

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 652**

51 Int. Cl.:

A61K 8/37	(2006.01)	A61K 8/49	(2006.01)
A61K 8/97	(2007.01)	A61K 8/92	(2006.01)
A61K 31/235	(2006.01)	A61K 47/10	(2007.01)
A61K 31/245	(2006.01)	A61K 47/14	(2007.01)
A61K 36/75	(2006.01)	A61K 47/44	(2007.01)
A61P 17/00	(2006.01)		
A61Q 19/00	(2006.01)		
A61Q 19/10	(2006.01)		
A61K 36/758	(2006.01)		
A61K 8/44	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/JP2013/059674**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14024518**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13828308 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2883548**

54 Título: **Potenciador de expresión del gen de la filagrina**

30 Prioridad:

10.08.2012 JP 2012178486

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

24.06.2019

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY LTD. (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-0061, JP**

72 Inventor/es:

**GOZU, YOKO y
HAZE, SHINICHIRO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 717 652 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

Potenciador de expresión del gen de la filagrina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una preparación cosmética y externa para la piel, y más particularmente, a un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina que participa en mejorar la función de retención de humedad de la piel.

Antecedentes

10 La capa córnea de la piel cubre el cuerpo vivo y retiene así la humedad y proporciona una defensa contra la invasión de sustancias extrañas. La capa córnea está compuesta de varias sustancias, tales como proteínas, incluidas la queratina y la filagrina, y lípidos, producidos por los queratinocitos epidérmicos. La filagrina cumple la importante función de formar una estructura denominada patrón de queratina mediante el ensamble de las fibras de queratina en capas. La filagrina se produce a partir de la profilagrina, un precursor codificado por el gen de la filagrina (FLG), que acompaña a la queratinización y causa la aglomeración de las fibras de queratina. Además, la filagrina se descompone en la capa corneal superior, por lo que se transforma en péptidos y aminoácidos de bajo peso molecular denominados factores naturales de hidratación, y participa en la retención de humedad y la absorción de los rayos ultravioleta.

15 De esta manera, la filagrina participa activamente en la retención de la humedad y en la función de barrera de la capa córnea de la piel, y la disminución en la producción de la filagrina se relaciona con la aparición de enfermedades de la piel seca tales como ictiosis vulgar, dermatitis atópica o xerosis senil (Documento no patente 1). Para mantener una piel saludable y atractiva, se requiere la producción adecuada de filagrina y un ciclo adecuado de cornificación continua.

20 Teniendo en cuenta lo anterior, se han realizado investigaciones sobre sustancias que promueven la síntesis de filagrina, y se sabe que los extractos de plantas como el extracto de tomillo silvestre, el extracto de clavo, el extracto de salvia, etc., son sustancias cuyos efectos promueven la síntesis de filagrina (Documento de patente 1). Además, se sabe que la ectoína, que es acumulada por ciertas especies de bacterias para regular la presión osmótica, inhibe las disminuciones de filagrina causadas por el secado (Documento de Patente 2).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

Documento de Patente 1: Patente japonesa No. 4768238

Documento de Patente 2: Patente japonesa No. 4540872

30 Documentos no patentes

Documento no patente 1: Morar, N., et al., *Filaggrin Mutations in Children with Severe Atopic Dermatitis*, *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1667-1672, 2007.

Documento no patente 2: Akashi, M., et al., *Noninvasive Method for Assessing the Human Circadian Clock using Hair Follicle Cells*, *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.*, 107 (35), 15643-15648, 2010.

35 Descripción de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

40 Como se describió anteriormente, entre los consumidores existe la necesidad de una sustancia que tenga un efecto más potente en potenciar la síntesis de filagrina, y actualmente se busca desarrollar un nuevo agente potenciador de la síntesis de filagrina. Por lo tanto, un problema que ha de resolver la presente invención es proporcionar una sustancia novedosa que promueva la expresión del gen de la filagrina.

Medios para resolver los problemas

45 Como resultado de estudios exhaustivos sobre la expresión del gen de la filagrina, los autores de la presente invención sorprendentemente encontraron por primera vez que la expresión del gen de la filagrina fluctúa rítmicamente en un ciclo de aproximadamente 24 horas. Por lo tanto, se encontró que, para potenciar la producción de filagrina y mantener la piel en un estado saludable, además de simplemente aumentar la producción de filagrina o inhibir las disminuciones en la producción de filagrina causadas por el secado como en la técnica anterior, también es importante potenciar la producción de filagrina teniendo en cuenta esta propiedad rítmica. Por lo tanto, se seleccionaron las sustancias candidatas para evaluar la acción que promueve la expresión del gen de la filagrina teniendo en cuenta esta propiedad rítmica, lo que condujo a obtener el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención.

50 El extracto de *Zanthoxylum*, el ácido 3- (1'-piperidina) propiónico, el aceite de geranio, el aceite de ciprés, el aceite de

rosa, el aceite de gálbano, el aceite de pimienta, el aceite de albahaca, el o-toluato de metilo, el antranilato de metilo y el antranilato de dimetilo se seleccionaron por cribado por los inventores de la presente invención como un agente que tiene el efecto de potenciar la expresión del gen de la filagrina.

5 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en extracto de Zanthoxylum, ácido 3-(1'-piperidina)propiónico, aceite de geranio, aceite de ciprés, aceite de rosa, aceite de gálbano, aceite de pimienta, aceite de albahaca, o-toluato de metilo, antranilato de metilo y antranilato de dimetilo.

