (función de soporte) y permiten a la dermis aportar a la piel firmeza, elasticidad y flexibilidad. Sin embargo, varios factores, tales como la formación de metilglioxal, son capaces de degradar esta red elástica. Su importancia en el ensamblaje y la funcionalidad de la red elástica, hacen de la fibrilina-1 un biomarcador muy utilizado en búsqueda dermo-cosmética para estudiar el estado estructural de la matriz extracelular de la dermis.

La vimentina es una proteína esencial del citoesqueleto del fibroblasto. Tiene un papel capital en la organización de la contracción y de la cohesión de la dermis, y organiza las fibras de colágeno. Permite al fibroblasto conservar una buena contractilidad, lo que es característica de un fibroblasto joven. Tiene también un papel importante en numerosos metabolismos celulares (desplazamiento celular, división, cicatrización, etc.). La vimentina pertenece a unos filamentos intermedios que constituyen, con los microtúbulos y los microfilamentos de actina, el citoesqueleto. El citoesqueleto de una célula es el conjunto organizado de los polímeros biológicos que le confieren el esencial de sus propiedades mecánicas (contractilidad, elasticidad, mantenimiento de su forma y de su estructura interna, etc.). La vimentina está unida al núcleo, al retículo endoplásmico así como a las mitocondrias. Tiene por lo tanto un papel importante en el soporte y el anclaje de la posición de los orgánulos dentro del citoplasma. Esta molécula es responsable del mantenimiento de la forma celular y de la integridad del citoplasma. Se ha demostrado que la vimentina es una diana principal de los productos finales de la glicación: los AGE (*Advanced Glycation End products*). Los AGE formados por el MG y acumulados sobre la vimentina provocan su agregación, reducen las capacidades contráctiles de la célula y desorganizan la red de las fibras de colágeno (*Kueper et al., 2007*) – Publicación consultable en anexo).

El envejecimiento de la piel puede ser extrínseca, es decir, provocada por el entorno, incluyendo las agresiones climáticas, que pueden contribuir en particular a acelerar la degradación del colágeno de la dermis, y en particular la exposición al sol, las variaciones de temperaturas, pero también intrínseca, en particular derivar de la formación de metilglioxal, que es un subproducto de diferentes vías metabólicas, tales como la glicólisis y la peroxidación de los lípidos y cuya presencia conlleva una degradación de la red elástica de la dermis (glicación de las proteínas).

Los productos de origen natural o que contienen unos compuestos naturales son, por otro lado, cada vez más apreciados por los consumidores de productos cosméticos. Es por ello que se encuentran en el mercado unos productos cosméticos que contienen cada vez más sustancias naturales o de origen natural.

Tales composiciones contienen clásicamente al menos una sustancia anti-oxidante, en particular unas moléculas complejas de origen vegetal tales como, por ejemplo, los polifenoles, los flavonoides, los antocianósidos, los carotenoides, etc. Otros extractos vegetales tales como los procedentes del árbol de seda (*Albizia julibrissin*), de café, gracias a su composición fenólica, o también la fracción etanólica de melisa tienen una acción sobre la glicación de las proteínas.

Estas células no son, sin embargo, siempre lo suficientemente estables en el tiempo y pierden así progresivamente su eficacia.

Existe por lo tanto una necesidad para unas composiciones cosméticas que contienen un extracto vegetal de origen natural que tienen la capacidad de disminuir, al menos en parte y de manera estable en el tiempo, la glicación de las proteínas e inhibir, al menos en parte y de manera estable en el tiempo, los efectos nefastos de la acumulación de metilglioxal en las células de la piel, en particular la pérdida de elasticidad o de firmeza de la piel.

Hemerocallis es el nombre común dado a la flor del género *Hemerocallis* que pertenece a la familia de las liliáceas.

Se denomina también lis de un día. En efecto, debe su nombre al griego ἡμέρα (Hemera) “día” y καλός (kalos) “belleza”. Se denomina lis de un día porque su flor es efímera y se parece a la lis, pero el follaje es totalmente diferente. La flor de la Hemerocallis vive sólo un día, pero aparecen nuevas flores durante varias semanas. Las flores se marchitan al final del día y dejan lugar a otras al día siguiente por la mañana.

Las Hemerocallis son conocidas y cultivadas desde hace siglos. Originarias de Asia, las primeras especies ya se cultivaban, describían y pintaban en la época de Confucio (551 – 479 antes de cristo).

*Hemerocallis fulva* se conoce, en particular en medicina tradicional china, por sus efectos calmantes, cicatrizantes y bactericidas. Se utiliza también en el tratamiento de la depresión, de la inflamación, del insomnio y de los furúnculos.

En particular, la solicitud de patente US2011/0076349 describe una composición a administrar por vía oral que contiene, como principio activo, un extracto acuoso de las partes aéreas de *Hemerocallis fulva* y que tienen unos efectos antidepresivos o relajantes basados en la mejora del sueño.

Los estudios efectuados por la solicitante han mostrado que un extracto oleoso de Hemerocallis, más precisamente

de *Hemerocallis fulva*, permite paliar, al menos en parte, los efectos nefastos de la acumulación de metilgloxal en la dermis y así i) mantener la calidad y la cantidad de fibrilina-1 y por lo tanto la funcionalidad de la elastina y ii) proteger los fibroblastos frente a la glicación de la vimentina y así participar en el mantenimiento de sus funcionalidades, en particular de sus propiedades contráctiles.

5 La presente invención tiene por lo tanto como primer objeto la utilización, como ingrediente activo, de una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y de un vehículo oleoso que comprende al menos un aceite vegetal (aceite vector), para la preparación de una composición cosmética para uso tópico destinada a mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.

10 La invención tiene también por objeto un procedimiento cosmético no terapéutico para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tópica que contiene una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y de un vehículo oleoso que comprende al menos un aceite vegetal.

15 Finalmente, la invención tiene también por objeto la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que contiene una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y de un vehículo oleoso que comprende al menos un aceite vegetal, para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.

20 Según la invención, el contenido en composición oleosa en la composición cosmética puede variar del 0,01 al 50% en masa, preferentemente del 0,1 al 10% en masa y aún más preferiblemente del 0,5 al 4% en masa con respecto a la masa total de la composición cosmética.

25 Las composiciones cosméticas para aplicación tópica que comprenden tal composición oleosa como ingrediente activo presentan excelentes propiedades anti-glicación utilizables en cosmética para mejorar la firmeza de la piel y/o su elasticidad, en particular disminuyendo o inhibiendo los efectos nefastos de la formación de metilgloxal sobre algunas proteínas estructurales de la dermis tales como la fibrilina-1 y la vimentina, siendo estas propiedades particularmente marcadas cuando la cantidad de composición oleosa es del orden del 1% en masa con respecto a la masa total de la composición cosmética. En efecto, la composición oleosa conforme a la invención está compuesta de una combinación de antioxidantes que actúan de manera sinérgica contra los fenómenos oxidativos a los que se exponen las células cutáneas, en particular contra la glicación de las proteínas. Aporta a la piel al mismo tiempo unos antioxidantes apolares tales como la vitamina E y unos carotenoides (luteína, zeaxantina), pero también unos antioxidantes más polares tales como los polifenoles, incluyendo los ácidos clorogénicos en cantidad importante. Esta combinación de agentes antioxidantes, transportados por el o los aceites vegetales del vehículo oleoso, es particularmente estable en el tiempo y eficaz para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.

35 Además, a las dosis utilizadas, los ensayos efectuados han mostrado que la composición oleosa utilizada en la presente invención no presenta ninguna citotoxicidad.

40 Los estudios efectuados por la solicitante han mostrado que se pueden utilizar todas las partes aéreas de la planta, tanto los tallos, las hojas como las flores. La especie *Hemerocallis fulva* está fácilmente disponible y la conservación de las plantas no plantea generalmente dificultad técnica.

