

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 836**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2008 PCT/EP2008/057129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08148891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08760698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2157966**

54 Título: **Estimulación de los receptores MC-1R, MC-2R y/o de opioide μ**

30 Prioridad:

06.06.2007 FR 0755529

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

12.11.2019

73 Titular/es:

**BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE SAS
(100.0%)
32, rue Saint-Jean-de-Dieu
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**PAIN, SABINE;
DEZUTTER, COLETTE;
ANDRE, VALÉRIE;
REYMERMIER, CORINNE;
ORLY, ISABELLE y
PERRIER, ERIC**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 730 836 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

Estimulación de los receptores MC-1R, MC-2R y/o de opioide μ

La invención se refiere a los componentes activos que estimulan la expresión de los receptores de neuromediación codificados por el gen POMC (proopiomelanocortina) y, posiblemente, que estimulan la expresión de los neuromediadores correspondientes. La invención también aborda el uso de una composición que contiene al menos una sustancia activa en la expresión de receptores de neuromediación codificados por el gen POMC a nivel cutáneo.

Comprensión actual de la materia:

Debido a sus funciones sensoriales, la piel es una fuente primordial de información para el individuo. Los nervios periféricos son responsables de la inervación de la piel y poseen axones cuyos cuerpos celulares están ubicados a lo largo de la médula espinal. La inervación cutánea incluye, entre otros, nervios sensoriales y fibras simpáticas autónomas. Las terminaciones nerviosas libres superficiales son las únicas fibras sensoriales que penetran en el interior de la epidermis. Existe un importante intercambio entre las células de la piel y los nervios cutáneos. Las células de la piel sintetizan numerosos neuromediadores que actúan sobre las neuronas de la piel (vía paracrina). Las células cutáneas también poseen receptores que corresponden a determinados neuromediadores liberados por las células nerviosas y por las propias células cutáneas; por lo tanto, pueden recibir y responder a estos neuromediadores.

El envejecimiento de la piel se asocia con una desregulación del metabolismo de las células cutáneas caracterizada por una disminución de la proliferación de los queratinocitos, una desregulación de la diferenciación de los queratinocitos, una acumulación de células muertas y una disminución de la inervación de la piel.

La alfa-MSH u hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH), la corticotropina (ACTH), la beta lipotropina (β -LPH) y las beta endorfinas son neurohormonas generadas por el único gen de la proopiomelanocortina (POMC). Se sintetizan principalmente en la hipófisis, pero también se encuentran en numerosos tejidos periféricos, tal como la piel (Wintzen M, Yaar M, Burbach JP, Gilchrist BA. *J Invest Dermatol*. Abril de 1996; 106(4):673-8.). El gen POMC y las proteínas α -MSH, ACTH, β -LPH y beta endorfina se expresan en las células dérmicas, los fibroblastos, las células de Langerhans y las células epidérmicas, los melanocitos y los queratinocitos.

A estas proteínas les corresponden receptores que también se expresan en las células de la piel. El receptor de melanocortina 1 (MC-1R o MCR-1) es el receptor de la α -MSH y la ACTH, el receptor de melanocortina 2 (MC-2R o MCR-2) es el receptor de la ACTH y el receptor de opioide μ (opioide μ R) es el receptor de la endorfina β .

En la piel, la α -MSH, la ACTH y la endorfina β inhiben la síntesis de las citocinas inflamatorias IL-1, TNF α e IL-10; por lo tanto, tienen propiedades antiinflamatorias. Además, estas mismas citocinas estimulan la síntesis de estas neurohormonas (Moustafa M, Szabo M, Ghanem GE, Morandini R, Kemp EH, MacNeil S, Haycock JW. *J Invest Dermatol*. Diciembre de 2002; 119(6): 1244-53.). Por lo tanto, existe en la piel un retrocontrol negativo de la inflamación neurocutánea.

Se sabe que α -MSH y ACTH regulan la melanogénesis al actuar sobre sus receptores respectivos en los melanocitos. α -MSH y ACTH son inductoras de la proliferación de melanocitos. Además, se sabe que la β endorfina tiene un efecto mitogénico sobre los melanocitos y que aumenta la dendricidad de los melanocitos (Kausser S, Schallreuter KU, Thody AJ, Gummer C, Tobin DJ, *J Invest Dermatol*. junio de 2003; 120(6):1073-80).