10 En otro aspecto, la presente descripción se relaciona con un método para potenciar la expresión del gen de la filagrina que comprende administrar uno o más agentes potenciadores de la expresión del gen de la filagrina seleccionados del grupo que consiste en extracto de Zanthoxylum, ácido 3-(1'-piperidina)propiónico, aceite de geranio, aceite de ciprés, aceite de rosa, aceite de gálbano, aceite de pimienta, aceite de albahaca, o-toluato de metilo, antranilato de metilo y antranilato de dimetilo para un sujeto que requiera la potenciación de la expresión del gen de la filagrina.

15 En otro aspecto, la presente descripción se refiere al uso de una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en extracto de Zanthoxylum, ácido 3-(1'-piperidina)propiónico, aceite de geranio, aceite de ciprés, aceite de rosa, aceite de gálbano, aceite de pimienta, aceite de albahaca, o-toluato de metilo, antranilato de metilo y antranilato de dimetilo para preparar un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina.

20 Además, la presente descripción se refiere a un método para potenciar la expresión del gen de la filagrina o un método cosmético que comprende administrar un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina en un momento en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina que resultan de la administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina son sincrónicos, en base al hallazgo de que la expresión del gen de la filagrina fluctúa rítmicamente en un ciclo de aproximadamente 24 horas. Además, la presente invención también se relaciona con un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina que se utiliza de manera tal que el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se administra en un momento en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina que resultan de la administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina son sincrónicos, y con un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina que se usa de tal manera que el agente que promueve la expresión del gen de la filagrina se administra en un momento en que el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina se restaura mediante la administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina en un sujeto en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina está alterado.

30 Efectos de la invención

El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina descrito aquí tiene al menos uno de los efectos enumerados a continuación:

potenciación de la expresión del gen de la filagrina;

mejora de la función de barrera de la piel; y

35 retención de humedad.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que indica las fluctuaciones rítmicas de 24 horas de la expresión del gen de la filagrina en queratinocitos cultivados temporalmente en un medio que contiene cortisol.

40 La FIG. 2 es un gráfico que indica las fluctuaciones rítmicas de 24 horas en los niveles de expresión del gen de la filagrina y los genes Clock BMAL1 y PER3 en queratinocitos cultivados temporalmente en medio que contiene cortisol.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que indica los resultados de la acción de los agentes farmacéuticos candidatos que promueve la expresión del gen de la filagrina.

45 La FIG. 4 es un gráfico de barras que indica los resultados de la acción que promueve la expresión del gen de la filagrina cuando se utiliza ácido 3-(1'-piperidina)propiónico, extracto de Zanthoxylum y una combinación de estos como agentes farmacéuticos candidatos.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un método cosmético para potenciar la expresión del gen de la filagrina, que comprende: administrar una composición que contiene extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico a un sujeto que requiere la potenciación de la expresión del gen de la filagrina.

50 De acuerdo con la invención, la composición que contiene extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico es un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina.

La invención también se refiere a una composición que contiene extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico, en particular a una composición cosmética, que puede utilizarse para potenciar la expresión del gen de la filagrina.

5 Se seleccionó una combinación de extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico para el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina.

10 El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención es capaz de potenciar la síntesis de filagrina al potenciar la expresión del gen de la filagrina. Más específicamente, la profilagrina se sintetiza a través de la expresión del gen de la filagrina, se somete a fosforilación, y luego a desfosforilación e hidrólisis por peptidil arginina desiminasa durante la queratinización, con lo que se sintetiza la filagrina. Por lo tanto, un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina también se conoce como un agente potenciador de la expresión del gen de la profilagrina, y puede ser también un agente potenciador de la síntesis de filagrina que promueve la síntesis de filagrina al potenciar la expresión del gen de la filagrina.

15 El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención promueve la síntesis de filagrina y además provoca el aumento de los aminoácidos que son los componentes principales de los factores de hidratación natural (FHN) producidos a partir de la descomposición de la filagrina. Por lo tanto, el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención también puede ser un agente potenciador del factor hidratante natural, un agente hidratante o un agente potenciador de la función de barrera de la piel, ya que mejora los factores hidratantes naturales, y se incorpora en un cosmético. Además, la piel seca y las enfermedades de la piel seca como la xerosis senil, la dermatitis atópica o la ictiosis vulgar pueden tratarse mediante el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina o el método para potenciar la expresión del gen de la filagrina de la presente invención.

20 En un aspecto de la presente invención, el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención puede administrarse por una vía arbitraria, y puede administrarse por vía oral o parenteral (tal como por administración transcutánea, transmucosa, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, transpulmonar o intramuscular) En el caso de la administración oral, el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se puede administrar mediante formulación en una tableta o cápsula y similares, o se puede administrar como una bebida o suplemento. En el caso de la administración transcutánea, puede incorporarse en una preparación cosmética o externa de la piel y puede administrarse mediante aplicación en la piel. En el caso de la administración transpulmonar, el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se puede administrar por inhalación de una bruma de una solución obtenida mediante disolución o por inhalación después de la vaporización, y se puede administrar en forma de aromaterapia, por ejemplo. El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se administra preferiblemente de forma transcutánea desde el punto de vista de la potenciación de la expresión del gen de la filagrina en células epidérmicas.

35 El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención se administra no solamente a sujetos que requieren la potenciación de la expresión del gen de la filagrina, como los sujetos que desean mejorar la hidratación y la función de barrera de la piel, sino también a sujetos en los que el nivel del ritmo biológico de la expresión del gen de la filagrina está alterado. Los sujetos que requieren la potenciación de la expresión del gen de la filagrina incluyen, por ejemplo, sujetos que padecen piel seca o enfermedades de la piel seca tales como xerosis senil, dermatitis atópica o ictiosis vulgar.

