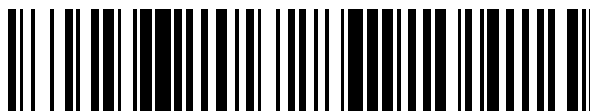


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 098**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)
A61K 8/86 (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 8/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/JP2011/005513**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13046272**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11873013 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2762130**

54 Título: **Promotor para la expresión del gen clock y el gen de la ácido hialurónico sintasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2018

73 Titular/es:
SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP

72 Inventor/es:
GOZU, YOKO y
HAZE, SHINICHIRO

74 Agente/Representante:
SALVA FERRER, Joan

ES 2 668 098 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

Promotor para la expresión del gen clock y el gen de la ácido hialurónico sintasa

5 DESCRIPCIÓN DEL CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere al uso no médico de una composición que contiene un agente para promover la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa.

10 ANTECEDENTES

[0002] Casi todos los organismos vivos en la Tierra tienen internamente un "reloj biológico" que oscila de forma autónoma con un ciclo de aproximadamente 24 horas. Se cree que el reloj biológico causa una fluctuación circadiana biológica denominada ritmo circadiano para controlar la fluctuación circadiana de diversos fenómenos (actividad) biológicos, incluido un ciclo de sueño-vigilia del organismo vivo, temperatura corporal, presión sanguínea, secreción hormonal, metabolismo y también actividad mental y física, y el hambre. La alteración del ritmo circadiano se ha señalado recientemente como un factor de diversos síntomas mentales y físicos o de aparición de la enfermedad, como un trastorno del sueño, una enfermedad de la piel, una enfermedad relacionada con el estilo de vida y también un trastorno neuropsiquiátrico, incluida la depresión.

[0003] El reloj biológico está controlado por un sistema generador de ritmo que incluye un conjunto de genes denominado "gen clock". En el caso de los mamíferos, se cree que el ciclo de retroalimentación formado por la promoción/supresión de la transcripción de un gen que codifica cuatro proteínas centrales, CLOCK, BMAL, PERIOD y CRYPTOCHROME, forma un núcleo del mecanismo molecular de clock, y si los genes que están relacionados con estos bucles del núcleo no están bien expresados, provocan diversas enfermedades, incluida la depresión y una enfermedad relacionada con el estilo de vida (Bibliografía no de patente 1).

[0004] Existe un centro de control del ritmo circadiano (clock central) en un núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Sin embargo, ha quedado claro que el gen clock también se expresa en tejido periférico para formar el ritmo circadiano en un sistema similar. El gen clock también se expresa en la piel, y de manera similar a otros órganos, el gen clock late un ritmo en sincronización con un centro de ritmo circadiano en el cerebro para mantener la homeostasis (Bibliografía no de patente 2).

[0005] Por ejemplo, la atrofia de la piel o la supresión de la reproducción del vello corporal se observa en un animal al que se le ha suprimido BMAL1, y si el gen clock no funciona satisfactoriamente, la salud de la piel se ve afectada de forma negativa (Bibliografía no de patente 3).

[0006] El ácido hialurónico es un tipo de glicosaminoglicano, y existe ampliamente en un cuerpo vivo, incluida cualquier articulación. El ácido hialurónico también existe en la piel y está relacionado con la humectación y la flexibilidad de la piel. Además, se informa que el ácido hialurónico en la piel se metaboliza en el plazo de aproximadamente un día, y se informa que este rápido metabolismo contribuye a mantener una buena salud de la piel mediante la eliminación de sustancias peligrosas (Bibliografía no de patente 4).

[0007] Por ejemplo, la bibliografía de patentes 1 describe que un extracto de semilla de fresa promueve la expresión de un gen de la ácido hialurónico sintasa para tener una acción humectante y una acción embellecedora de la piel.

Lista de citas**50 Bibliografía de patentes**

[0008] Bibliografía de patentes 1: JP-A-2009-298765

Bibliografía no de patente

55

[0009]

Bibliografía no de patente 1: Akhilesh B. Reddy, John S. O'Neill, Healthy clocks, healthy body, healthy mind. Tendencias Cell Biol. 2010 enero; pp. 20 (1): 36-44

Bibliografía no de patente 2: Miki Tanioka, Molecular Clocks in Mouse Skin. Journal. Journal of Investigative Dermatology (2009), p. 129, 1225-1231

Bibliografía no de patente 3: Roman V. Kondratov, Early aging and age-related pathologies in micedeficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. GENES & DEVELOPMENT (2006) 20:1868-1873

5 Bibliografía no de patente 4: Raija Tammi, Degradation of Newly Synthesized High Molecular Mass Hyaluronanin the Epidermal and Dermal Compartments of Human Skin in Organ Culture. Invest. Dermatol. 97:126-130, 1991

El documento JP 2005 139094 (A) se refiere a una composición de preparación externa para la piel de tipo aceite en agua que comprende el 5-15 % en masa de glicerina, el 0,5-10 % en masa de derivado de óxido de alquileno específico, el 0,02-3 % en masa de alcohol batílico y el 0,02-3 % en masa de $\geq 16C$ de alcohol alifático saturado.

El documento JP 2005 220112 (A) se refiere a una composición detergente líquida que contiene un éster de ácido graso de poliglicerol y un derivado de óxido de alquileno.

El documento US 2003 180335 (A) se refiere a una composición externa para el tratamiento de la piel que comprende un derivado de óxido de alquileno que tiene un efecto humectante, un efecto mejorador de la piel áspera, un efecto mejorador de la adherencia y un efecto promotor de la absorción transdérmica.

El documento JP-H-10182402 se refiere a un agente promotor utilizando un líquido de extracto de lavanda como componente activo de un cosmético junto con componentes cosméticos convencionales para obtener el agente promotor de la síntesis de ácido hialurónico objetivo para prevenir el envejecimiento de la piel.

20 RESUMEN DE LA INVENCÓN

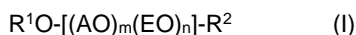
PROBLEMA TÉCNICO

[0010] Los presentes inventores han encontrado que un extracto vegetal específico puede promover la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa. Un objeto de la invención en la presente solicitud es proporcionar un agente para permitir de manera más efectiva la potenciación de la promoción de la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa mediante dicho extracto vegetal, y un método para ello.