45 La composición oleosa conforme a la invención se puede preparar según el procedimiento de extracción descrito en la solicitud internacional WO 2010/112760 que consiste, en una primera etapa, en mezclar e impregnar la planta, previamente seca y triturada, en al menos un aceite vegetal natural a una temperatura superior a su punto de fusión, después en calentar la mezcla a alta temperatura durante un tiempo muy corto, y en formar una microdispersión a una temperatura superior a la temperatura de fusión del aceite vegetal. Todas estas etapas se realizan preferiblemente protegidas del aire, más particularmente protegidas del oxígeno, para evitar cualquier reacción de oxidación del extracto. Se puede trabajar, por ejemplo, bajo atmósfera de nitrógeno, en un reactor cerrado con extracción continua del oxígeno por un flujo de nitrógeno, o también al vacío.

50 Los aceites vegetales naturales utilizables en este procedimiento se seleccionan preferiblemente entre el aceite de aguacate, el aceite de rosa mosqueta, el aceite de avellana, el aceite de colza, el aceite de macadamia, el aceite de argán, el aceite de girasol, el aceite de camelina, el aceite de borraja, el aceite de almendra dulce, el aceite de cártamo, el aceite de calófilo y sus mezclas.

55 Según una forma de realización preferida de la invención, el aceite vegetal se selecciona entre el aceite de aguacate, el aceite de rosa mosqueta y sus mezclas.

60 Según una forma de realización muy particularmente preferida de la invención, el vehículo es una mezcla de aceite de aguacate y de aceite de rosa mosqueta.

65 Los aceites vegetales utilizados según la invención, y en particular los aceites de aguacate y de rosa mosqueta, son unos productos disponibles en el comercio.

El aguacate es el fruto del aguacate (*Persea americana*), un árbol originario de América del Norte (Méjico), rico en ácido oleico, en carotenoides y en elementos nutritivos, el aceite de aguacate se extrae de la pulpa del fruto (carne) ya que paradójicamente, el hueso contiene muy pocos cuerpos grasos.

5 El aceite de rosa mosqueta se extrae de las semillas del *Cynorhodon* (un "falso" fruto) de la rosa mosqueta que es un escaramujo salvaje. Es uno de los aceites vegetales más ricos en ácidos grasos poli-insaturados esenciales (ácidos linoleico y linolénico) y contiene unos insaponificables. Tiene propiedades regenerantes.

10 La utilización de estos aceites vegetales como disolvente del extracto de *Hemerocallis* presenta la ventaja de ser compatible con las normas de los productos certificados Ecocert que se aplican a los productos cosméticos al mismo tiempo ecológico y biológicos.

15 La primera etapa del procedimiento anterior, que consiste en impregnar la planta, preferentemente triturada, se desarrolla a temperatura ambiente, o en caliente, a una temperatura superior a la de fusión de los aceites utilizados. Se trabaja preferentemente a temperatura ambiente, del orden de 25°C, siendo los aceites vegetales, y en particular los aceites de aguacate y de rosa mosqueta, líquidos a esta temperatura.

20 Según una forma de realización preferida, la trituración de la planta se efectúa a una temperatura de aproximadamente -80°C, hasta obtener un polvo que presenta una granulometría media inferior a 100 µm aproximadamente.

25 La segunda etapa comprende un calentamiento a una temperatura elevada, por ejemplo del orden de 140 a 170°C, durante un corto tiempo, generalmente inferior a 5 minutos. El tiempo de subida en temperatura debe también ser muy corto. La técnica del calentamiento por microondas está bien adaptada a estas condiciones. La técnica de las microondas facilita también la tercera etapa de microdispersión de las partículas en el o los aceites vegetales utilizados, con ruptura de las membranas celulares. Esta tercera etapa puede también comprender un tratamiento por cavitación ultrasónica, preferentemente en un reactor cerrado equipado de un generador de ultrasonidos de baja frecuencia. Esta tercera etapa puede eventualmente realizarse simultáneamente con las otras dos, pudiendo el conjunto de las etapas, o cada una de ellas, realizarse varias veces si fuese necesario.

30 Al final de la extracción, el extracto lipófilo se filtra preferentemente sobre un filtro que tiene una porosidad inferior a aproximadamente 5 µm, a fin de obtener un extracto lipófilo límpido.

35 Este procedimiento es particularmente eficaz en una materia prima tal como la *Hemerocallis* que contiene entre el 85 y el 90% de agua antes de la trituración y del secado. Después del secado, antes de la etapa de impregnación en el o los aceites vegetales, el contenido en agua se lleva por debajo del 12%.

40 Cuando la extracción se realiza utilizando una mezcla de aceite de aguacate y de rosa mosqueta, se obtiene un extracto lipófilo de color verde oscuro que tiene una densidad relativa a 20°C que varía de 0,900 a 0,990 g/cm<sup>3</sup> aproximadamente (NF ISO 6883), soluble en los aceites y fases grasas, y que tienen las características siguientes:

- contenido en agua y en volátiles (NF EN ISO 662): max. 0,20% ± 0,04%;

45 - ácido oleico (NF EN ISO 660): max. 3,0% ± 0,6%;

- índice de peróxido (NF EN ISO 3960): max 10,0 ± 4,0 meqO<sub>2</sub>/kg;

- contenido en fenoles (determinación por HPLC):

50 \* catequinas: 150 mg/kg,

\* quercetina: 250 mg/kg,

\* rutina: 150 mg/kg,

55 \* ácido clorogénico: 416 mg/kg

- contenido total en carotenoides (luteína y zeaxantina): 5,1 mg/kg de composición oleosa (medido por HPLC);

60 - contenido en β-caroteno: 8,6 mg/kg de composición oleosa (medido por HPLC);

- composición en ácidos grasos de la composición oleosa:

65 \* ácido palmítico 6-26%

	* ácido palmitoleico	1,5-10%
	* ácido esteárico	máx. 2%
5	* ácido oleico	30-65%
	* ácido linoleico	13-27%
10	* ácido $\alpha$ -linolenico	5-14%
	* ácido araquídico	máx. 1%
	* ácido erúcico	máx. 1%

15 Además, la técnica utilizada permite obtener una composición oleosa mucho más concentrada en principios activos que un simple macerado oleoso. Así, según la invención, se asocian las ventajas de un aceite vegetal y de moléculas hidrófilas (flavonoides, compuestos fenólicos). Finalmente, el vehículo oleoso evita tener que añadir un conservante a la composición, permitiendo éste en efecto estabilizar en el tiempo las propiedades antioxidantes del extracto lipófilo de *Hemerocallis* y por lo tanto la eficacia de las composiciones cosméticas que lo contiene.

20 Según una forma de realización preferida de la invención, el vehículo oleoso comprende una mezcla de aceite de aguacate y de aceite de rosa mosqueta. En este caso, la relación másica aceite de aguacate/aceite de rosa mosqueta dentro de la composición oleosa varía preferentemente de 4/1 a 1/1 aproximadamente, y aún más preferiblemente de 2/1 a 1/1.

25 Dentro de la composición oleosa utilizable según la invención, el contenido en extracto lipófilo de *Hemerocallis* (moléculas lipófilas extraídas de la planta *Hemerocallis*, es decir principalmente carotenoides y  $\beta$ -caroteno) puede variar de 5 a 20 ppm, y más preferiblemente de 15 a 20 ppm.

30 Las composiciones utilizables según la invención pueden contener, además de la composición oleosa conforme a la invención, uno o varios activos secundarios que refuerzan o complementan ventajosamente su actividad, y compatibles, es decir no susceptibles de reaccionar los unos con los otros u ocultar o limitar sus efectos.

35 Más particularmente, los activos secundarios se pueden seleccionar entre un agente anti-edad, o entre el acetil-tetrapéptido-5 (CAS nº 820959-17-9), un extracto de plancton, un extracto de maca que tiene un efecto sobre la prevención de desajustes relacionados con una deficiencia de la microcirculación cutánea y al estrés oxidativo que puede resultar de ello, un extracto de pétalos de amapola que actúa sobre la nutrición celular, una composición de extractos de ancusa, de amapola y de pasiflora que, en asociación, tiene un efecto en la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo, un extracto de semillas de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbitamao, un extracto de *Kigelia africana*, un extracto de avena, las células de cacao, la vitamina C, la vitamina E y el hexilresorcinol.

40 El agente anti-edad puede ser, por ejemplo, un lípido tal como el geranil geranil isopropanol (Juvinity®) que reduce la formación de los peróxidos intracelulares y retrasa así el envejecimiento celular.