40 El agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención se refiere a un producto cosmético, farmacéutico, cuasi-farmacéutico o producto aplicado a la piel, y por lo tanto la forma del mismo puede ser cualquiera de una amplia gama de formas, tales como tipo solución acuosa, tipo solubilizado, tipo emulsionado, tipo en polvo, tipo gel, tipo pomada, crema, tipo de dos capas de agua-aceite o tipo de tres capas de agua-aceite-polvo. Los ejemplos de cosméticos a los que se puede aplicar la presente invención incluyen lociones para la piel, cremas, lociones lechosas, gel, esencias de belleza, pomadas, envases, aditivos para el baño, jabones corporales, champús, enjuagues y bases. En el caso de un fármaco o cuasi-fármaco, la presente invención se puede aplicar en diversas formas tales como pomadas o cremas.

50 La preparación cosmética y / o externa para la piel de la presente invención también puede contener ingredientes activos y / o excipientes usados comúnmente en la producción de cosméticos y / o preparaciones de uso externo para la piel, y ejemplos de estos incluyen bases tales como agua, alcohol, glicerina o ácido hialurónico, surfactantes, humectantes, espesantes, ajustadores de pH, agentes absorbentes de UV, estabilizadores, antimicrobianos, fragancias, etc.

55 Como se muestra en la FIG. 1, la expresión del gen de la filagrina fluctúa rítmicamente durante un ciclo de aproximadamente 24 horas en un sistema de células cultivadas de queratinocitos, y se cree que este ritmo es equivalente al ritmo circadiano. El ritmo circadiano es un ritmo cíclico que tiene un ciclo de aproximadamente 24 horas que se controla mediante un bucle de retroalimentación compuesto por proteínas Clock como CLOCK, BMALI, CRY o PER, y se sabe que tiene un efecto en varios fenómenos fisiológicos como el sueño / la vigilia, la secreción hormonal, la temperatura corporal y el ciclo celular en el cuerpo.

Dado que se cree que los niveles de expresión del gen de la filagrina fluctúan en línea con el ritmo circadiano in vivo,

el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención puede potenciar la síntesis de filagrina más eficazmente administrando el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de acuerdo con el ritmo circadiano, y más específicamente, administrándolo de manera que se sincronice con el tiempo del nivel máximo o mínimo de expresión de la filagrina.

5 También se describe un método cosmético que comprende administrar un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina en un momento en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina que resulta de la administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina son sincrónicos. En la presente invención, un método cosmético se refiere no solo a un método llevado a cabo por un individuo, sino que también se refiere al que se proporciona como una fórmula cosmética de
10 acuerdo con las preferencias del cliente cuando se suministran productos de belleza, así como al proporcionado por un vendedor de cosméticos o esteticista que no es un médico.

También se describe un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina que se emplea para ser administrado en un momento en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina resultante de la administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina son
15 sincrónicos.

También se describe un método para potenciar la expresión del gen de la filagrina que comprende administrar un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina en un momento en el que el ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el ritmo del nivel de expresión del gen de la filagrina resultantes de la administración de la del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina son sincrónicos en un sujeto que requiere la
20 potenciación de la expresión del gen de la filagrina. Este método para potenciar la expresión del gen de la filagrina es un método para tratar la piel seca y las enfermedades de la piel seca como la xerosis senil, la dermatitis atópica o la ictiosis vulgar.

La administración sincrónica se refiere a administrar de tal manera que el pico del ritmo biológico del nivel de expresión del gen de la filagrina y el pico de las fluctuaciones en el nivel de expresión del gen de la filagrina que resulta de la
25 administración del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se superponen, y se refiere a administrar el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de 16 horas a 22 horas, más específicamente de 17 horas a 21 horas, y aún más específicamente de 18 horas a 20 horas, antes de que el nivel de expresión del gen de la filagrina alcance un máximo. En realidad, dado que se estima que el pico de la expresión del gen de la filagrina en humanos se produce aproximadamente desde las 5:00 a.m. a las 11:00 a.m., más específicamente desde alrededor
30 de las 6:00 a.m. a las 10:00 a.m., e incluso más específicamente desde alrededor de las 7 a.m. a las 9:00 a.m., se cree que el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se administra preferiblemente, por ejemplo, de 16 horas a 22 horas, más específicamente de 17 horas a 21 horas, e incluso más específicamente de 18 horas a 20 horas antes. Por ejemplo, se cree que el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se administra preferiblemente entre las 7:00 a.m. y la 1:00 p.m. y hasta alrededor de la 1:00 p.m. a las 7:00 p.m. correspondientes
35 a las 16 horas a 22 horas anteriores al pico de expresión del gen de la filagrina.

Como se determinó claramente en la presente invención, la filagrina se expresa de acuerdo con el ritmo del reloj interno del cuerpo, y cuando este ritmo del reloj interno del cuerpo se ve afectado por alguna causa tal como el envejecimiento, el estrés, el sueño inadecuado o las alteraciones en el ritmo diario, se cree que el ritmo de expresión de la filagrina cambia de manera correspondiente o que su nivel de expresión disminuye. De este modo, administrando
40 el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención en el momento adecuado, puede esperarse que se restaure el ritmo de expresión de la filagrina o puede esperarse que aumenten sus niveles de expresión. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención administrado en el momento adecuado puede usarse como un agente para mejorar o restaurar el nivel de expresión de la filagrina. Con respecto a este momento adecuado, ya que se estima que el pico de expresión del gen de la filagrina en humanos se produce aproximadamente desde las 5:00 a.m. a las 11:00 a.m., más específicamente desde alrededor de las 6:00 a.m. a las 10:00 a.m., e incluso más específicamente desde
45 aproximadamente las 7:00 a.m. a las 9:00 a.m., se cree que el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina se administra preferiblemente de 16 horas a 22 horas, más específicamente de 17 horas a 21 horas, e incluso más específicamente de 18 horas a 20 horas antes del mismo.