SOLUCÓN AL PROBLEMA

[0011] Los presentes inventores han encontrado que el aceite de lavanda y el aceite de eucalipto promueven la expresión de un gen clock como Bmal y Period en relación con un bucle central de control del ritmo circadiano y la expresión de un gen de la ácido hialurónico sintasa y que un extracto vegetal del mismo se combina con un derivado de óxido de alquileno, permitiendo así la promoción de la expresión de los genes de manera más efectiva, y de este modo se ha completado la presente invención.

[0012] Una composición que contiene un agente promotor de la expresión para el gen clock o una composición que contiene un agente promotor de la expresión para el gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con el uso no médico de la presente invención tiene características que comprenden un tipo o dos tipos seleccionados entre aceite de lavanda y aceite de eucalipto, y un derivado de óxido de alquileno representado por la fórmula general (I):



en la que, AO representa un grupo oxialquileno que tiene de 3 a 4 átomos de carbono; EO representa un grupo oxietileno; m y n representan independientemente un número promedio de moles del grupo oxialquileno que tiene de 3 a 4 átomos de carbono añadidos y el grupo oxietileno añadido, respectivamente, y satisfacen las expresiones: $1 \leq m \leq 70$ y $1 \leq n \leq 70$, en las que una relación del grupo oxietileno a un total del grupo oxialquileno y el grupo oxietileno es del 20 al 80 % en masa. El grupo oxialquileno y el grupo oxietileno pueden añadirse en forma de bloque o de forma aleatoria. R^1 y R^2 pueden ser iguales o diferentes, y representan un grupo hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un átomo de hidrógeno, en el que una relación de número de átomos de hidrógeno a número de grupos hidrocarbonados en R^1 y R^2 es de 0,15 o menos.

[0013] Además, un uso no médico de una composición que contiene un agente para promover la expresión del gen clock y/o de la ácido hialurónico sintasa en la piel de acuerdo con la presente invención tiene características de aplicar sobre la piel una composición que contiene un tipo o dos tipos seleccionados entre aceite de lavanda y aceite de eucalipto, y el derivado de óxido de alquileno representado por la fórmula general (I).

[0014] El aceite de lavanda y eucalipto puede promover la expresión del gen clock como Bmal y Period y del

gen de la ácido hialurónico sintasa, y se combinan con el derivado de óxido de alquileno específico, lo que permite mejorar significativamente un efecto en la promoción de la expresión del gen.

EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION

5

[0015] De acuerdo con la presente invención, el aceite de lavanda y/o aceite de eucalipto que promueven la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa se combinan con el derivado de óxido de alquileno específico descrito anteriormente, permitiendo notablemente la mejora de la expresión del gen clock y la ácido hialurónico sintasa en la piel, regulando el ritmo circadiano de la piel para mantener una buena homeostasis y aumentando simultáneamente la producción de ácido hialurónico que desempeña un papel importante en la humectación de la piel y la función de barrera para mejorar el estado de la piel, y así permitir mantener un estado saludable de la piel.

10

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

15

[0016]

La Fig. 1 es un gráfico que muestra la promoción de la expresión del gen clock Bmal1 (A), el gen clock Period1 (B) y el gen HAS2 de ácido hialurónico sintasa (C) mediante aceite de lavanda en un fibroblasto dérmico humano cultivado.

20

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la promoción de la expresión del gen clock Bmal1 (A) y el gen HAS2 de ácido hialurónico sintasa (B) mediante aceite de eucalipto en un fibroblasto dérmico humano cultivado.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra un efecto de un derivado de óxido de alquileno sobre la promoción de la expresión del gen clock Bmal1 (A), el gen clock Period1 (B) y el gen HAS2 de ácido hialurónico sintasa (C) mediante aceite de lavanda en un fibroblasto dérmico humano cultivado.

25

La Fig. 4 es un gráfico que muestra un efecto de un derivado de óxido de alquileno sobre la promoción de la expresión del gen clock Bmal1 (A) y el gen HAS2 de ácido hialurónico sintasa (B) mediante aceite de eucalipto en un fibroblasto dérmico humano cultivado.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES

30

[0017] Una composición que contiene un agente promotor de la expresión para un gen clock y una composición que contiene un agente promotor de la expresión para un gen de la ácido hialurónico sintasa para su uso no médico según la presente invención contiene aceite de lavanda y/o aceite de eucalipto como principio activo. Ambos aceites esenciales están disponibles en el mercado, y se describen brevemente a continuación.

35

[0018] El aceite de lavanda es un aceite esencial obtenido mediante la destilación al vapor de una flor obtenida por la recolección de lavanda (*Lavandula officinalis*) que es un arbusto enano que pertenece a las Lamiaceae.

40

[0019] El aceite de eucalipto es un aceite esencial que se obtiene mediante la destilación al vapor de hojas o ramitas de eucalipto (por ejemplo, *Eucalyptus globulus*), que es un árbol de hoja perenne que pertenece a las Myrtaceae.

45

[0020] En la presente invención, el aceite de lavanda y el aceite de eucalipto se pueden usar solos o en combinación de dos tipos.

[0021] Además, el agente promotor de la expresión para el gen clock según el uso no médico de la presente invención contiene un derivado de óxido de alquileno específico representado por la fórmula general (I) como principio esencial.

50

[0022] En el derivado de óxido de alquileno usado en la presente invención, AO representa un grupo oxialquileno que tiene de 3 a 4 átomos de carbono, y ejemplos específicos incluyen un grupo oxipropileno, un grupo oxibutileno, un grupo oxisisobutileno, un grupo oxitrimetileno y un grupo oxitetrametileno. AO es preferiblemente un grupo oxipropileno o un grupo oxibutileno.

55

[0023] Entonces, m representa un número promedio de moles de un grupo oxialquileno que tiene de 3 a 4 átomos de carbono añadidos, y satisface una expresión: $1 \leq m \leq 70$, y preferiblemente, $2 \leq m \leq 20$. Entonces, n representa un número promedio de moles de un grupo oxietileno añadido, y satisface una expresión: $1 \leq n \leq 70$, y

preferiblemente, $2 \leq n \leq 20$. Cuando el número de moles del grupo oxialquileo que tiene de 3 a 4 átomos de carbono o el grupo oxietileno supera los 70, tiende a aparecer una sensación pegajosa.

[0024] Además, la relación del oxietileno a un total del grupo oxialquileo que tiene de 3 a 4 átomos de carbono y el grupo oxietileno es del 20 al 80 % en masa. Si la relación del grupo oxietileno es inferior al 20 % en masa, en el caso del uso como preparación externa para la piel, la preparación tiende a ser pobre en cuanto a la sensación de humedad, y si la relación excede el 80 % en masa, la preparación tiende a ser pobre en cuanto a la sensación suave.