45 Las composiciones cosméticas utilizables según la presente invención poseen una excelente tolerancia cutánea, en particular debido a la película lipídica que resulta del soporte oleoso (aceites vegetales, en particular aceite de aguacate y aceite de rosa mosqueta), no presentan ninguna fototoxicidad y su aplicación sobre la piel, para periodos de tiempo prolongados, no implica ningún efecto sistémico.

50 Las composiciones utilizables según la presente invención pueden presentarse en formas galénicas clásicamente utilizadas para una aplicación tópica, es decir en forma de gel, emulsión (en particular crema o leche), emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, aceite corporal, de mascarilla, pomada, ungüento, loción, solución concentrada, nanocápsulas, liposomas, conteniendo dichas formas galénicas además nos excipientes y soportes habituales y aceptables en el plano cosmetológico. Se utilizan preferentemente en forma de cremas, sueros, loción o gel.

55 Estas formas de administración por vía tópica se preparan mediante las técnicas habituales, y por ejemplo, en el caso de una crema, por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa para obtener una emulsión aceite en agua o inversamente para preparar una emulsión agua en aceite. En el caso de cremas, se pueden utilizar unas emulsiones con estructura laminar obtenidas con unas lecitinas hidrogenadas o unos sucro-ésteres, que contienen pocos productos etoxilados o que no contiene ninguno.

60 Las composiciones cosméticas utilizables según la invención pueden también tomar la forma de loción o solución en la que los extractos están en forma encapsulada en unas microesferas. Las microesferas según la invención pueden, por ejemplo, estar constituidas de cuerpos grasos, de agar y de agua. La composición oleosa utilizable

conforme a la invención puede incorporarse en unos vectores de tipo liposomas, glicoesferas, en quilomicrones, macro-, micro-, nano-partículas así como macro-, micro- y nano-cápsulas y también adsorberse sobre unos polímeros orgánicos polvorosos, los talcos, bentonitas y otros soportes minerales.

5 Estas emulsiones tienen una buena estabilidad y pueden conservarse durante el tiempo necesario para la utilización a temperaturas comprendidas entre 0 y 50°C sin que haya sedimentación de los constituyentes o separación de las fases.

10 Las condiciones tópicamente utilizables según la invención pueden comprender unos excipientes apropiados para una aplicación tópica externa, en particular unos excipientes aceptables en el plano cosmetológico. Estos excipientes apropiados para la formulación son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden en particular unos agentes de penetración tales como el fitantriol, el octildodecanol y la escina; los espesantes tales como las gomas naturales y los polímeros de síntesis; los tensioactivos; los emolientes tales como el octanoato de cetearilo, el miristato de isopropilo, el isononanoato de cetearilo, la dimeticona, la ciclometicona, el 3-diisoestearato de poliglicerilo, el poliisobuteno hidrogenado, el alcohol cetílico, el palmitato cetílico, el fosfato cetílico; los emulsionantes tales como los derivados de poliglicerol; los conservantes tales como el fenoxietanol y el ácido dehidroacético; los colorantes; los perfumes; etc.

20 Como otros ingredientes utilizables en las composiciones de la invención, se pueden citar los agentes hidratantes tales como la glicerina, el butilenglicol, la sal de sodio del ácido pirrolidona carboxílico (sodium PCA), así como unas asociaciones de derivados glucósicos con efecto hidratante y reestructurante como el producto Aquaxyl® (xilitilglucósido y anhidroxitol y xilitol), y también las vitaminas antioxidantes tales como la vitamina E, por ejemplo el acetato de tocoferol o el tocotrienol, la vitamina C, los polifenoles naturales.

25 Se pueden añadir también a la composición unos glucósidos seleccionados principalmente entre la glucosa, el glicógeno y la trealosa, o también un palmitoilpentapéptido-3 tal como el Matrixyl® o unos derivados tales como el palmitoil GHK (que posee la cadena glicil-histidil-lisina) y el palmitoil GQPR (glicil-glutamil-propil-arginina) o el palmitoil VGVAPG (valil-glicil-valil-alanil-propil-glicina) asociado a una cerámida-2, así como, de manera general, cualquier asociación con una ceramida.

30 Se pueden añadir también a la composición unos agentes de protección contra los rayos ultravioletas, y por ejemplo unos filtros solares UV-A y UV-B hidrófilos o lipófilos, o unos pigmentos que forman una pantalla anti-ultravioleta.

35 Los filtros solares se pueden seleccionar, por ejemplo, entre la benzofenona o un derivado de benzofenona tal como la 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (Eusolex® 4360), o un éster de ácido cinámico y más particularmente el metoxicinamato de octilo (Eusolex® 2292), el metoxicinamato de etil-2-hexilo (Parsol MCX®), o también un ciano-β,β-difenilacrilato tal como el octocrileno (Eusolex® OCR), el 4-metilbencilideno alcanfor (Eusolex 6300®), y unos derivados del dibenzoilmetano tales como el 4-isopropildibenzolmetano (Eusolex 8020), el t-butilmetoxidibenzolmetano (Parsol 1789®) y el 4-metoxi-dibenzoilmetano.

40 Los pigmentos se pueden seleccionar por ejemplo entre el dióxido de titanio, el óxido de zinc y el óxido de circonio.

45 La utilización cosmética de la composición cosmética conforme a la invención comprende todos los cuidados de la piel, en particular los cuidados de la cara, incluyendo los productos solares, protectores y bronceadores, los productos antiedad, anti-seborreicos, tónicos, los productos que aseguran la mejora del aspecto de la piel, incluso el tratamiento acnéico y las rojeces cutáneas.

50 Los ejemplos siguientes ilustran la invención más en detalle sin limitar su alcance. En todos los ejemplos de composiciones siguientes, las partes se expresan en masa, salvo que se indique lo contrario.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Preparación de una composición oleosa que comprende un extracto lipófilo de *Hemerocallis*

55 Se ha preparado una composición oleosa a base de extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* de la siguiente manera.

60 Se ha utilizado el conjunto de las partes aéreas de la planta entera, previamente secada, después triturada en frío. La técnica del secado/trituración en frío es preferible ya que permite preservar los antioxidantes presentes en la planta. Según esta técnica, las plantas se someten a una primera trituración, después a una deshidratación a temperatura ambiente protegidas de la luz, a fin de volver a llevar el contenido en agua a alrededor del 10%, y se Trituran en frío, a una temperatura de -80°C, mediante un triturador de cuchillas.

65 El contenido en agua era inferior al 12% después de la trituración y del secado en frío, pudiendo este porcentaje variar en particular del 8,5 al 12% aproximadamente.

Se mezclaron 20 kg de *Hemerocallis* así secada y triturada, en forma de polvo fino y homogéneo, con 60 kg de aceite de aguacate y 20 kg de aceite de rosa mosqueta (relación másica aceite de aguacate/aceite de rosa mosqueta = 3/1). La relación másica planta/aceite era de 0,20.

5 Se calentó después rápidamente la mezcla por microondas a una potencia de 10000 a 30000 vatios/kg de mezcla, durante un tiempo inferior a 10 minutos, bajo flujo de nitrógeno, estando la temperatura máxima alcanzada comprendida entre 80 y 200°C.

10 La mezcla se trató después por ultrasonidos (100 kHz aproximadamente), bajo nitrógeno y bajo agitación, durante 10 a 20 minutos aproximadamente. La mezcla de aceites vectores que contiene el extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* se separó por centrifugación.

**EJEMPLO 2: Puesta en evidencia de la ausencia de citotoxicidad de la composición oleosa conforme a la invención**

15 En este ejemplo, se ha ensayado la citotoxicidad eventual de la composición oleosa conforme a la invención, tal como se obtiene mediante el procedimiento del ejemplo 1.

20 El ensayo utilizado sobre la viabilidad de epidermis humanas reconstruidas es la de la reducción con azul de Formazan (ensayo MTT). El ensayo se ha realizado *in vitro* sobre epidermis humanas reconstruidas ("*Reconstructed Human Epidermis*", RHE) modelo RHEps, de 0,5 cm<sup>2</sup> de superficie, vendido por la compañía SkinEthnic®.