Dado que la expresión del gen de la filagrina fluctúa de manera cíclica aproximadamente cada 24 horas, cuando se seleccionan los agentes potenciadores de la expresión del gen de la filagrina, al comparar el nivel de expresión del gen de la filagrina durante el tiempo de expresión mínima de aproximadamente 0 horas a 10 horas, preferiblemente de 2 horas a 8 horas y más preferiblemente 4 horas a 6 horas después de administrar un agente farmacéutico candidato a células cultivadas, como queratinocitos cultivados, con el nivel de expresión del gen de la filagrina durante
55 el tiempo de expresión máxima de aproximadamente 16 horas a 22 horas, preferiblemente de 17 horas a 21 horas y más preferiblemente de 18 horas a 20 horas después de administrar el agente farmacéutico candidato, los agentes que promueven la expresión del gen de la filagrina se pueden explorar con mayor precisión. En otro aspecto adicional, los agentes potenciadores de la expresión del gen de la filagrina pueden seleccionarse utilizando el nivel de expresión del gen de la filagrina durante el tiempo de máxima expresión como un indicador. En otro aspecto, los agentes potenciadores de la expresión del gen de la filagrina pueden seleccionarse al determinar el nivel de expresión del gen de la filagrina en el momento de la máxima expresión después del segundo ciclo, tal como de 40 horas a 48 horas o
60

de 64 horas a 72 horas, como un indicador.

El extracto de *Zanthoxylum*, que es uno de los agentes farmacéuticos que demuestran el efecto del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención, es un extracto de *Zanthoxylum piperitum* que pertenece al género *Zanthoxylum* de la familia Rutaceae. El extracto de *Zanthoxylum* de la presente invención se puede obtener con métodos comunes, tales como sumergiendo o calentando a reflujo una hoja, tallo, raíz, flor, fruta, corteza, piedra o la planta completa de *Zanthoxylum*, o una mezcla de estos, con un disolvente de extracción seguido de filtración y concentración. Se puede utilizar cualquier disolvente de extracción siempre que sea comúnmente utilizado para la extracción, y los ejemplos de disolventes de extracción incluyen agua, alcoholes como metanol, etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina, alcoholes acuosos y disolventes orgánicos tales como cloroformo, dicloroetano, tetracloruro de carbono, acetona, acetato de etilo o hexano, y cada uno de ellos puede usarse solo o en combinación. Además, los extractos obtenidos mediante la extracción con los disolventes mencionados anteriormente se pueden emplear directamente, o los extractos concentrados se pueden adsorber con una columna de polímero poroso (como el Amberlite XAD-2) después de haber eliminado las impurezas utilizando un método de adsorción o resina de intercambio iónico y lo similar, seguido de elución con metanol o etanol y concentración antes del uso. Además, también se puede utilizar un extracto obtenido por extracción usando un método de partición, como una mezcla de agua y acetato de etilo. El extracto se extrae preferiblemente usando un disolvente poco irritante tal como agua, 1,3-butilenglicol o glicerina desde el punto de vista del uso en un cosmético o producto farmacéutico, tal como una preparación de uso externo que se aplica directamente sobre la piel.

Un aceite esencial se refiere a una mezcla de compuestos orgánicos insolubles a poco solubles en agua contenida en una planta, que típicamente contiene compuestos orgánicos volátiles y que puede ser aromática según la materia prima utilizada. Dado que un aceite esencial es una mezcla de compuestos orgánicos insolubles a poco solubles en agua contenida en una planta, generalmente se forma por destilación con vapor. Sin embargo, en la presente invención, no se pretende que un aceite esencial se limite a una mezcla formada por destilación con vapor, sino que se pretende que incluya extractos insolubles o poco solubles en agua que utilizan una parte del cuerpo de una planta como materia prima y que se extraen con un disolvente orgánico. Es decir, un "aceite esencial" se refiere a una mezcla de compuestos orgánicos especificados de acuerdo con la planta utilizada como materia prima (y el sitio de la misma según el caso) que demuestran el efecto deseado de la presente invención, a saber, la acción que promueve la expresión del gen de la filagrina.

El ácido 3-(1'-piperidina)propiónico (1PP), que es uno de los agentes farmacéuticos que demuestran el efecto del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención, es un compuesto representado por la fórmula molecular $C_8H_{15}NO_2$, tiene un peso molecular de 157,21 y es un sólido a temperatura normal.

Ejemplos

Ejemplo 1: Examen de la expresión del gen de la filagrina en queratinocitos derivados de la piel humana

Se diseminaron queratinocitos derivados de la piel de un adulto normal disponibles comercialmente (Cellntec AG) en una placa de cultivo a una concentración de 3×10^3 células / cm^2 , seguido de un cultivo en un medio de células epiteliales (CnT-BM.1, Cellntec AG) a 37° en una atmósfera de CO_2 al 5%. Tres días después, el medio se reemplazó con medio que contenía cortisol a 50 ng / ml, seguido de cultivo sincrónico a 37 °C y 5% de CO_2 . Dos horas más tarde, se continuó el cultivo luego de reemplazar el medio con medio ordinario, después de lo cual las células se recogieron gradualmente. El ARN se extrajo de las células recolectadas utilizando un kit de síntesis de ADNc por extracción de ARN disponible comercialmente (FastLane Cell cDNA Kit, Qiagen N.V.) para preparar el ADNc. Los niveles de expresión de la filagrina se midieron mediante PCR cuantitativa (QPCR, por su versión en inglés) utilizando este ADNc. Los niveles de expresión de los genes Clock PER3 y BMAL1 se midieron simultáneamente y se compararon con el ritmo de expresión del gen de la filagrina. Para la QPCR se utilizaron un kit de reactivos de QPCR disponible comercialmente (Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Kit, Agilent Technologies Inc.) y un sistema de medición de QPCR (MX-3000P Real-Time Quantitative PCR System, Agilent Technologies Inc.). El nivel de expresión de un gen doméstico en forma de gen RPLP0 se cuantificó para su uso como un patrón interno, y se calculó el nivel de expresión relativo con respecto a PLP0 y se lo utilizó como el nivel de expresión del gen de la filagrina. Se utilizaron filagrina comercialmente disponible y cebadores PER3, BMAL1 y RPLP0 (Perfect Real Time Primer, Takara Bio Inc.) para los cebadores de PCR. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Tabla 1 - Secuencias de cebadores