10 **[0025]** No se especifica en particular un orden de adición de óxido de etileno y óxido de alquileo que tenga de 3 a 4 átomos de carbono. Además, el grupo oxietileno y el grupo oxialquileo que tiene de 3 a 4 átomos de carbono se pueden añadir en forma de bloque o aleatoria, y la forma de bloque incluye no solo un bloque de dos etapas sino también un bloque de tres etapas o más etapas. Además, en comparación con un material añadido en forma de bloque, el uso de un material añadido en forma aleatoria da un producto que tiene una sensación de uso
15 excelente adicional, particularmente cuando el producto se usa como preparación externa para la piel y, por lo tanto, se prefiere el material añadido en la forma aleatoria.

[0026] R^1 y R^2 representan un grupo hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un átomo de hidrógeno, y ejemplos específicos de grupos hidrocarbonados incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-propilo, un grupo sec-butilo y un grupo terc-butilo. R^1 y R^2 son preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo. Cuando se usa un grupo hidrocarbonado que tiene 5 o más átomos de carbono, la hidrofiliencia disminuye, y cuando dicho producto se utiliza como preparación externa para la piel, disminuye la sensación de humedad. R^1 y R^2 pueden ser iguales o diferentes.

25 **[0027]** Como R^1 y R^2 , para ambos se puede usar el mismo tipo, y se mezclan con un grupo hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono y un átomo de hidrógeno, o pueden mezclarse diferentes tipos de grupos hidrocarbonados que tienen 1 a 4 átomos de carbono. Sin embargo, una relación de existencia del grupo hidrocarbonado y el átomo de hidrógeno en el grupo hidrocarbonado de R^1 y R^2 preferiblemente es, en términos de una relación (Y/X) de número (Y) de átomos de hidrógeno al número (X) del grupo hidrocarbonado, de 0,15 o
30 menos, y aún más preferiblemente, de 0,06 o menos. Cuando la relación de Y/X supera el 0,15, tiende a aparecer una sensación pegajosa.

[0028] El derivado de óxido de alquileo usado en la presente invención no está particularmente limitado, y los ejemplos específicos incluyen POE (14) POP (7) dimetil éter, POE (10) POP (10) dimetil éter, POE (7) POP (12) dimetil éter, POE (25) POP (25) dimetil éter, POE (27) POP (13) dimetil éter, POE (55) POP (28) dimetil éter, POE (36) POP (41) dimetil éter, POE (14) POB (7) dimetil éter, POE (10) POP (10) dietil éter, POE (10) POP (10) dipropil éter y POE (10) POP (10) dibutil éter (además, POE, POP y POB como se ha descrito anteriormente, son abreviaturas de polioxietileno, polioxipropileno y polioxibutileno, respectivamente).

40 **[0029]** El derivado de óxido de alquileo usado en la presente invención se puede producir mediante un método conocido públicamente. Por ejemplo, el derivado de óxido de alquileo se puede obtener realizando polimerización de adición de óxido de etileno y un óxido de alquileo que tiene de 3 a 4 átomos de carbono a un compuesto que tiene un grupo hidroxilo, y a continuación permitiendo que la reacción de éter de haluro de alquilo en presencia de un catalizador alcalino. Como alternativa, también se puede usar un artículo comercial.

45 **[0030]** El agente promotor de la expresión para el gen clock o el agente promotor de la expresión para el gen de la ácido hialurónico sintasa según el uso no médico de la presente invención puede contener cualquier otro principio además del principio esencial, a menos que los efectos ventajosos de la invención se vean afectados negativamente.

50 **[0031]** Una relación de composición de aceite de lavanda o aceite de eucalipto (aceite esencial) con el derivado de óxido de alquileo no está particularmente limitada en la invención en la presente solicitud, siempre que puedan alcanzarse los efectos ventajosos de la invención en la presente solicitud, pero preferiblemente se encuentra, en términos de relación másica de aceite esencial:derivado de óxido de alquileo, en el intervalo de
55 0,001:1 a 10:1, y aún más preferiblemente, en el intervalo de 0,01:1 a 1:1. A dicha relación de composición se puede obtener un mayor efecto en la promoción de la expresión de genes.

[0032] El agente promotor de la expresión para el gen clock o el agente promotor de la expresión para el gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con el uso no médico de la presente invención se combina

preferiblemente en una preparación externa para la piel y se usa para ello, aunque no se limita a esto. Una composición preparada combinando aceite de lavanda y/o aceite de eucalipto que promueven la expresión del gen clock y el ácido hialurónico sintasa, y el derivado de óxido de alquileno específico se aplica sobre la piel, permitiendo así la regulación del ritmo circadiano de la piel para promover el mantenimiento de la homeostasis, y al mismo tiempo aumentar la producción de ácido hialurónico que desempeña un papel importante en la humectación de la piel y la función de barrera para permitir mantener un estado saludable de la piel.

[0033] En el caso de formar la composición de los materiales en la preparación externa para la piel, no está particularmente limitada la cantidad de compuesto de aceite de lavanda o aceite de eucalipto que es el principio activo, siempre que se puedan demostrar los efectos ventajosos de la invención en la presente solicitud, pero normalmente se encuentra en el intervalo de 0,1 a 1000 ppm, y aún más preferiblemente, en el intervalo de 10 a 500 ppm, basado en la masa total de la preparación externa para la piel.

[0034] Además, en el caso de formar la composición de los materiales en la preparación externa para la piel, no está particularmente limitada la cantidad de composición del derivado de óxido de alquileno en la misma, siempre que puedan demostrarse los efectos ventajosos de la invención en la presente solicitud, pero preferiblemente se encuentra en el intervalo del 0,001 al 60 % en masa, y aún más preferiblemente, en el intervalo del 0,01 al 10 % en masa, basado en la masa total. Si la cantidad es menor al 0,001 % en masa, ocasionalmente no se puede demostrar ningún efecto, y si la composición se hace superior al 60 % en masa, ocasionalmente se puede producir una sensación pegajosa.