25 La mezcla de aceites vectores (aceite de aguacate/aceite de rosa mosqueta) en la relación másica 3/1 tal como se utiliza para la extracción realizada en el ejemplo 1 se ha ensayado pura (100%), en aplicación tópica sobre las epidermis.

30 La composición oleosa tal como se prepara en el ejemplo 1 se ensayó después de la dilución al 0,5% (v/v), 1% (v/v), 1,5% (v/v), y 3% (v/v), en aceite de parafina. Cada una de las composiciones oleosas así diluidas se ha aplicado a razón de 5 mg/cm<sup>2</sup>, sobre el estrato córneo de las epidermis.

Las mediciones de viabilidad tisulares mediante el ensayo MTT se efectuaron después de 24 horas de incubación a 37°C en atmósfera húmeda aire-CO<sub>2</sub> (35%5%), sirviendo de control una epidermis no tratada.

35 Los resultados se detallan en la tabla I siguiente.

TABLA I

Sustancia	Densidad óptica a 540 nm	Viabilidad (%)
Ninguna (control)	1,058 ± 0,007	100
Aceites vectores puros	1,058 ± 0,010	100
Composición oleosa al 0,5%	1,048 ± 0,013	99
Composición oleosa al 1%	1,057 ± 0,007	100
Composición oleosa al 1,5%	1,050 ± 0,006	99
Composición oleosa al 3,0%	1,031 ± 0,007	97

40 Estos resultados muestran que no se registra ninguna disminución significativa de la viabilidad celular después del tratamiento tópico con la composición oleosa conforme a la presente invención en la gama de concentraciones ensayadas; esto en comparación con la mezcla de los dos aceites vectores ensayados en las mismas condiciones, que no presenta tampoco ningún efecto tóxico frente a tejidos cutáneos.

**EJEMPLO 3: Puesta en evidencia de las propiedades de la composición oleosa según la invención sobre la mejora de la firmeza de la piel**

45 En este ejemplo, se han evaluado los efectos de dos composiciones conformes a la invención que se presentan en forma de cremas, sobre la mejora de la firmeza de la piel, comprendiendo dichas composiciones unas cantidades diferentes de la composición oleosa según la invención, a saber:

50 - Composición oleosa tal como se prepara en el ejemplo 1, formulada al 1% en masa en una crema para la cara (denominada a continuación "crema al 1%");

- Composición oleosa tal como se prepara en el ejemplo 1, formulada al 4% en masa en una crema para la cara (denominada a continuación "crema al 4%").

55 La formulación de la crema al 1% era la siguiente:



agua	92,9%
aceite de girasol	4%
copolímero de amonio acriloldimetiltaurato y de vinilpirrolidona vendido bajo la denominación comercial Aristoflex® AVC por Clariant	2%
Conservante	1%
composición oleosa del ejemplo 1	1%

La formulación de la crema al 4% era en todo punto idéntica a la de la crema al 1% anterior, salvo que contenía un 4% en masa de la composición oleosa del ejemplo y sólo un 89,9% en masa de agua.

### 5 3.1. Principio de los ensayos

Por otro lado, la evaluación de las cremas frente a la mejora de la firmeza de la piel se ha efectuado sobre dos indicadores:

- 10 i) la fibrilina, a fin de determinar la capacidad de las cremas conformes para la invención para prevenir la degradación de la fibrilina, teniendo ésta un papel en el mantenimiento de la elasticidad de la dermis;
- 15 ii) los filamentos de vimentina, a fin de determinar la capacidad de las cremas conformes a la invención para prevenir una pérdida de actividad o una degradación de la vimentina, estando éstos implicados en la organización de la contracción y de la cohesión de la dermis, permitiendo a los fibroblastos conservar una buena contractilidad.

### 3.2. Protocolos

#### 3.2.1. Preparación de los cortes histológicos

20 El estudio se ha realizado sobre unos explantes de piel humanos de un diámetro de 10 mm preparados a partir de una plastia abdominal de una mujer de 53 años de edad.

25 Se extrajo un número suficiente de explantes para realizar el conjunto de los ensayos descritos a continuación. A la recepción, los explantes se transfirieron en placas de 12 pocillos que contenían un medio de cultivo para epidermis vendido por la compañía SkinEthic (0,5 ml/pocillo) y se colocaron en la incubadora a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> saturada de humedad, durante 24 horas antes de proceder al tratamiento de los tejidos.

Los explantes han sufrido después diferentes tratamientos, realizándose cada tratamiento en triplicado:

30 Lote CONTROL T0: ningún tratamiento, extracción a 0 día;

Lote CONTROL D9: ningún tratamiento, extracción a 9 días;

35 Lote crema al 1%: tratamiento con la crema al 1%, extracción a 9 días;

Lote crema al 4%: tratamiento con la crema al 4%, extracción a 9 días;

40 Lote MG: inducción de la glicación por el metilglioxal, ningún tratamiento, extracción a 9 días;

Lote crema al 1% + MG: inducción de la glicación por metilglioxal, tratamiento con la crema al 1%, extracción a 9 días;

45 Lote crema al 4% + MG: inducción de la glicación por metilglioxal, tratamiento con la crema al 4%, extracción a 9 días.

Aplicación de los productos:

50 En los días D0, D2, D3 y D6, los productos (crema al 1% o crema al 4%) se aplicaron sobre los explantes a razón de 2 mg de crema por explante. Los explantes de los lotes CONTROL D9 no han recibido ningún tratamiento. Los medios de cultivo se renovaron en los días D3 y D6.

Inducción de la glicación:

55 En los días D3 y D6, se añadió 18 µl una solución de metilglioxal a 55 mM en el agua estéril (esta solución se ha preparado a partir de una solución comercial de metilglioxal Sigma M0252 al 40%) a los pocillos que contenían los explantes de los lotes MG: crema al 1% + MG y crema al 4% + MG. La concentración final en MG en cada uno de los pocillos era de 500 µM.

Extracciones de los explantes:

5 A D0, los explantes del lote CONTROL T0 se extrajeron y cortaron en dos. Se fijó una mitad mediante formol tamponado durante 24 horas y la otra mitad se congeló a -80°C.

A D9, los 3 explantes de cada uno de los lotes se extrajeron y trataron de la misma manera.

Tratamiento histológico de los explantes

10 Después de 24 horas de fijación en el formol tamponado, las extracciones se deshidrataron e impregnaron en parafina con la ayuda de un mecanismo de deshidratación Leica® TP 1010.

15 Las extracciones se pusieron después en bloque de parafina con la ayuda de una estación de recubrimiento Leica® EG 1160.

Se realizaron unos cortes de 5 µm con la ayuda de un micrótopo tipo Minot, Leica® RM 2125, después se fijaron y montaron sobre unas láminas de vidrio histológicas.

20 Los cortes histológicos se desparafinaron después en baños de xileno y se aclararon con alcohol absoluto.

Inmunomarcado de la fibrilina-1:

25 La fibrilina-1 se marcó después con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-fibrilina-1 (clon 11.C1.4, vendido por la compañía Santa Cruz Biotechnology Inc. Bajo la referencia sc-66058), al 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente con la ayuda de un mecanismo de inmunomarcado Autostainer Plus® vendido por la compañía Dako. Las láminas se aclararon después en tampón fosfato salino (PBS pH 7,4; 2 x 5 min.) después sumergidas durante 2 x 30 minutos en un complejo avidina-biotina (sistema amplificador) vendido bajo la denominación comercial R.T.U. VECTASTAIN® ABC Elite® Kit (compañía Vector Laboratories), aclaradas 2 x 5 minutos con PBS y finalmente reveladas mediante la puesta en contacto con el isotiocianato de fluoresceína (fluoresceína IsoThioCyanate: FITC – SA 1002, Caltag) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para terminar, las láminas se aclararon otra vez 2 x 5 minutos con PBS.

30 Los núcleos se han contracolorado mediante su puesta en contacto de las láminas con una solución de yoduro de propidio al 0,2% de la solución madre al 0,1 mg/ml en PBS pH 7,4 durante 2 minutos, después se aclaró con PBS 2 x 5 minutos y después con agua destilada durante 5 minutos.