		5'→3'
Filagrina	Directo	CTCAGGCACTGGGCGCAGAC
	Inverso	GCCTGTCCGTGGGCTGACAC
PER 3	Directo	ATGCGTTACAGCACCA

	Inverso	AGGGTCCAGGGCTCACAGAA
BMAL1	Directo	CTCCAGGAGGCAAGAAGATTT
	Inverso	CTACTTGATCCTTGGTCGTTG
RPLPO	Directo	GGCGACCTGGAAGTCCAAC
	Inverso	CCATCAGCACCACAGCCTTC

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. Se observó que la expresión del gen de la filagrina fluctuaba rítmicamente durante un ciclo de aproximadamente 24 horas en un sistema celular cultivado de queratinocitos, y en los queratinocitos se encontró que el nivel de expresión del gen de la filagrina alcanzaba un máximo aproximadamente 18 horas después del inicio del cultivo sincrónico con cortisol. Se cree que este ritmo es equivalente al ritmo circadiano. Además, el ritmo de expresión del gen de la filagrina estaba en la misma fase que el ritmo de expresión del gen Clock PER3, pero estaba en la fase opuesta de BMAL1. En realidad, se ha informado que el pico de expresión de PER3 en humanos tiene lugar de 5:00 a.m. a 11:00 a.m., más específicamente de 6:00 a.m. a 10:00 a.m. y más específicamente de 7:00 a.m. a 9:00 a.m. (Documento no patente 2). Sobre la base de una comparación entre el tiempo de expresión máximo de PER3 y el tiempo de expresión máximo del gen de la filagrina como se muestra en la FIG. 2, se presume que el pico de expresión del gen de la filagrina y el pico de expresión de PER3 en humanos son aproximadamente los mismos.

Ejemplo 2: Selección de agentes farmacéuticos que promueven la expresión del gen de la filagrina

Se diseminaron queratinocitos derivados de la piel de un adulto normal disponibles comercialmente (CellIntec AG) en una placa de cultivo a una concentración de 3×10^3 células / cm^2 , seguido de un cultivo en un medio de células epiteliales (CnT-BM.1, CellIntec AG) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Tres días más tarde, el medio se reemplazó con medio que contenía cada uno de los agentes farmacéuticos candidatos a una concentración de 1% seguido por cultivo continuo a 37 °C y 5% de CO₂ y recolección de las células después de 2 horas y después de 18 horas. Los agentes farmacéuticos candidatos añadidos al medio consistían en extracto de Zanthoxylum. (Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.), aceite de geranio (Koei Kogyo Co., Ltd.), aceite de ciprés (Bioland Co., Ltd.), aceite de rosa (Bioland Co., Ltd.), aceite de gálbano (Bioland Co., Ltd.), aceite de pimienta (Bioland Co., Ltd.), aceite de albahaca (Bioland Co., Ltd.), o-toluato de metilo (Aldrich Inc.), antranilato de metilo (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), antranilato de dimetilo (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), aceite de brotes de clavo de E. caryophyllata (Bioland Co., Ltd.) y aceite de árnica (Koei Kogyo Co., Ltd.). Se utilizó la ausencia de adición de agente farmacéutico como control negativo y el cortisol (concentración en medio: 50 ng / ml) como control positivo.

El ARN se extrajo de las células recolectadas utilizando un kit de síntesis de ADNc por extracción de ARN disponible comercialmente (FastLane Cell cDNA Kit, Qiagen N.V.) para preparar el ADNc. Los niveles de expresión de filagrina se midieron mediante PCR cuantitativa (QPCR) utilizando este ADNc. Los niveles de expresión de los genes Clock PER3 y BMAL1 se midieron simultáneamente y se compararon con el ritmo de expresión del gen de la filagrina. Para la QPCR se utilizaron un kit de reactivos de QPCR disponible comercialmente (Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Kit, Agilent Technologies Inc.) y un sistema de medición de QPCR (MX-3000P Real-Time Quantitative PCR System, Agilent Technologies Inc.). El nivel de expresión de un gen doméstico en forma de gen RPLP0 se cuantificó para su uso como un patrón interno, y se calculó el nivel de expresión relativo con respecto a PLP0 y se lo utilizó como el nivel de expresión del gen de la filagrina. Las secuencias de cebadores que se muestran en la Tabla 1 se utilizaron para las secuencias de los cebadores de PCR.

La FIG. 3 muestra los niveles de expresión del gen de la filagrina a las 2 horas y 18 horas después de la adición de cada uno de los agentes farmacéuticos candidatos. El extracto de Zanthoxylum, el aceite de geranio, el aceite de ciprés, el aceite de rosa, el aceite de gálbano, el aceite de pimienta, el aceite de albahaca, el o-toluato de metilo, el antranilato de metilo y el antranilato de dimetilo demostraron potenciar la expresión del gen de la filagrina después de 18 horas en comparación con el control negativo. Por otro lado, aunque la expresión del gen de la filagrina aumentó después de 18 horas en el caso del brote de clavo y árnica, no hubo diferencias significativas entre las cantidades de esos incrementos y el control.