[0035] En el caso de formar la composición de los materiales en la preparación externa para la piel, de acuerdo con una forma de dosificación (por ejemplo, un agente líquido, un agente en polvo, un agente granular, un agente en aerosol, un agente sólido, un agente gelificante, un agente de parche o un supositorio), o una forma de producto (por ejemplo, un material cosmético), la preparación puede contener cualquier principio contenido ordinariamente en dicha preparación externa para la piel, junto con el agente promotor de la expresión para el gen clock o el agente promotor de la expresión para el gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con la presente invención. La preparación externa para la piel se describe bajo un concepto que abarca la composición en general para su aplicación sobre la piel (incluyendo también el cuero cabelludo, el cabello y las uñas) y ejemplos específicos incluyen un material cosmético como material cosmético básico, un material cosmético de maquillaje, un material cosmético para el cabello, una preparación para la limpieza de la piel o el cabello. La forma de dosificación tampoco está particularmente limitada, y los ejemplos específicos incluyen cualquier forma tal como una base de solución acuosa, una base de solubilización, una base de emulsión, una base oleosa, una base de gel, una base de pasta y una base de pomada, una base de aerosol, una base de dos fases de agua y aceite y una base trifásica de agua y aceite en polvo. Cuando la preparación externa para la piel es un material cosmético, los ejemplos específicos incluyen perfume, agua de baño, agua de colonia, crema, lociones lechosas, loción para la piel, bases, polvos faciales, un lápiz labial, jabón, champús y enjuagues, un champú para el cuerpo, un enjuague corporal, polvos corporales y agentes de baño.

[0036] Además, se describen ejemplos de modos de funcionamiento de acuerdo con la presente invención, pero la presente invención no se limita a los mismos, y el producto puede usarse de cualquier modo, siempre que se puedan lograr los efectos ventajosos de la invención.

[0037] La aplicación específica de la composición que contiene el agente promotor de la expresión para el gen clock o el agente promotor de la expresión para el gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con la presente invención es útil para la moderación del ritmo circadiano en la piel y/o la promoción de la producción del ácido hialurónico en la misma, y las composiciones se usan en la mejora de la humectación o flexibilidad de la piel, la prevención o mejora de la piel arrugada, y la prevención, mejora o terapia de diversos síntomas de la piel tales como piel áspera.

[0038] En la presente invención, el gen clock no está limitado, y ejemplos específicos incluyen Bmal (Bmal1, Bmal2), Period (Period1, Period2, Period3), Clock, Cryptochrome, proteína de unión a D del sitio de la albúmina (Dbp), E4BP4, Npas2 y Reverb, sobre todo, con Bmal, Period, Clock y/o Cryptochrome que son un gen del núcleo del reloj biológico, y particularmente, Bmal y/o Period.

EJEMPLOS

[0039] La presente invención se describe específicamente a continuación a modo de ejemplos, pero la presente invención no se limita a los ejemplos que se describen a continuación. Como célula de cultivo utilizada para

la evaluación, pueden usarse diversas células, tales como un fibroblasto dérmico, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula de pigmento, una célula de grasa y una célula nerviosa, pero en los presentes ejemplos, se llevó a cabo una evaluación utilizando un fibroblasto dérmico humano. El sistema central de un gen clock es común en todas las especies de organismos y especies celulares, y por lo tanto los resultados de la evaluación en el fibroblasto dérmico humano se considera que se pueden reflejar en otras especies de organismos y especies celulares.

[0040] Además, como gen clock, se midió la cantidad de expresión de un gen Bmal (tipificado por Bmal1) o un gen Period (tipificado por Period1) en conexión con el sistema central. Como gen de la ácido hialurónico sintasa, se midió la cantidad de expresión del gen 2 de ácido hialurónico sintasa (HAS2). Aunque no se muestran datos, cuando se usó cortisol o forskolina como agente médico para la estimulación en un sistema de fibroblastos dérmicos humanos cultivados, se confirmó que Bmal1 y HAS2 latieron a un ritmo circadiano que presenta una cantidad de expresión máxima después de aproximadamente 16 horas de estimulación por el agente médico, y se confirmó que Period1 latió a dicho ritmo circadiano después de 2 horas a partir del mismo. En los experimentos descritos a continuación, se usó una cantidad de expresión génica después de 16 horas o 2 horas desde la estimulación como índice, respectivamente, y se evaluó el efecto sobre la promoción de la expresión del gen Bmal, el gen Period y el gen HAS2 como sustancia de prueba.

Evaluación del efecto sobre la promoción de la expresión del gen clock y del gen de la ácido hialurónico sintasa mediante aceite de lavanda y aceite de eucalipto

[0041] Como fibroblastos dérmicos humanos cultivados, se adquirió un fibroblasto dérmico humano normal disponible en el mercado derivado de piel adulta (Cell Application, Inc), y se usó para un experimento. La siembra se realizó en un medio de cultivo DMEM preparado mediante la adición del 10 % de SFB, HEPES 20 mM, Glutamax y un agente antibacteriano, y el cultivo se realizó a 37°C bajo el 5 % de CO₂. El sexto día de cultivo, se realizó un intercambio a un medio de cultivo de prueba que contenía aceite de lavanda (0, 10, 25 o 50 ppm) o aceite de eucalipto (0, 25, 50 o 100 ppm) a cada concentración, el tiempo inmediatamente posterior al intercambio se tomó como 0 horas, y se tomó una muestra de células después de 2 horas y 16 horas. A partir de la célula tomada, se extrajo ARN utilizando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado, y se midió la cantidad de expresión de un gen clock (Period1, Bmal1) y un gen de la ácido hialurónico sintasa (HAS2) usando un cebador de PCR disponible en el mercado (Perfect Real Time Primer, TAKARA BIO INC.) de acuerdo con un método de RT-PCR. De manera similar, se cuantificó la cantidad de expresión de RPLP0 que es un gen constitutivo, y se usó como patrón interno para calcular la cantidad de expresión relativa de un gen objetivo a una cantidad de expresión de RPLP0. El valor obtenido se sometió a una prueba de comparación múltiple de Dunnett, y se consideró que el valor que tenía una diferencia significativa en un nivel de significancia del 5 % en un lado en comparación con un control (sin adición de aceite esencial) era efectivo.

[0042] La fig. 1 (A-C) muestra los resultados usando el aceite de lavanda, y la Fig. 2 (A, B) muestra los resultados usando el aceite de eucalipto. Los resultados después de 16 horas desde la estimulación se muestran para Bmal1 y HAS2, y los resultados después de 2 horas de la estimulación se muestran para Period 1, respectivamente. En las Figuras, la diferencia significativa se muestra con un símbolo * (P < 0,05) y un símbolo ** (P < 0,01).

[0043] La fig. 1 muestra que el aceite de lavanda mejora significativamente la expresión de Bmal1, Period1 y HAS2, y la Fig. 2 muestra que el aceite de eucalipto también mejora la expresión de Bmal1 y HAS2, y se muestra que dicho aceite esencial permite la promoción de la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa.