35 Después del secado a temperatura ambiente, las láminas se observaron con un microscopio óptico, se realizó la toma de imágenes con una cámara Olympus DP72® y el programa Cell-D.

40 Después del inmunomarcado, el marcado de fibrilina aparece en verde fluorescente, lo que corresponde a un gris claro en una fotografía en blanco y negro.

Inmunomarcado de los filamentos de vimentina:

45 La vimentina se ha marcado con una solución de anticuerpos de ratones anti-vimentina (clon V9, referencia sc-6260 vendido por la compañía Santa-Cruz Biotechnology Inc.) diluida al 1/400 en una solución de albumina de suero bovino (BSA por "Bovine Serum Albumine") a 3 mg/ml en PBS.

50 Las láminas que soportan los cortes histológicos desparafinados se pusieron en contacto con esta solución de anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del aclarado con PBS pH7,4, las láminas se sumergieron durante 2 x 30 minutos en un complejo avidina-biotina (sistema amplificador) vendido bajo la denominación comercial R.T.U. VECTASTAIN® ABC Elite® Kit (compañía Vector Laboratories), después se aclararon con PBS 2 x 5 minutos y finalmente se revelaron mediante la puesta en contacto con un kit con peroxidasa durante 4 minutos vendido bajo la denominación Vector SK-4600 por la compañía Vector Laboratories. Después del aclarado con agua destilada y de la deshidratación, las láminas se montaron con la ayuda del medio de montaje vendido bajo la denominación comercial Eukitt® por la compañía Merck.

Ensayos semicuantitativos

60 Los estudios de los cortes histológicos se complementaron mediante la realización de un ensayo semi-cuantitativo sobre los lotes CONTROL T0, CONTROL D9, crema al 1%, MG y crema al 1% + MG a fin de determinar la superficie ocupada por la fibrilina a nivel de la dermis papilar así como la superficie ocupada por el fibroblastos y su morfología.

65 La superficie ocupada por la fibrilina a nivel de la dermis papilar y por los fibroblastos se midió mediante análisis de imágenes gracias al programa QWin® de la compañía Leica. Este programa permite medir diferentes parámetros

morfológicos tales como la superficie, la circularidad (para los fibroblastos, más o menos circulares o fusiformes) o también el número de horquillas de una célula (control de la dendricidad, en este caso dendricidad del fibroblasto, y que demuestra la buena salud y actividad de la célula).

5 Se han analizado 8 a 12 fotografías por lote.

También se ha determinado la circularidad de los fibroblastos. Este parámetro se calcula en función de la relación del perímetro cuadrado de la superficie. Para un objeto perfectamente circular, la circularidad es igual a 1, sea cual sea el tamaño del objeto. Cuanto más cerca de 1 esté este valor, más circular será la célula, sufriendo por lo tanto en el caso del fibroblasto cuya forma, en estado normal, es fusiforme.

El número de horquillas de los fibroblastos (dendricidad) también se ha determinado de manera visual con la ayuda del programa QWin® de la compañía Leica que permite realizar la morfometría y medir visualmente la presencia o no de horquillas, así como la circularidad de una célula.

### 15 3.3. Resultados

#### 3.3.1.: resultados relativos a la fibrilina

20 Las fotografías de los cortes de los explantes que corresponden a cada uno de los lotes son dadas en las figuras 1 y 2 anexas:

- Figura 1a: corte de un explante del lote CONTROL D9;

25 - figura 1b: corte de un explante del lote crema al 1%;

- figura 1c: corte de un explante del lote MG;

30 - figura 1d: corte de un explante del lote crema al 1% + MG;

- figura 2a: corte de un explante del lote crema al 4%;

- figura 2b: corte de un explante del lote MG;

35 - figura 2c: corte de un explante del lote crema al 4% + MG.

En ausencia de tratamiento y de estrés glicante (fotografía de la figura 1a), se anota que la fibrilina está presente al mismo tiempo en la dermis (que constituye la elastina) y a nivel de la unión dermo-epidérmica (fibras de oxitalan que va desde la dermis a la JDE).

40 Se constata que la aplicación de la crema formulada con la composición oleosa al 1% en ausencia de estrés glicante no induce a ninguna variación de la expresión de la fibrilina-1 (fotografía de la figura 1b).

45 Después de la incorporación de MG en el medio de cultivo y en comparación con el lote control a D9 (CONTROL D9), se observa una disminución de la expresión de la fibrilina-1, en particular a nivel de las fibras de oxitalan. El MG tiene por lo tanto una acción significativa negativa sobre la síntesis de la fibrilina-1 (fotografías de la figura 1c y 2b).

50 La aplicación de la crema al 1% después de que el explante haya sido puesto en contacto con MG (estrés glicante) induce a un aumento de la expresión de la fibrilina-1 y compensa por lo tanto los efectos nefastos de MG (fotografía de la figura 1d).

55 La aplicación de la crema al 4% después de someter el explante a un estrés glicante, induce a un aumento bastante importante de la expresión de la fibrilina-1 y compensa por lo tanto también los efectos nefastos de MG, de manera sustancialmente equivalente a la crema al 1% (fotografía de la figura 2c). En caso de estrés glicante, la composición oleosa utilizada conforme a la invención actúa por lo tanto como un verdadero protector y no como un estimulador de la síntesis de la fibrilina-1.

Los resultados del ensayo semicuantitativo de la superficie ocupada por la ditirosina se dan en la tabla II siguiente:

60

TABLA II

Lote	Superficie ocupada por la fibrilina-1 (en%)	
	Media	Desviación estándar
<b>CONTROL T0</b>	33,8	7,2
<b>CONTROL D9</b>	42,6	4,0
<b>Crema al 1%</b>	38,6	5,5
<b>MG</b>	35,0	3,1
<b>Crema al 1% + MG</b>	43,5	5,4

Destaca de estos resultados que a D0 (CONTROL T0) la fibrilina-1 ocupa el 33,8% de la superficie de la dermis papilar. Después de 9 días, sobre el lote no tratado (CONTROL D9), la expresión de la fibrilina-1 ha aumentado significativamente en un 26% en comparación con el lote CONTROL T0.

Después de la aplicación de la crema al 1% y al final de 9 días de tratamiento (lote crema al 1%), se observa una disminución no significativa del 9% de la superficie de la dermis papilar ocupada por la fibrilina-1. Se puede por lo tanto concluir que la aplicación de la composición oleosa formulada al 1% en una crema sobre una piel no estresada no tiene actividad significativa. Estos resultados confirman lo que se ha constatado en las fotografías (figuras 1a a 1c).

Después de la incorporación del MG en el medio de cultivo, y en ausencia de tratamiento (lote MG), la expresión de la fibrilina-1 ha disminuido significativamente en un 18%.

En comparación con el lote tratado con MG solo (lote MG), y después de 9 días de tratamiento, la aplicación de la crema formulada al 1% en masa de composición oleosa después del estrés glicante (lote crema 1% + MG) induce a un aumento significativo del 24% de la expresión de la fibrilina-1 en la dermis papilar. La aplicación de la crema formulada al 1% en masa en composición oleosa inhibe por lo tanto totalmente los efectos nefastos del estrés glicante.

#### Conclusión

El conjunto de estos resultados relativos a la fibrilina-1 pone en evidencia que en presencia de la composición oleosa utilizada conforme a la invención, los efectos del compuesto glicante disminuyen, hasta encontrar una pequeña síntesis de esta proteína, incluso si el papel de la composición oleosa es claramente protector.

Se puede por lo tanto considerar que la composición oleosa formulada al 1% y al 4% permite mantener la calidad y la cantidad de la fibrilina-1 y por lo tanto la funcionalidad de la elastina. Se mantiene la calidad de la elastina, por lo tanto se puede fácilmente deducir que se preserva la firmeza de la piel a pesar de la aparición, con la edad, de productos glicantes.

Los elementos cifrados confirman muy claramente que, en caso de estrés de la piel (estrés glicante), la composición oleosa es capaz de compensar estos efectos nefastos en su totalidad.