Ejemplo 3: Agentes farmacéuticos que promueven la expresión del gen de la filagrina

Se diseminaron queratinocitos derivados de la piel de un adulto normal disponibles comercialmente (CellIntec AG) en una placa de cultivo a una concentración de 3×10^3 células / cm^2 , seguido de un cultivo en un medio de células epiteliales (CnT-BM.1, CellIntec AG) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Tres días más tarde, el medio se reemplazó con medio que contenía ácido 3-(1'-piperidina)propiónico (1PP, Yuki Gousei Kogyo Co., Ltd.) en una concentración de 0,1%, en un medio que contenía extracto de Zanthoxylum en una concentración de 0,1%, y medio que contenía tanto 1PP al 0,1% como extracto de Zanthoxylum al 0,1%, seguido de un cultivo continuo a 37 °C y 5% de CO₂, y recolección de las células después de 18 horas. La ausencia de adición de agente farmacéutico se utilizó

como control.

5 Se extrajo ARN de las células recolectadas utilizando un kit de síntesis de ADNc por extracción de ARN disponible comercialmente (FastLane Cell cDNA Kit, Qiagen N.V.) para preparar el ADNc. Los niveles de expresión de filagrina se midieron mediante PCR cuantitativa (QPCR) utilizando este ADNc. Los niveles de expresión de los genes Clock
 10 PER3 y BMAL1 se midieron simultáneamente y se compararon con el ritmo de expresión del gen de la filagrina. Para la QPCR se utilizaron un kit de reactivos de QPCR disponible comercialmente (Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Kit, Agilent Technologies Inc.) y un sistema de medición de QPCR (MX-3000P Real-Time Quantitative PCR System, Agilent Technologies Inc.). El nivel de expresión de un gen doméstico en forma de gen RPLP0 se cuantificó para su uso como un patrón interno, y se calculó el nivel de expresión relativo con respecto a PLP0 y se lo utilizó como
 15 el nivel de expresión del gen de la filagrina. Las secuencias de cebadores que se muestran en la Tabla 1 se utilizaron para las secuencias de los cebadores de PCR. Los resultados se muestran en la FIG. 4. El 1PP a una concentración de 0,1% demostró el efecto de potenciar la expresión del gen de la filagrina que fue comparable a la del extracto de Zanthoxylum al 0,1%, mientras que el uso combinado de extracto de Zanthoxylum y 1PP además promovió la expresión del gen de la filagrina.

15 Ejemplos de formulación

Aunque a continuación se indican ejemplos de formulación del agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina según la presente invención, la formulación de la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Los siguientes ejemplos se presentan no como realizaciones de la invención, sino como ejemplos útiles para entender la invención.

Fragancia

(1) Alcohol	75,0
(2) Agua purificada	Resto
(3) Dipropilenglicol	5,0
(4) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de rosa	10,0
(5) Antioxidante	8,0
(6) Pigmento	Cantidad apropiada
(7) Absorbente ultravioleta	Cantidad apropiada

Fragancia ambiental

(1) Alcohol	80,0
(2) Agua purificada	Resto
(3) Antioxidante	5,0
(4) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de ciprés	3,0
(5) 3-metil-3-metoxibutanol	5,0
(6) Dibencilideno sorbitol	5,0

Incienso

(1) Polvo de Tabunoki	75,5
(2) Benzoato de sodio	15,5
(3) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de gálbano	5,0
(4) Aceite de eucaliptus	1,0
(5) Agua purificada	Resto

Aditivo de baño

ES 2 717 652 T3

(1) Sulfato de sodio	45,0
(2) bicarbonato de sodio	45,5
(3) Aceite de lavanda	9,0
(4) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: antranilato de metilo	1,0
Gel para masajes	
(1) Eritritol	2,0
(2) Cafeína	5,0
(3) Extracto de corteza de felodendron	3,0
(4) Glicerina	50,0
(5) Polímero de carboxivinilo	0,4
(6) Polietilenglicol 400	30,0
(7) Edetato de trisodio	0,1
(8) Copolímero de polioxileno(10)-metilpolisiloxano	2,0
(9) Escualano	1,0
(10) Hidróxido de potasio	0,15
(11) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de geranio	1,0
Crema para masajes	
(1) Parafina sólida	5,0
(2) Cera de abejas	10,0
(3) Vaselina	15,0
(4) Parafina líquida	41,0
(5) Glicol de 1,3-butileno	4,0
(6) Monoestearato de glicerina	2,0
(7) Monolaurato de sorbitano POE (20)	2,0
(8) Bórax	0,2
(9) Cafeína	2,0
(10) Antiséptico	Cantidad apropiada
(11) Antioxidante	Cantidad apropiada
(12) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: extracto de Zanthoxylum	1,0
(13) Agua purificada	Resto

Fibras aromáticas

Se agregaron microcápsulas que contenían el agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina de la presente invención (diámetro de partícula: 50 µm o menos, relación de agente farmacéutico en microcápsula: 50% en peso) y se mezclaron con una solución de celulosa de cupramonio (concentración de celulosa: 10% en peso, concentración de amonio: 7% en peso, concentración de cobre: 3,6% en peso) dentro del rango del 1% al 20% basado en el peso de celulosa, seguido de hilado en fibras de acuerdo con un método de hilado en húmedo normal y pasando por una

ES 2 717 652 T3

etapa de fregado y una etapa de secado para obtener fibras aromáticas.