Se sabe que α -MSH y la β endorfina también se sintetizados en los queratinocitos. Estas dos proteínas inducen la proliferación y diferenciación de los queratinocitos de la piel (Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M., *Biochim Biophys Acta*. 28 de agosto de 1996; 1313(2):130-8).

Las distintas células de la piel (los queratinocitos, los melanocitos y los fibroblastos) tiene la capacidad de sintetizar otros neuromediadores, tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) de tipo neurotrofina. Los queratinocitos y los fibroblastos producen receptores para NGF, TrkA y p75NTR. Al unirse a TrkA, el NGF induce la proliferación de estas células y protege a los queratinocitos de la apoptosis. El NGF es ampliamente conocido por inducir la diferenciación neuronal y permitir su supervivencia; por lo tanto, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la densidad neuronal. Además, en ratones, se ha demostrado la presencia del ARNm de la POMC en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, lo que sugiere la participación del sistema de melanocortina y, especialmente, de la α -MSH, en la reparación de los nervios periféricos. La alfa MSH desempeñaría así un papel en la neurotroficidad (Gispén WH, Adan RA. *Ann N Y Acad Sci*. 20 de octubre de 1999; 885:342-9, van der Kraan M, Tatro JB, Entwistle ML, Brakkee JH, Burbach JP, Adan RA, Gispén WH. *Brain Res Mol Brain Res*. 8 de enero de 1999;63(2):276-86). Además, se sabe que al unirse a los receptores de opioide μ de las células nerviosas la endorfina beta y sus derivados producen una sensación de bienestar.

Hasta el momento, los profesionales han buscado modular la liberación de neuromediadores tales como la MSH α o

las β endorfinas, o imitar su papel, para afectar la homeostasis de la piel y/o mejorar la innervación de la piel.

Además, los profesionales habitualmente buscan combatir los efectos del envejecimiento cutáneo a través de distintas rutas metabólicas que no son todas comparables. Sin embargo, hoy día quedan nuevos caminos por explorar.

5 Una solicitud de patente anterior, el documento WO2007/039058, ha divulgado el uso general de antagonistas de los receptores opioides para regular a la baja la expresión de los receptores de opioides en los melanocitos. Otra solicitud de patente anterior, el documento US2004/0214851, ha divulgado un método para aumentar la expresión de receptores de opioides para diagnóstico y/o utilidad terapéutica, por lo tanto, solo en tejidos dañados. Por lo tanto, estas divulgaciones no proporcionan soluciones para combatir los efectos del envejecimiento cutáneo como se definió anteriormente o como se describe más adelante en el presente documento.

10 **Objetivos de la invención:**

Los inventores han buscado modos innovadores de restablecer la innervación de la piel o de mantener o estimular la homeostasis de las células de la piel como parte del contexto general del envejecimiento.

El objetivo principal de la invención es proporcionar al menos una sustancia activa, especialmente a nivel cutáneo, para:

- 15
- Estimular la homeostasis celular, en particular favoreciendo la proliferación de queratinocitos, para permitir la reepitelización,
 - Restablecer o mantener directa o indirectamente la innervación de la piel, para permitir el mantenimiento de la red neurítica de la epidermis y procurar una sensación de bienestar.

20 Todo esto para prevenir y/o combatir los efectos de estrés que inducen las variaciones observadas durante el envejecimiento cutáneo, por ejemplo, cuando el envejecimiento es fotoinducido o cronológico.

Así, uno de los objetivos de la presente invención es prevenir y/o combatir la pérdida de propiedades de la piel, particularmente de la epidermis.

La presente invención también pretende proporcionar una sustancia que permita la inducción en cascada de la síntesis de otros mediadores implicados en la innervación y la epitelización de la piel.

25 La presente invención también pretende proporcionar una sustancia para prevenir y/o combatir la pérdida de troficidad a nivel cutáneo.