#### 3.3.2.: Resultados relativos a la vimentina

Observaciones previas a la explotación de los resultados: una disminución de la intensidad de la fluorescencia no debe obligatoriamente interpretarse como relacionada con una pérdida de actividad o con una degradación de la vimentina. En efecto, cuando se estimulan los filamentos de vimentina, conllevan la formación de dendritas, es decir de prolongaciones celulares que permitirán a los fibroblastos multiplicar sus puntos de enganche con la matriz extracelular (MEC), en particular con la red de fibras de colágeno y de elastina. A la inversa, cuando la célula se somete a un estrés "glicante" (aquí inducido por el MG), la vimentina se altera y ya no es capaz de ejercer su función de mantenimiento y de organización de la MEC. Los filamentos restantes se concentran entonces a nivel del núcleo. Esta concentración provocada por la glicación puede ser responsable de un aumento de la intensidad de fluorescencia.

Las fotografías de los cortes de los explantes que corresponden a cada uno de los lotes se dan en las figuras 3 y 4 anexas:

- Figura 3a: corte de un explante del lote CONTROL D9;
- figura 3b: corte de un explante del lote crema al 1%;
- figura 3c: corte de un explante del lote MG;
- figura 3d: corte de un explante del lote crema al 1% + MG;

- figura 4a: corte de un explante del lote crema al 4%;

. figura 4b: corte de un explante del lote MG;

5 - figura 4c: corte de un explante del lote crema al 4% + MG.

En ausencia de tratamiento y de estrés glicante (fotografía de la figura 3a), se anota que el marcado de la vimentina es bastante claro a nivel de los fibroblastos, además la dendricidad está bastante desarrollada, lo que traduce la buena salud de los fibroblastos.

10 Se constata que la aplicación de la crema formulada con la composición oleosa al 1% en ausencia de estrés glicante conlleva un aumento moderado de la vimentina a nivel de los fibroblastos, así como a nivel de su dendricidad (fotografía de la figura 3b). Se constata por lo tanto que la composición oleosa formulada al 1% en masa en una crema, en condiciones normales de aplicación, no induce a ninguna reacción particular.

15 La aplicación de la crema formulada al 4% en masa de la composición oleosa conlleva un claro aumento de la expresión de la vimentina a nivel de los fibroblastos y un aumento moderado de la dendricidad (fotografía de la figura 4a).

20 Después de la incorporación del MG en el medio de cultivo y en comparación con el lote control a D9 (CONTROL D9), se observa una dendricidad más baja de los fibroblastos, que traduce una disminución de su actividad y una alteración de los filamentos de vimentina (fotografías de la figura 3c y 4b).

25 Cuando se aplica la crema al 1% después de que el explante se haya puesto en contacto con MG (estrés glicante), se observa un aumento muy claro de la dendricidad de los fibroblastos, que traduce una vuelta de su actividad así como una estimulación de la vimentina (fotografía de la figura 1d). En efecto, cuando se estimulan los filamentos de vimentina, éstos provocan la formación de dendritas, es decir de prolongaciones celulares que permitirán a los fibroblastos multiplicar sus puntos de enganche con la MEC, en particular con la red de fibras de colágeno y de elastina.

30 La aplicación de la crema al 4% después de la sumisión del explante a un estrés glicante, induce también a un claro aumento de la dendricidad, que traduce también una vuelta de actividad del fibroblasto (fotografía de la figura 2c).

35 Los resultados del ensayo semicuantitativo de la superficie ocupada por los fibroblastos se dan en la tabla III siguiente:

TABLA III

Lote	Superficie ocupada por los fibroblastos (en $\mu\text{m}^2$ )	
	Media	Desviación estándar
<b>CONTROL T0</b>	118,4	47,9
<b>CONTROL D9</b>	122,9	50,4
<b>Crema al 1%</b>	134,6	56,5
<b>MG</b>	137,1	56,9
<b>Crema al 1% + MG</b>	129,3	55,4

40 Destaca de estos resultados que a D0 (CONTROL T0) los fibroblastos presentan una superficie media de  $118,4 \mu\text{m}^2$ . Al final de 9 días, sobre el lote no tratado (CONTROL D9), la superficie de los fibroblastos ha aumentado de manera no significativa en un 3,8% en comparación con el lote CONTROL T0.

45 Después de la aplicación de la crema al 1% y al final de 9 días de tratamiento (lote crema al 1%), se observa un aumento significativo del 9,5% de la superficie de los fibroblastos.

Después de la incorporación del MG en el medio de cultivo, y en ausencia de tratamiento (lote MG), la superficie de los fibroblastos ha aumentado significativamente en un 11,5% (el MG reduce la dendricidad y concentra el citoplasma alrededor del núcleo, lo que aumenta la superficie medida).

50 En comparación con el lote tratado con MG solo (lote MG), y después de 9 días de tratamiento, la aplicación de la crema formulada al 1% en masa de composición oleosa después del estrés glicante (lote Crema al 1% + MG) induce a una disminución significativa del 5,7% de la superficie de los fibroblastos.

55 La tabla IV siguiente da los resultados relativos a la medición de la circularidad de los fibroblastos:

TABLA IV

Lote	Circularidad de los fibroblastos	
	Media	Desviación estándar
<b>CONTROL T0</b>	3,19	1,55
<b>CONTROL J9</b>	3,11	2,09
<b>Crema al 1%</b>	3,33	1,66
<b>MG</b>	2,54	1,38
<b>Crema al 1% + MG</b>	3,49	1,77

Destaca de estos resultados que a D0 (CONTROL T0) los fibroblastos presentan una circularidad de 3,19. Los fibroblastos son, por lo tanto, muy fusiformes.

5 Al final de 9 días, sobre el lote no tratado (CONTROL D9), la circularidad de los fibroblastos ha aumentado de manera no significativa en un 2,5% en comparación con el lote CONTROL T0. Los fibroblastos son, por lo tanto, todavía fusiformes.

10 Después de la aplicación de la crema al 1% y al final de 9 días de tratamiento (lote Crema al 1%), se observa una disminución no significativa del 7,1% de la circularidad de los fibroblastos. Por lo tanto no hay evolución de la forma de los fibroblastos.

15 Después de la incorporación del MG en el medio de cultivo, y en ausencia de tratamiento (lote MG), la circularidad de los fibroblastos ha aumentado significativamente en un 18,4%, lo que significa que los fibroblastos han perdido su carácter fusiforme para redondearse. Los fibroblastos se han vuelto, por lo tanto, menos funcionales y han perdido sus puntos de anclaje.

20 En comparación con el lote tratado con MG solo (lote MG) y después de 9 días de tratamiento, la aplicación de la crema formulada al 1% en masa de composición oleosa después del estrés glicante (lote crema al 1% + MG) induce a una disminución significativa del 37,7% de la circularidad de los fibroblastos. La aplicación de esta crema permite así inhibir totalmente los efectos nefastos del estrés glicante.

Los resultados relativos al número de horquillas de los fibroblastos se dan en la tabla V siguiente:

25

TABLA V

Lote	Número de horquillas media por fibroblasto	
	Media	Desviación estándar
<b>CONTROL T0</b>	1,70	1,51
<b>CONTROL J9</b>	1,86	1,66
<b>Crema al 1%</b>	1,94	1,69
<b>MG</b>	1,40	1,11
<b>Crema al 1% + MG</b>	1,90	1,59

Destaca de estos resultados que a D0 (CONTROL T0) los fibroblastos presentan de media 1,7 horquillas.

30 Al final de 9 días, sobre el lote no tratado (CONTROL D9), el número de horquillas por fibroblastos ha aumentado de manera no significativa en un 9,5% en comparación con el lote CONTROL T0.

35 Después de la aplicación de la crema al 1% y al final de 9 días de tratamiento (lote crema al 1%) no se observa ningún aumento significativo (4,5%) del número de horquillas de los fibroblastos con respecto al control.

Después de la incorporación del MG en el medio de cultivo, y en ausencia de tratamiento (lote MG), el número de horquillas de los fibroblastos ha disminuido significativamente en un 24,4%, lo que significa que los fibroblastos se han alterado.