Gránulos

(1) Sucralosa	0,1
(2) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: extracto de Zanthoxylum	0,1
(3) Agente saborizante	5,0
(4) Excipiente (Ceolus)	10,0
(5) Maltitol	Resto

Tabletas (masticables)

(1) Inositol	11,0
(2) Maltitol	21,0
(3) Sucrosa	0,5
(4) Extracto de bazo de salmón (Na de ADN)	0,1
(5) Extracto de levadura	0,1
(6) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de albahaca	0,1
(7) Agente saborizante	5,0
(8) Excipiente	Resto

Tabletas

(1) Lubricante (tal como éster de ácido graso de sucrosa)	1,0
(2) Solución de goma arábiga acuosa	2,0
(3) Acidificante	1,0
(4) Colorante	Cantidad apropiada
(5) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de pimienta	0,1
(6) Azúcar (tal como azúcar o sorbitol en polvo)	Resto

Caramelo

(1) Azúcar	50,0
(2) Jarabe de almidón	47,95
(3) Ácido orgánico	2,0
(4) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de rosa	0,05

Goma

(1) Azúcar	43,0
(2) Base de goma	30,95
(3) Glucosa	10,0
(4) Jarabe de almidón	16,0

(5) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: aceite de albahaca 0,05

Loción limpiadora

(1) Glicol de 1,3-butileno 6,0

(2) Glicerina 4,0

(3) Alcohol oleoso 0,1

(4) Monolaurato de sorbitano POE (20) 0,5

(5) Éster de alcohol de laurilo POE (15) 0,5

(6) Etanol 10,0

(7) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: ácido 3-(1'-piperidina)propiónico 1,0

(8) Agua purificada Resto

Loción lechosa

(1) Cera microcristalina 1,0

(2) Cera de abejas 2,0

(3) Lanolina 20,0

(4) Parafina líquida 10,0

(5) Escualano 5,0

(6) Monooleato de sorbitano POE (20) 1,0

(7) Propilenglicol 7,0

(8) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: ácido 3-(1'-piperidina)propiónico 0,5

(9) Agente potenciador de expresión del gen de la filagrina: extracto de Zanthoxylum 0,1

(10) Bisulfito de sodio 0,01

(11) 4-hidroxibenzoato de etilo 0,3

(12) Fragancia Cantidad apropiada

(13) Agua purificada Resto

Lista de secuencias

<110> Shiseido Co., Ltd.

<120> Un agente para potenciar la expresión del gen de la filagrina

<130> AB592

5 <150> JP 2012-178486

<151> 2012-08-10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 717 652 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 1
 ctcaggcact gggcgcagac 20

 5 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 2
 gcctgtccgt gggctgacac 20

 <210> 3
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 3
 atgcggttac agcagcacca 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 4
 agggtcagg gctcacagaa 20

 <210> 5
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 5
 ctccaggagg caagaagatt t 21

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 6
 ctactgatc cttggtcgtt g 21

 45 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Cebador

ES 2 717 652 T3

<400> 7
ggcgacctgg aagtccaact 20

5 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 8
ccatcagcac cacagccttc 20

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un método cosmético para potenciar la expresión del gen de la filagrina, que comprende: administrar una composición que contiene extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico a un sujeto que requiere la potenciación de la expresión del gen de la filagrina.
- 5 2. El método cosmético según la reivindicación 1, en donde la composición es un agente potenciador de la expresión del gen de la filagrina.
3. Una composición que contiene extracto de Zanthoxylum y ácido 3-3 (1'-piperidina)propiónico.
4. La composición según la reivindicación 3, que se emplea para potenciar la expresión del gen de la filagrina.
5. La composición según la reivindicación 3 o 4, que es una composición cosmética.
- 10 6. Una combinación de extracto de Zanthoxylum y ácido 3-(1'-piperidina)propiónico para uso en el tratamiento de enfermedades de la piel seca.
7. La combinación según la reivindicación 6, en donde la enfermedad de la piel seca se trata potenciando la expresión del gen de la filagrina.
- 15 8. La combinación según la reivindicación 6 o 7, en donde la enfermedad de la piel seca se selecciona del grupo que consiste en xerosis senil, dermatitis atópica e ictiosis vulgar.