Evaluación del efecto del derivado de óxido de alquileo sobre la promoción de la expresión del gen clock y de la ácido hialurónico sintasa mediante aceite de lavanda y aceite de eucalipto

[0044] Se evaluó un efecto sobre la promoción de la expresión de un gen clock y un gen de la ácido hialurónico sintasa mediante la combinación de un derivado de óxido de alquileo junto con aceite de lavanda o aceite de eucalipto. Además, como derivado de óxido de alquileo, se usó polioxietileno (14 mol) polioxipropileno (7 mol) dimetil éter (polímero aleatorio).

[0045] De manera similar a la descrita anteriormente, se sembró un fibroblasto dérmico humano normal derivado de piel adulta (Cell Application, Inc), y el 6º día de cultivo, se realizó el intercambio a un medio de cultivo de prueba que contenía derivado de óxido de alquileo (0 a 0,1 %) en una concentración predeterminada, y aceite de

lavanda (0, 10, 25 o 50 ppm) o aceite de eucalipto (0, 25, 50 o 100 ppm) a cada concentración, el tiempo inmediatamente después del intercambio se tomó como 0 horas, y se tomó una muestra de una célula después de 2 horas y 16 horas. De una manera similar a la descrita anteriormente, se extrajo el ARN de la célula tomada usando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado, y se midió una cantidad de expresión génica de Bmal1, Period1, HAS2 y RPLP0, que es un gen constitutivo, usando un cebador de PCR disponible en el mercado (Perfect Real Time Primer, TAKARA BIO INC.) de acuerdo con un método de RT-PCR para calcular la cantidad de expresión relativa de un gen objetivo a una cantidad de expresión de RPLP0. El valor obtenido se sometió a una prueba de comparación múltiple de Dunnett, y se consideró que un valor con una diferencia significativa en un nivel de significancia del 5 % en un lado en comparación con un control (sin adición de derivado de óxido de alquileo para el aceite esencial a cada concentración) era eficaz.

[0046] La fig. 3 (A-C) muestra los resultados usando el aceite de lavanda, y la Fig. 4 (A, B) muestra los resultados usando el aceite de eucalipto. Los resultados después de 16 horas desde la estimulación se muestran para Bmal1 y HAS2, y los resultados después de 2 horas de la estimulación se muestran para Period 1, respectivamente. En las Figuras, una diferencia significativa se muestra con un símbolo * (P < 0,05) y un símbolo ** (P < 0,01).

[0047] La fig. 3 (A a C) muestra que la expresión de Bmal1, Period1 y HAS2 mejora significativamente al combinar el derivado de óxido de alquileo con aceite de lavanda en comparación con un caso de aceite de lavanda solo (derivado de óxido de alquileo: 0 %). Además, la fig. 4 (A) muestra que la expresión de Bmal1 se potencia significativamente mezclando el derivado de óxido de alquileo junto con aceite de eucalipto en comparación con un caso de aceite de eucalipto solo (derivado de óxido de alquileo: 0 %).

[0048] Los resultados descritos anteriormente muestran que el derivado de óxido de alquileo se combina con aceite de lavanda o aceite de eucalipto, permitiendo la promoción de la expresión del gen clock y el gen de la ácido hialurónico sintasa de manera más efectiva para moderar el ritmo circadiano de la piel y al mismo tiempo mejorar la producción de ácido hialurónico en la piel para permitir la mejora o la potenciación de la función de la piel.

(Ejemplo de formulación)

[0049] A continuación se muestran ejemplos de formulación para un agente promotor de la expresión para un gen clock o un agente promotor de la expresión para un gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo de formulación 1	Masa (%)
Aceite de eucalipto	0,1
CH ₃ O(EO) ₁₀ (PO) ₁₀ (EO) ₁₀ CH ₃	1,0

Ejemplo de formulación 2	Masa (%)
Aceite de lavanda	0,4
CH ₃ O(EO) ₁₄ (PO) ₇ CH ₃	1,0

Ejemplo de formulación 3	Masa (%)
Aceite de lavanda	1,0
CH ₃ O[(EO) ₂₀ /(PO) ₁₀]CH ₃	20,0

Ejemplo de formulación 4	Masa (%)
Aceite de eucalipto	0,2
Aceite de lavanda	0,5
CH ₃ O(EO) ₁₄ (PO) ₇ CH ₃	10,0

(Ejemplo de composición)

[0050] Los ejemplos de compuestos se muestran a continuación como ejemplos de aplicación para un agente promotor de la expresión para un gen clock o un agente promotor de la expresión para un gen de la ácido hialurónico sintasa de acuerdo con la presente invención. Todas las cantidades de capitalización se muestran en términos de % en masa en función de la cantidad total de un producto.

Loción para la piel	%	en
	masa	
(1) Glicerina	2,0	
(2) Dipropilen glicol	2,0	
(3) Polietilen glicol-60 aceite de ricino hidrogenado	0,3	
(4) Xilitol	3	
(5) Ácido ascórbico	0,005	
(6) Edetato trisódico	0,1	
(7) Colorante	0,1	
(8) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 1)	0,5	
(9) Agua purificada		Resto

Loción lechosa	%	en
	masa	
(1) Alcohol etílico	10,0	
(2) Glicerina	3,0	
(3) Butilen glicol	2,0	
(4) Polietilen glicol	3,0	
(5) Polímero de carboxivinilo	0,1	
(6) Copolímero de ácido acrílico/alquil acrilato	0,1	
(7) Hidróxido de potasio	0,1	
(8) Cicloticona	4,0	
(9) Escualeno	2,0	
(10) Polietileno esférico	2,0	
(11) Mentol	0,5	
(12) Agente médico	0,1	
(13) Parabeno	0,1	
(14) Edetato trisódico	0,1	
(15) Pigmento	0,1	
(16) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 2)	1,0	
(17) Agua purificada		Resto

10

Crema	%	en
	masa	
(1) Glicerina	10,0	
(2) Butilen glicol	5,0	
(3) Carbómero	0,1	
(4) Hidróxido de potasio	0,2	
(5) Ácido esteárico	2,0	
(6) Estearato de glicerilo	2,0	
(7) Isoestearato de glicerilo	2,0	
(8) Vaselina	5,0	
(9) Conservante	0,1	
(10) Antioxidante	0,1	
(11) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 3)	1,0	
(12) Agente quelante	1,0	
(13) Pigmento	0,01	
(14) Alcohol estearílico	2,0	