La presente invención también pretende proporcionar sustancias activas tales como las descritas anteriormente en el campo de los cosméticos.

30 Un objetivo notable de la presente invención es proporcionar sustancias activas aplicables de forma tópica y/o nutracéutica que sean un extracto vegetal.

Sumario de la invención:

35 Entre los caminos innovadores explorados por los inventores para paliar los problemas técnicos mencionados anteriormente y alcanzar los objetivos de la presente invención, los inventores han descubierto que era particularmente interesante aumentar la expresión de al menos un receptor de al menos un mediador codificado por el gen POMC a nivel cutáneo.

Los métodos de identificación de componentes activos se basan en la inducción de la expresión de las hormonas α MSH o β endorfina, o en la adición de sustancias que imitan la acción de estas neurohormonas pero que no provocan en modo alguno la expresión de los receptores de estas hormonas.

40 Los inventores han descubierto que había una disminución de aproximadamente 4 veces de la expresión a nivel de los genes de los receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R, y un aumento de alrededor de 5 veces del gen POMC en los queratinocitos durante el proceso de envejecimiento cronobiológico.

La presente divulgación se refiere a las sustancias que estimulan la expresión de al menos uno de los 3 receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R, particularmente a nivel cutáneo, para mejorar el efecto del neuromediador que permitirá, así, la inducción en cascada de la síntesis de otros mediadores implicados en la innervación y la epitelización de la piel.

45 La divulgación se refiere al menos a una sustancia que estimula la expresión de al menos uno de los genes de los 3

receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R, particularmente a nivel cutáneo, para mantener o estimular la homeostasis celular a nivel cutáneo y para restablecer la inervación de la piel.

- 5 Por estimulación de la expresión de al menos un receptor MC-1R, MC-2R o receptor de opioide μ , los inventores se refieren a la estimulación, posiblemente parcial, de al menos un gen que codifica la proteína MC-1R, MC-2R u opioide μ R, respectivamente, pero también a la estimulación, posiblemente parcial, de la síntesis de al menos la proteína MC-1R, MCR2 o el receptor de opioide μ de los respectivos mensajeros de ARN, así como a la estimulación, posiblemente parcial, de la actividad de las proteínas MC-1R, MC-2R u opioide μ R.

En el caso del combate del envejecimiento, es preferente estimular la expresión de los genes receptores alrededor de 4 veces.

- 10 En el caso del combate del envejecimiento, es preferente estimular la expresión de las proteínas MC-1R, MC-2R u opioide μ R alrededor de 5 veces.

Por el término "restablecer" los inventores se refieren, en referencia a un parámetro, el hecho de regresar de un nivel de este parámetro inferior o superior a lo que sería deseable para un buen funcionamiento fisiológico a un nivel fisiológico que sea más favorable para el sujeto en cuestión.

- 15 Por la expresión "procurar una sensación de bienestar", los inventores se refieren al bienestar provocado por la liberación de beta endorfinas que se adhieren fácilmente al receptor opioide μ .

La presente divulgación se refiere en particular a la estimulación de la expresión del gen MC-1R y/o el gen MC-2R, y/o el gen del opioide μ R, y/o las proteínas que codifican respectivamente estos genes, especialmente en seres humanos.

- 20 La presente divulgación también se refiere particularmente a la modulación de los productos del gen POMC así como a los receptores MC-1R y/o MC-2R, y/u opioide μ R, para aumentar la eficacia de los complejos de receptor-ligando; por lo tanto, los componentes activos que también modulan la expresión del gen POMC siguen siendo preferentes. En el caso del combate del envejecimiento es posible inhibir la expresión del gen POMC alrededor de 5 veces, pero es preferente mantener o aumentar la expresión del gen POMC de acuerdo con la invención para mejorar los efectos de los neuromediadores.

- 25 La estimulación debe ser, preferentemente, lo suficientemente eficaz para permitir la estimulación de la proliferación y/o la diferenciación de las células cutáneas que se tienen como objetivo, que expresan al menos uno de estos receptores, y/o restablecer la inervación de la piel al menos parcialmente.