20

25

30

35

FIG. 1

2 HORAS DE CULTIVO
SINCRÓNICO CON CORTISOL

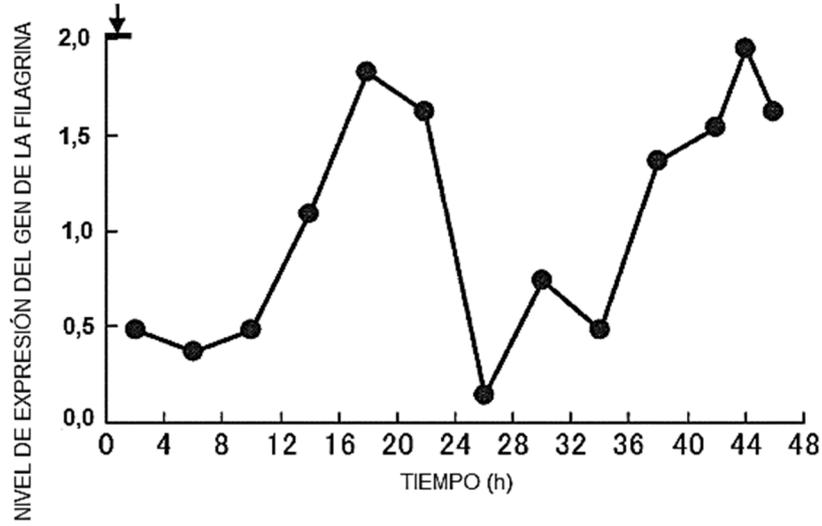


FIG. 2

2 HORAS DE CULTIVO
SINCRÓNICO CON CORTISOL

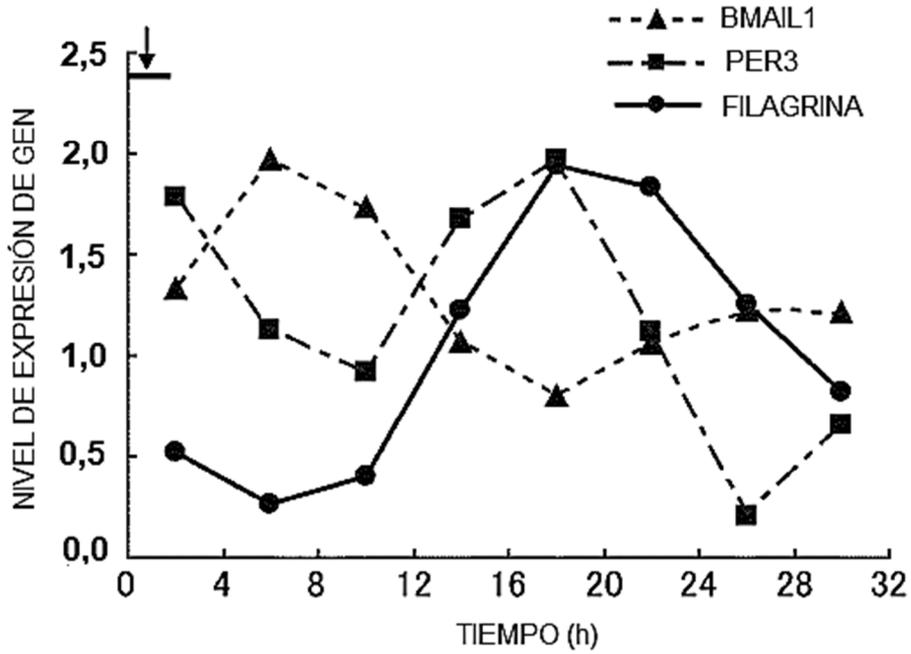


FIG. 3

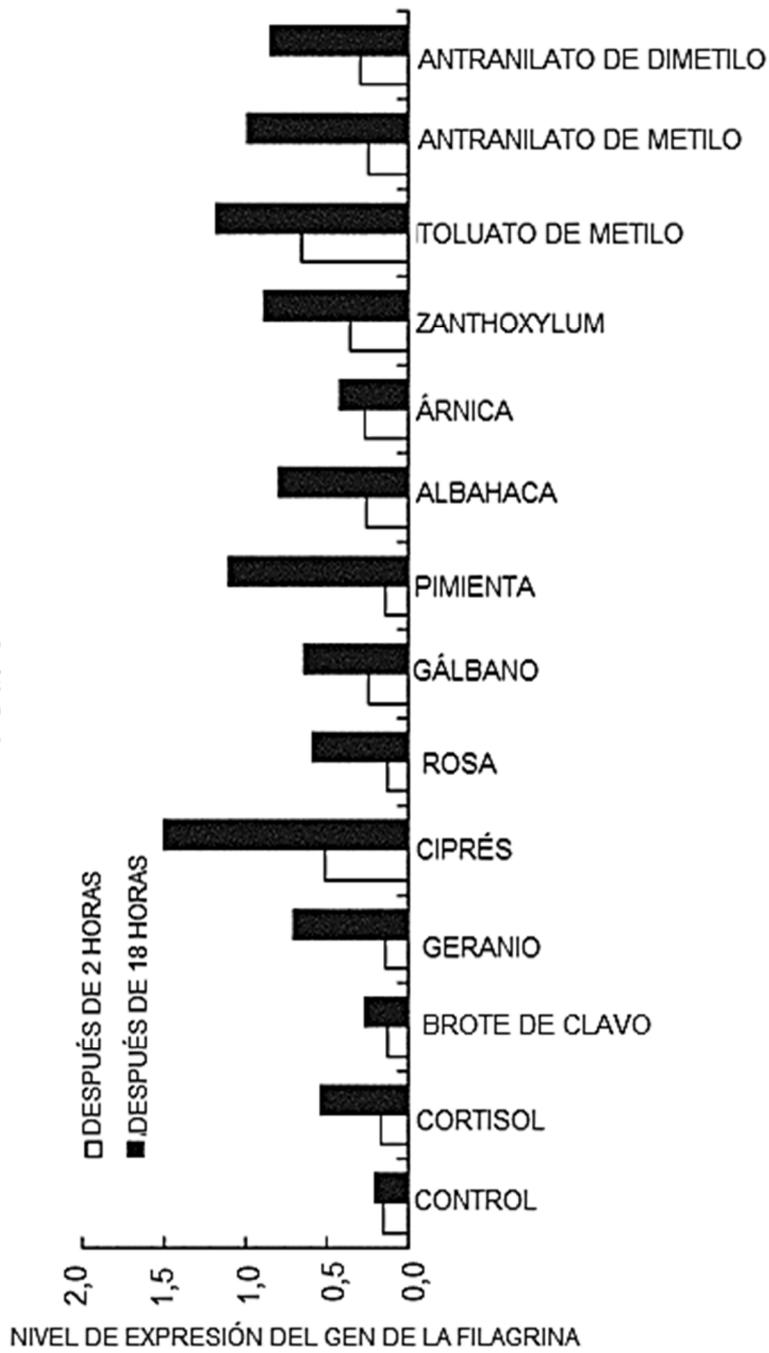


FIG. 4