(15) Alcohol behenílico	2,0
(16) Aceite de naranja	0,01
(17) Aceite de semilla de palma hidrogenado	2,0
(18) Escualeno	10,0
(19) Sal de potasio del ácido 4-metoxiesalicílico	3,0
(20) Agua purificada	Resto

Crema % en
masa

(1) Glicerina	3,0
(2) Dipropilen glicol	7,0
(3) Polietilen glicol	3,0
(4) Estearato de glicerilo	3,0
(5) Isoestearato de glicerilo	2,0
(6) Alcohol estearílico	2,0
(7) Alcohol behenílico	2,0
(8) Parafina líquida	7,0
(9) Cicloteticona	3,0
(10) Dimeticona	1,0
(11) Metoxicinamato de octilo	0,1
(12) Hialuronato sódico	0,05
(13) Conservante	0,1
(14) Antioxidante	0,1
(15) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 4)	0,4
(16) Agente quelante	1,0
(17) Pigmento	0,01
(18) Agua purificada	Resto

Gel % en
masa

(1) Alcohol etílico	10,0
(2) Glicerina	5,0
(3) Butilen glicol	5,0
(4) Carbómero	0,5
(5) Aminometil propanol	0,3
(6) Polietilen glicol-60 aceite de ricino hidrogenado	0,3
(7) Mentol	0,02
(8) Aceite de naranja	0,05
(9) Conservante	0,05
(10) Agente quelante	1,0
(11) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 2)	1,0
(12) Agua purificada	Resto

Gel para masaje % en
masa

(1) Eritritol	2,0
(2) Cafeína	5,0
(3) Extracto de corteza de Phellodendron amurense	3,0
(4) Glicerina	50,0
(5) Polímero de carboxivinilo	0,4
(6) Polietilen glicol 400	30,0
(7) Edetato trisódico	0,1
(8) Copolímero de polioxileno (10) metilpolisiloxano	2,0
(9) Escualeno	1,0
(10) Hidróxido de potasio	0,15
(11) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 1)	1,0

(12) Agua purificada	Resto
Crema para masaje	% en masa
(1) Parafina sólida	5,0
(2) Cera de abeja	10,0
(3) Vaselina	15,0
(4) Parafina líquida	41,0
(5) 1,3-butilen glicol	4,0
(6) Monostearato de glicerilo	2,0
(7) Monolaurato de POE (20) sorbitán	2,0
(8) Borax	0,2
(9) Cafeína	2,0
(10) Conservante	Según se necesite
(11) Antioxidante	Según se necesite
(12) Agente promotor de la expresión para un gen de acuerdo con la presente invención (Ejemplo de formulación 2)	1,0
(13) Agua purificada	Resto

[0051] Los productos según los ejemplos de composición se aplican sobre la piel mediante un modo de funcionamiento típico de cada forma de producto para permitir la promoción de la expresión del gen clock y el gen de la ácido hialurónico sintasa para moderar el ritmo circadiano de la piel y mejorar la producción de ácido hialurónico en la piel para permitir una mejora en el estado de la piel y mantener un estado saludable de la piel.

REIVINDICACIONES

1. Uso no médico de una composición que contiene un tipo o dos tipos seleccionados entre aceite de lavanda y aceite de eucalipto, y un derivado de óxido de alquileño representado por la fórmula general (I):

5



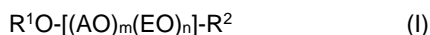
en la que, AO representa un grupo oxialquileño que tiene de 3 a 4 átomos de carbono; EO representa un grupo oxietileno; m y n representan independientemente un número promedio de moles del grupo oxialquileño que tiene de 3 a 4 átomos de carbono añadidos y el grupo oxietileno añadido, respectivamente, y satisfacen las expresiones: $1 \leq m \leq 70$ y $1 \leq n \leq 70$, en las que una relación del grupo oxietileno a un total del grupo oxialquileño y el grupo oxietileno es del 20 al 80 % en masa: el grupo oxialquileño y el grupo oxietileno pueden añadirse en forma de bloque o de forma aleatoria; y R^1 y R^2 pueden ser iguales o diferentes, y representan un grupo hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un átomo de hidrógeno, en el que la relación de número de átomos de hidrógeno a número de grupos hidrocarbonados de R^1 y R^2 es de 0,15 o menos, como agente promotor de la expresión para un gen clock en la piel para mejorar la humectación o flexibilidad de la piel, la prevención o mejora de la piel arrugada, y la prevención o mejora de la piel áspera.

2. El uso no médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen clock es Bmal y/o Period.

20

3. Uso no médico de una composición que contiene un tipo o dos tipos seleccionados entre aceite de lavanda y aceite de eucalipto, y un derivado de óxido de alquileño representado por la fórmula general (I):

25

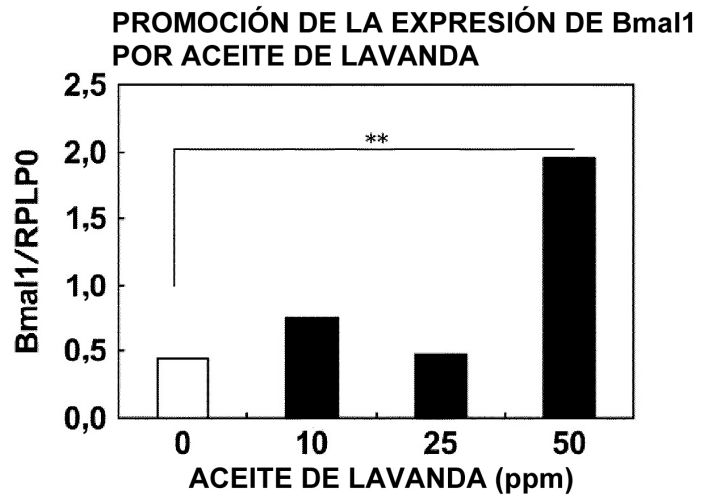


en la que, AO representa un grupo oxialquileño que tiene de 3 a 4 átomos de carbono; EO representa un grupo oxietileno; m y n representan independientemente un número promedio de moles del grupo oxialquileño que tiene de 3 a 4 átomos de carbono añadidos y el grupo oxietileno añadido, respectivamente, y satisfacen las expresiones: $1 \leq m \leq 70$ y $1 \leq n \leq 70$, en las que una relación del grupo oxietileno a un total del grupo oxialquileño y el grupo oxietileno es del 20 al 80 % en masa: el grupo oxialquileño y el grupo oxietileno pueden añadirse en forma de bloque o de forma aleatoria; y R^1 y R^2 pueden ser iguales o diferentes, y representan un grupo hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un átomo de hidrógeno, en el que una relación de número de átomos de hidrógeno a número de grupos hidrocarbonados de R^1 y R^2 es de 0,15 o menos, como agente promotor de la expresión para un gen de la ácido hialurónico sintasa en la piel para mejorar la humectación o flexibilidad de la piel, la prevención o mejora de la piel arrugada, y la prevención o mejora de la piel áspera.