- 30 Los componentes activos que permiten obtener una expresión igual a al menos alrededor de 1,2 veces y preferentemente al menos alrededor de 2 veces la expresión de los genes de MC-1R, MC-2R y/o del receptor opioide μ en un modelo que comprende al menos un tipo celular que presenta la expresión de estos receptores en contacto con estos componentes activos, en comparación con el nivel de expresión de estos receptores en un modelo de control (uno no puesto en contacto con los componentes activos), se consideran que estimulan o activan de forma eficaz los genes de los receptores mencionados anteriormente

- 35 Los componentes activos que permiten obtener una expresión igual a al menos aproximadamente 1,1 veces y ventajosamente 1,2 veces la expresión de las proteínas de MC-1R, MC-2R y/u opioide μ R en un modelo que comprende al menos un tipo celular que presenta la expresión de estos receptores en contacto con estos componentes activos, en comparación con el nivel de expresión de estos receptores en un modelo de control (uno no puesto en contacto con los componentes activos), se consideran que estimulan o activan de forma eficaz la expresión de los receptores mencionados anteriormente.

- 40 De acuerdo con el método de ejecución, la expresión de los genes MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ , y/o las proteínas MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ se activan o estimulan en los queratinocitos. Posiblemente, es preferente mantener o estimular el gen POMC y/o los neuromediadores codificados por el gen POMC en los queratinocitos.

- 45 De acuerdo con otro método de ejecución, la expresión de al menos uno de estos receptores expresados se aumenta en los queratinocitos para disminuir la respuesta inflamatoria, especialmente como parte de una patología relacionada con una hiperproliferación de estas células cutáneas.

La presente descripción también describirá un método de identificación de una sustancia activa que modula la proliferación y diferenciación de al menos un tipo de células vivas capaces de expresar MC-1R, MC-2R y/o el receptor opioide μ caracterizado, caracterizado por que incluye:

- 50 - La puesta en contacto de la sustancia activa con al menos un tipo de células vivas capaces de expresar MC-1R,

MC-2R y/o el receptor de opioide μ , y posiblemente el gen POMC;
- El análisis de la expresión de MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ , con el objetivo particular de identificar una sustancia activa moduladora, preferentemente estimulante de la expresión de MC-1R, MC-2R y/o el receptor de μ .

5 Preferentemente, el análisis de la expresión de los genes de los receptores MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ , y posiblemente del gen POMC, se lleva a cabo mediante análisis cualitativo y/o cuantitativo de la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ .

10 Preferentemente, la RT-PCR incluye el uso de cebadores que hibridan con al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de ADN complementaria con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 para amplificar al menos una parte de la secuencia de nucleótidos que codifican MC-1R, MC-2R, el receptor de opioide μ , y posiblemente el gen POMC.

SEQ ID NO: 1: MC-1R NM_002386
SEQ ID NO: 2: MC-2R NM_000529
SEQ ID NO: 3: receptor de opioide μ NM_000914
SEQ ID NO: 4: POMC NM_000939

15 Las células vivas son queratinocitos extraídos especialmente de la piel de un sujeto humano adulto, teniendo esta piel una localización específica (abdomen, pecho, etc.). Para las pruebas del tipo celular del grupo de sujetos en estudio es preferente utilizar las denominadas células "normales"; es decir, por ejemplo, células no transformadas (tumoraes o modificadas genéticamente) y significativamente representativas.

20 Preferentemente, las categorías de edad se crean para establecer una relación edad/genética y una relación edad/síntesis de proteína. Los sujetos denominados jóvenes tienen entre 17 y 40 años; los sujetos denominados intermedios tienen entre 40 y 50 años, y los sujetos mayores tienen más de 50 años.

25 Preferentemente, el método de identificación comprende una etapa de análisis de la expresión de las proteínas MC-1R (34,7 kDa), MC-2R (33,9 kDa) y/o del receptor de opioide μ (44,8 kDa) a través del método de transferencia de proteínas de un gel a una membrana de nitrocelulosa (transferencia de Western), especialmente para detectar la modulación de la expresión de las proteínas correspondientes cuando la sustancia activa está en contacto con las células vivas mencionadas anteriormente.