40 En comparación con el lote tratado con MG solo (Lote MG) y después de 9 días de tratamiento, la aplicación de la crema formulada al 1% en masa de composición oleosa después del estrés glicante (Lote crema al 1% + MG) induce a un aumento significativo del 35,5% del número de horquillas de los fibroblastos. La aplicación de esta crema permite así inhibir totalmente los efectos nefastos del estrés glicante y la restauración de los fibroblastos.

### 45 3.3.3.: Conclusiones

El conjunto de estos resultados demuestra que la composición oleosa que comprende el extracto lipófilo de *Hemerocallis* utilizada conforme a la invención posee una excelente actividad antiglicación muy marcada a partir del 1% y que se confirma al 4%:

50 - sobre la protección de la fibrilina. En efecto, la fibrilina no se altera en presencia del extracto lipófilo de

Hemerocallis tras un estrés glicante, está protegida, se observa incluso un aumento de expresión de esta proteína del 24%;

5 - sobre la destoxificación de las fibras de vimentina (citoesqueleto de los fibroblastos) así como sobre la mejora de las propiedades contráctiles de los fibroblastos (formación de dendritas), demostrando su buena salud.

Los resultados obtenidos sobre corte de piel se confirman por los resultados cifrados que atestiguan bien la actividad del extracto lipófilo de Hemerocallis sobre la fibrilina y la vimentina durante un estrés glicante.

10 Se demuestra así una protección real del fibroblasto frente a la glicación de la vimentina, que pertenece íntegramente al citoesqueleto del fibroblasto. Se puede concluir que se mantiene su estructura y por lo tanto su metabolismo bloqueando los efectos de la glicación gracias a la aplicación de una crema que contiene una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de Hemerocallis.

15 Este punto es capital cuando se desea hablar de firmeza ya que el fibroblasto es la base de la síntesis de los glicosaminoglicanos de la elastina, de los colágenos, etc. Permitirle funcionar de manera óptima permite mantener una buena calidad y cantidad de los elementos producidos. Estos diferentes elementos participan en el soporte de la dermis y por lo tanto en la firmeza de la piel.

20 Además, se ha demostrado que la fibrilina está también protegida contra la glicación, ahora bien, esta proteína entra en la composición de la elastina, está por lo tanto directamente implicada en la firmeza y la elasticidad de la piel.

25 Estos dos elementos reunidos muestran que el extracto lipófilo de Hemerocallis es un activo importante en el mantenimiento de la firmeza durante el envejecimiento, ya que es capaz de bloquear los efectos nocivos de los AGE.

#### **EJEMPLO 4: Estudios clínicos**

30 4.1. Estudio sensorial

Se ha realizado un estudio clínico de manera estrictamente confidencial sobre un panel de 270 voluntarios a fin de fundamentar la alegación “mejora de la iluminación de la tez” sobre un periodo de 28 días. Se señala que, de los 270 voluntarios, sólo 256 han efectuado el estudio en su duración total. La composición de las fórmulas no estaba mencionada en los envoltorios y no se ha comunicado a los miembros del panel.

35 Se ha realizado sobre unos productos de cuidado que pertenecen a la gama vendida bajo la denominación comercial Merveillance® por la compañía Nuxe, en los que se ha añadido un 1% en masa de composición oleosa tal como se ha preparado anteriormente en el ejemplo 1.

40 Las referencias ensayadas de la gama Merveillance® son las siguientes:

- 45 - crema pieles secas a muy secas (PS-TS),
- crema pieles normales a secas (PN-PS),
- crema pieles normales a mixtas (PN-PM),
- crema de noche pieles normales a secas (noche-PN-PS),
- 50 - contorno de los ojos (CY),
- suero.

55 Cada uno de estos productos comerciales se ha modificado añadiendo un 1% en masa de una composición oleosa tal como se ha preparado anteriormente en el ejemplo 1.

Para este estudio, los voluntarios se han dividido en 4 grupos:

- 60 - Grupo 1 (G1): Suero + CY + PN-PS,
- Grupo 2 (G2): Suero + CY + noche-PN-PS,
- Grupo 3 (G3): Suero + CY + PS-TS,
- 65 - Grupo 4 (G4): Suero + CY + PN-PM.

Los productos se han aplicado según las recomendaciones siguientes:

Suero + contorno de los ojos: una aplicación por la mañana;

- 5 Las cremas (PS-TS; PN-PS; PN-PM): una aplicación por la mañana y una aplicación por la noche.

Durante el periodo del ensayo, los miembros del panel no aplicaron ningún otro producto cosmético aparte de los ensayados sobre su piel.

- 10 La tabla VI siguiente agrupa los tratamientos recibidos en función del número de voluntarios:

TABLA VI

Número de voluntarios	Suero	CY	PN-PS	Noche-PN-PS	PS-TS	PN-PM
a D0	270	270	68	68	67	67
a D28	256	261	66	63	63	65

- 15 Se ha preguntado a cada voluntario, a D0 y a D28, responder por “si” o por “no” a la pregunta siguiente: ¿su piel le parece más firme?

Las respuestas de los miembros del panel (en %), en función de los grupos, se detallan en la tabla VII siguiente:

TABLA VII

Tiempo	G1	G2	G3	G4
a D0	49%	53%	58%	52%
a D28	63%	72%	61%	71%

- 20 A la vista de estos resultados, siendo consecuente el número de probadores, se puede concluir que la aplicación de los productos que comprenden un 1% en masa de composición oleosa conforme a la invención lleva claramente a una ganancia de firmeza.

- 25 4.2. Estudios de las propiedades biomecánicas

Se ha efectuado también un ensayo complementario que tiene como objetivo estudiar las propiedades biomecánicas de la piel.

- 30 Este ensayo se ha realizado sobre 32 personas seleccionadas entre los miembros del grupo 3 (pieles secas a muy secas), después de la aplicación de la crema PS-TS durante 28 días. Las mediciones se han realizado a D0 y al final de 28 días con la ayuda del aparato Dynaskin® (compañía EOTECH) acoplado con el aparato DermaTOP® (compañía EOTECH).

- 35 Este equipamiento permite medir la firmeza de la piel en condiciones muy reproducibles. El estudio se desarrolla en tres mediciones consecutivas:

- la primera medición adquiere la zona de interés antes de la deformación de la piel a nivel de la mejilla;

- 40 - la segunda medición adquiere la zona de interés durante la deformación que está creada por un chorro de aire que forma un ángulo de 90° con respecto a la superficie de la piel a nivel de la mejilla;

- la tercera medición adquiere la zona de interés después de la deformación de la piel a nivel de la mejilla.

- 45 La presión del chorro de aire se ajustó a 1,8 g y la duración de la deformación era de 5 a 6 segundos.

Un programa dedicado a ello calcula después a D0 y D28 el volumen, la superficie y la profundidad de la deformación. Es posible después calcular los % de variación del volumen, de la superficie y de la profundidad entre las mediciones efectuadas a D0 y a D28 y así evaluar la eficacia de la composición sobre la mejora de la firmeza de la piel.

- 50 Los resultados, expresados en % diferenciales a D28 con respecto a las mediciones efectuadas a D0 medias figuran en la tabla VIII siguiente:

- 55



TABLA VIII

	<b>Evolución a D28 con respecto a D0 (en%)</b>
<b>Volumen de la deformación</b>	- 10,7%
<b>Superficie</b>	+3,7%
<b>Profundidad</b>	- 10,9%

5 Se constata que la crema PS-TS que contiene un 1% de composición oleosa conforme a la invención induce, con respecto a D0, a una disminución significativa del parámetro profundidad del 10,9%, así como del parámetro volumen del 10,7%.

#### **EJEMPLO 5: crema contorno de ojos firmeza**

10 Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una crema ligera de contorno de los ojos que tiene la composición másica indicada a continuación.

- EDTA tetrasódico	0,1 g
- Cafeína	0,2 g
- Glicerina	3,0 g
- Mezcla de compuesto de un copolímero hidroxietilo acrilato/sodio acrilato-dimetil taurato (SEPINOV EMT10; compañía SEPPIC), de isoestearato de Sorbitan y de Polisorbato 60	1,0 g
- Aceite de rosa mosqueta	3,0 g
- Oleato de decilo	3,0 g
- Tocoferol	0,7 g
- Composición oleosa del ejemplo 1	1,0 g
- Sistema de conservación	0,8 g
- Perfume	0,5 g
- Agua	csp 100,0 g

Este contorno de los ojos se puede utilizar una a dos veces por día durante un tiempo de 1 a 6 meses.