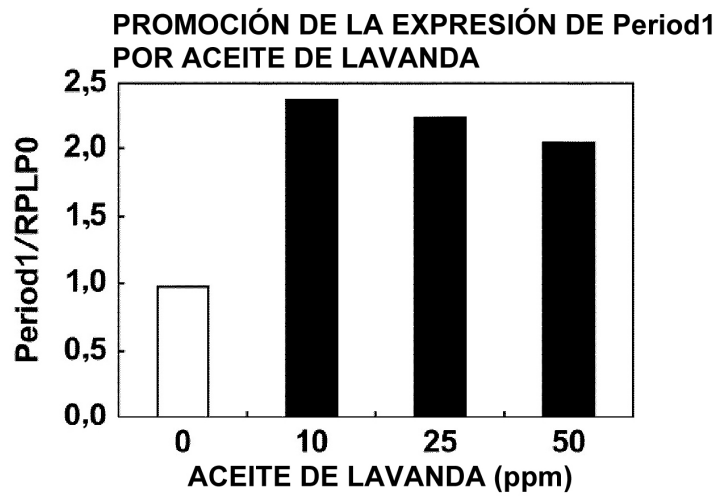
35

FIG.1

A



B



C

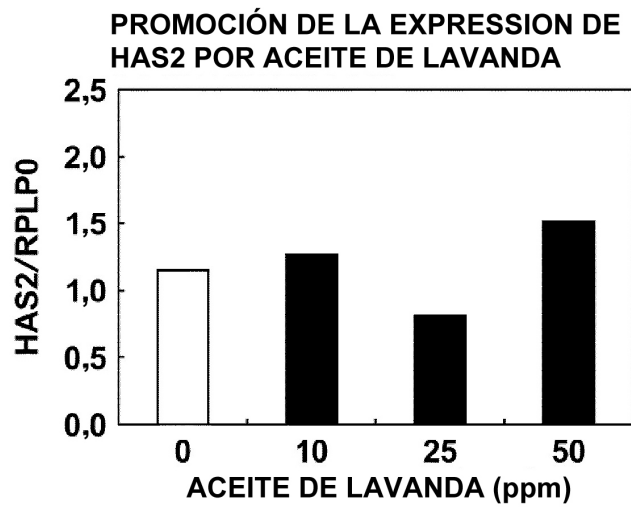


FIG.2

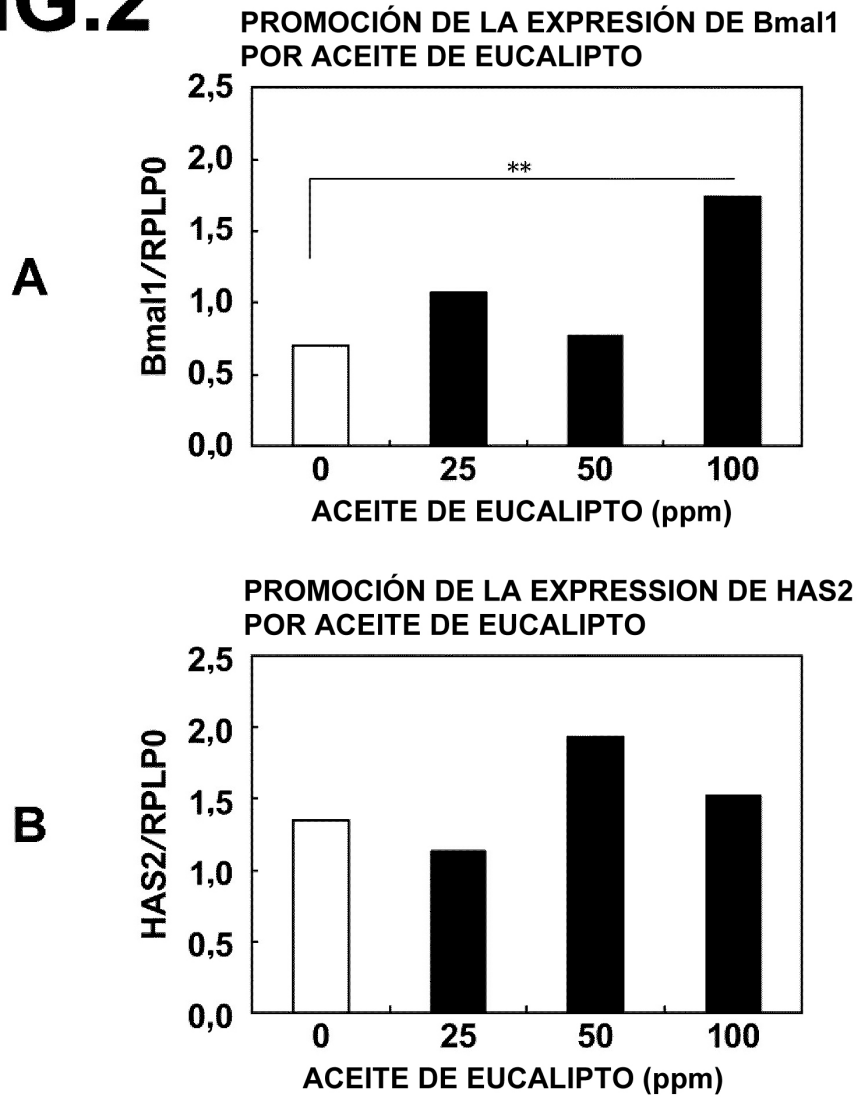
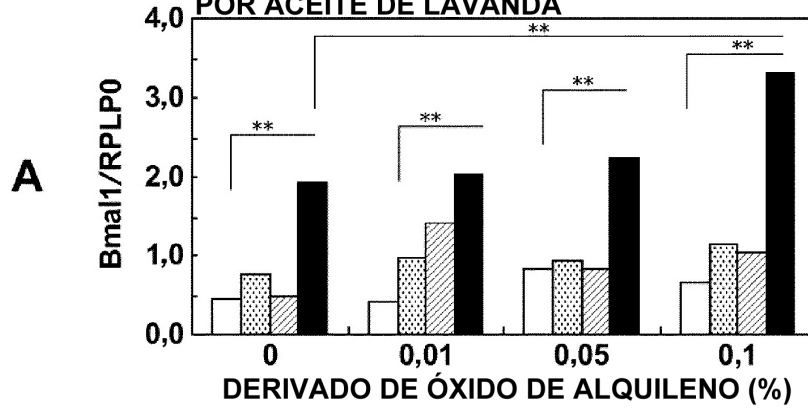
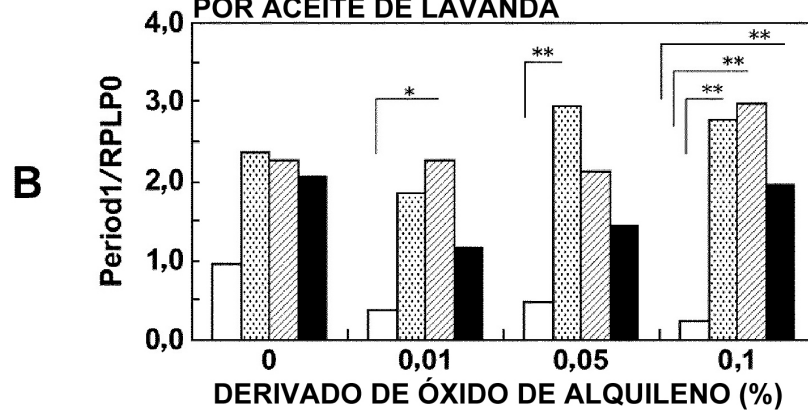


FIG.3

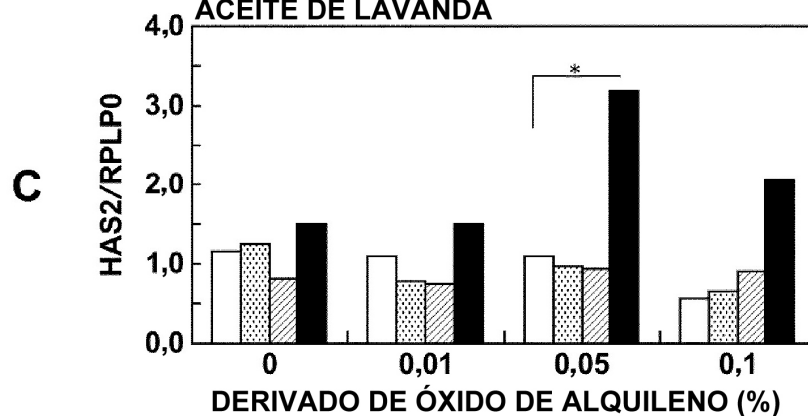
EFFECTO DEL DERIVADO DEL ÓXIDO DE ALQUILENO EN LA PROMOCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bmal1 POR ACEITE DE LAVANDA



EFFECTO DEL DERIVADO DEL ÓXIDO DE ALQUILENO EN LA PROMOCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Period1 POR ACEITE DE LAVANDA



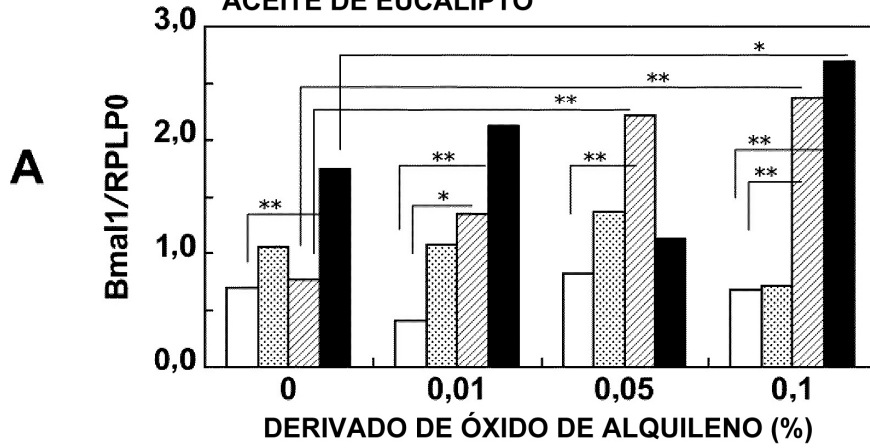
EFFECTO DEL DERIVADO DE ÓXIDO DE ALQUILENO EN LA PROMOCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HAS2 POR ACEITE DE LAVANDA



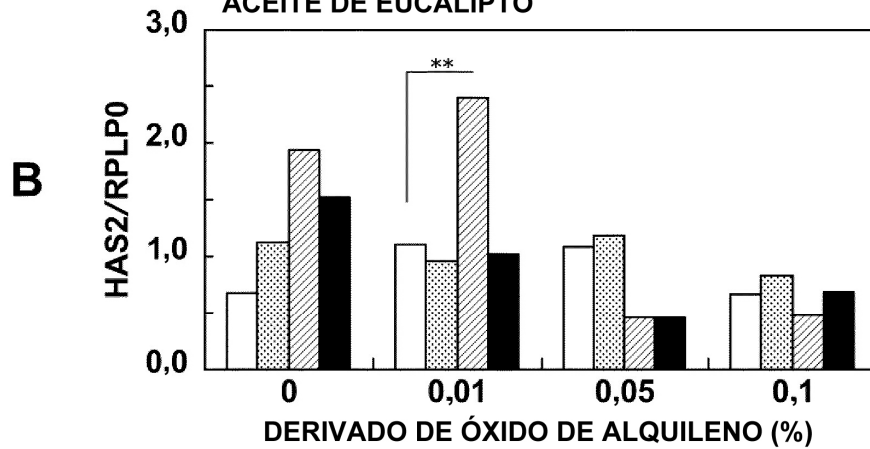
ACEITE DE LAVANDA □ 0ppm ▨ 10ppm ▩ 25ppm ■ 50ppm

FIG.4

EFFECTO DEL DERIVADO DEL ÓXIDO DE ALQUILENO EN LA PROMOCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bmal1 POR ACEITE DE EUCALIPTO



EFFECTO DEL DERIVADO DEL ÓXIDO DE ALQUILENO EN LA PROMOCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HAS2 POR ACEITE DE EUCALIPTO



ACEITE DE EUCALIPTO □ 0ppm ▤ 25ppm ▨ 50ppm ■ 100ppm