#### **15 EJEMPLO 6: Crema ara piel seca firmeza**

Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una crema para pieles secas destinada a mejorar la firmeza de la piel y que tiene la composición másica siguiente:

- EDTA tetrasódico	0,1 g
- Cafeína	0,2 g
- Glicerina	3,0 g
- Polímero reticulado de acrilato/alquilo de C <sub>10-30</sub> acrilato vendido bajo la denominación comercial Carbopol <sup>®</sup> Ultrez 21 por Gattefossé	1,0 g
- Mezcla de alcohol araquidílico, de alcohol behénico y de glucósido de araquidilo vendido bajo la denominación Montanov <sup>®</sup> 202 por SEPPIC	4,0 g
- Aceite de avellana	6,0 g
- Manteca de carité	2,0 g
- Oleato de decilo	3,0 g
- Tocoferol	0,7 g
- Composición oleosa del ejemplo 1	2,0 g
- Sistema de conservación	0,8 g
- NaOH	0,08 g
- Perfume	0,5 g
- Agua	csp 100,0 g

20 Esta crema se puede utilizar una a dos veces por día mediante aplicación sobre las zonas de la piel a tratar (cara).

#### **EJEMPLO 7: suero firmeza**

25 Mediante las técnicas habituales, se ha preparado un suero destinado a mejorar la firmeza de la piel que tiene la composición másica siguiente:

- EDTA tetrasódico	0,1 g
- Extracto de plancton vendido bajo la denominación EPS Seafill por la compañía CODIF	3,0 g
- Glicerina	3,0 g
- Carbomero vendido bajo la denominación Carbopol <sup>®</sup> Ultrez 10 por la compañía Gattefossé	0,2 g
- Glutamato de estearilo sódico	0,5 g
- Aceite de rosa mosqueta	2,0 g
- Oleato de decilo	1,0 g

## ES 2 660 466 T3

- Copolímero reticulado a base de polidimetisiloxano vendido bajo la denominación comercial DC9041 por la compañía Dow Corning	1,0 g
- Tocoferol	0,7 g
- Composición oleosa del ejemplo 1	5,0 g
- Hialuronato de sodio	0,3 g
- Sosa	0,15 g
- Sistema de conservación	0,8 g
- Perfume	0,5 g
- Agua	csp 100,0 g

Este suero se puede utilizar de una a dos veces por día mediante aplicación sobre las zonas de la piel a tratar (cara).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización, a título de ingrediente activo, de una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y de un vehículo oleoso que comprende al menos un aceite vegetal, para la preparación de una composición cosmética para uso tópico destinada a mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición oleosa representa del 0,1 al 10% en masa con respecto a la masa total de la composición cosmética.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición oleosa representa del 0,5 al 4% en masa con respecto a la masa total de la composición cosmética.
- 15 4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho extracto se obtiene a partir de las partes aéreas de *Hemerocallis fulva*.
5. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho extracto se obtiene por extracción bajo protección del aire.
- 20 6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el vehículo oleoso comprende al menos un aceite vegetal seleccionado entre el aceite de aguacate, el aceite de rosa mosqueta, el aceite de avellana, el aceite de colza, el aceite de macadamia, el aceite de argán, el aceite de girasol, el aceite de camelina, el aceite de borraja, el aceite de almendra dulce, el aceite de cártamo, el aceite de calófilo y sus mezclas.
- 25 7. Utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que el aceite vegetal natural se selecciona entre el aceite de aguacate, el aceite de rosa mosqueta y sus mezclas.
8. Utilización según la reivindicación 7, caracterizada por que el vehículo oleoso comprende una mezcla de aceite de aguacate y de aceite de rosa mosqueta.
- 30 9. Utilización según la reivindicación 8, caracterizado por que la relación másica aceite de aguacate/aceite de rosa mosqueta dentro de la composición oleosa varía de 4/1 a 1/1.
- 35 10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el contenido en extracto lipófilo de *Hemerocallis* varía de 5 a 20 ppm.
- 40 11. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición cosmética contiene además uno o varios activos secundarios seleccionados entre un agente anti-edad, el acetil-tetrapéptido-5, un extracto de plancton, un extracto de maca, un extracto de pétalos de amapola, una combinación de extractos de ancusa, de amapola y de pasiflora, un extracto de semillas de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbitamao, un extracto de *Kigelia africana*, un extracto de avena, las células de cacao, la vitamina C, la vitamina E y el hexilresorcinol.
- 45 12. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición cosmética se presenta en forma de gel, emulsión, emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, aceite corporal, mascarilla, pomada, ungüento, loción, solución concentrada, nanocápsulas o liposomas.
- 50 13. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición cosmética comprende además unos agentes de protección contra los rayos ultravioletas o unos pigmentos que forman un protector anti-ultravioleta.
- 55 14. Procedimiento cosmético no terapéutico para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel, que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tópica que contiene una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y de un vehículo oleoso que comprende al menos un aceite vegetal.
15. Utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que comprende una composición oleosa a base de un extracto lipófilo de *Hemerocallis fulva* y un vehículo oleoso que contiene al menos un aceite vegetal, para mejorar la firmeza y/o la elasticidad de la piel.

Fig. 1

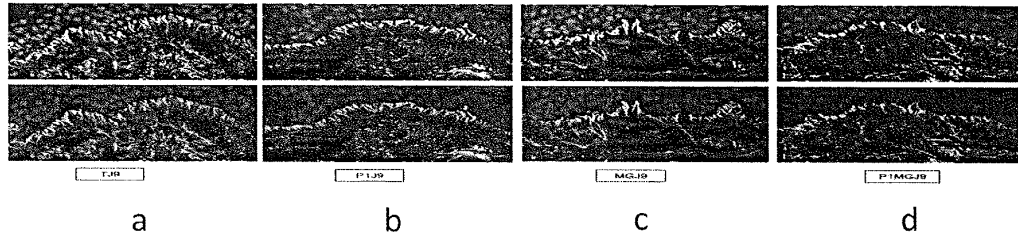


Fig. 2

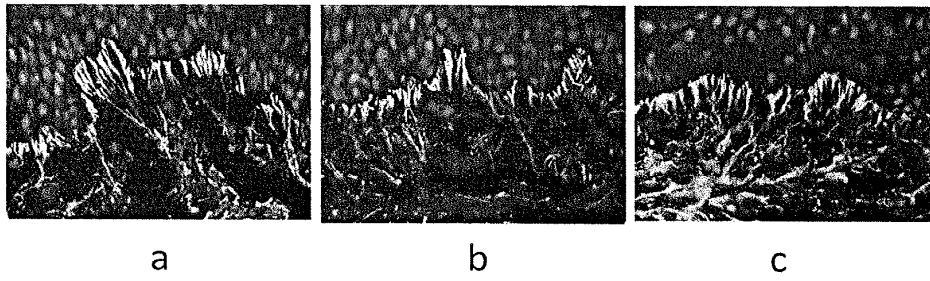


Fig. 3

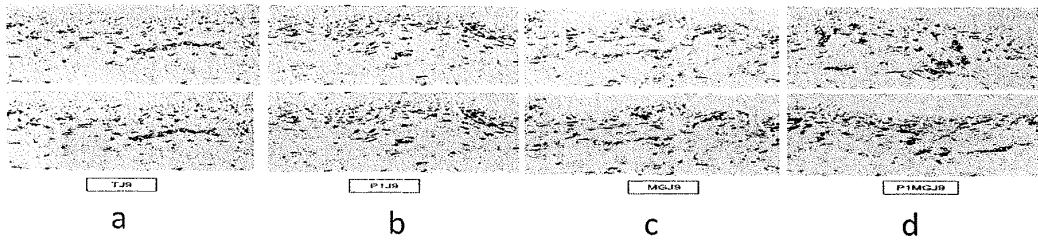


Fig. 4