De acuerdo con el método de ejecución, el tipo de células vivas capaces de expresar MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ , son queratinocitos. En este caso, se buscan los componentes activos que estimulan o aumentan la expresión de MC-1R, MC-2R y/o el receptor de opioide μ , y que posiblemente disminuyan la expresión del gen POMC.

30 Preferentemente, en la actuación sobre los queratinocitos, la sustancia activa induce un aumento en cascada de la síntesis de NGF y VEGF y, por lo tanto, estimula la inervación (densidad y dendricidad de las neuronas) y la neoangiogénesis, respectivamente.

35 Un segundo aspecto de la divulgación se refiere al uso de una sustancia activa como se describe anteriormente, como sustancia activa en una composición cosmética, para estimular la síntesis de las proteínas MC-1R y/o MC-2R, y/o del receptor opioide μ , especialmente para inducir la proliferación y/o la diferenciación, y/o la maduración de los queratinocitos.

40 La invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere al uso de una sustancia activa, como se describe anteriormente, como una sustancia activa en una composición cosmética para prevenir y/o combatir los efectos de estrés que inducen las variaciones observadas durante el proceso de envejecimiento cutáneo, o prevenir y/o combatir la disminución de la homeostasis epidérmica como parte del contexto general del envejecimiento, o para mejorar la proliferación y diferenciación celulares a nivel epidérmico, o para generar una sensación de bienestar.

La cantidad eficaz de sustancia activa a la que se hace referencia la determina el profesional a través de la simple experiencia de rutina.

Descripción detallada de la invención:

45 Los inventores han demostrado por primera vez que la expresión de los receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R disminuyen durante el proceso de envejecimiento cutáneo cronobiológico cuando estos receptores se expresan en queratinocitos en la piel humana.

Los inventores también han identificado por primera vez que la expresión del gen POMC aumenta durante el envejecimiento cutáneo cronobiológico, especialmente en los queratinocitos de la piel humana.

Los inventores han descrito, así, un proceso de exploración en queratinocitos para permitir la búsqueda de activos entre extractos vegetales, estimulando en particular la expresión de los ARNm que codifican los receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R, y posiblemente manteniendo, estimulando o inhibiendo la expresión de los ARNm que codifican a los neuromediadores que codifica el gen POMC. Los activos seleccionados se probaron después sobre la expresión de las proteínas correspondientes a los ARNm.

Los inventores también han caracterizado la expresión de los receptores MC-1R, MC-2R y de opioide μ en queratinocitos. Solo el ARNm de MC-2R se ha identificado anteriormente en los queratinocitos (Moustafa M, Szabo M, Ghanem GE, Morandini R, Kemp EH, MacNeil S, Haycock JW., J Invest Dermatol. Diciembre de 2002; 119(6): 1244-53.), por lo tanto, los inventores son los primeros en identificar la proteína MC-2R en queratinocitos, los que implica el hecho de que la ACTH lleva a cabo su actividad no solo uniéndose a MC-1R en los queratinocitos, sino también al unirse a MC-2R.

Por lo tanto, la presente divulgación describe el uso de una sustancia que estimula la expresión de al menos un gen que codifica un receptor de un neuromediador que codifica el gen POMC elegido de MC-1R, MC-2R y opioide μ R en al menos un tipo de células de la piel que expresen al menos uno de estos receptores. La presente divulgación describe el uso de una sustancia como la sustancia activa para la preparación de una composición para fomentar al menos una interacción de un neuromediador elegido de alfa-MSH, ACTH y beta-endorfina, con sus respectivos receptores.

Los activos seleccionados se han incorporados en cosméticos, composiciones, en particular, para la aplicación en la prevención y/o el combate de la disminución del espesor epidérmico, durante el envejecimiento cutáneo cronobiológico o fotoinducido.

Preferentemente, la sustancia mencionada anteriormente aumenta o estimula la expresión de un gen que codifica un receptor de un neuromediador codificado por el gen POMC para combatir o prevenir una desregulación del equilibrio entre el ligando y el receptor en los queratinocitos.

Preferentemente, las sustancias mencionadas anteriormente aumentan o mantienen la expresión del gen POMC para aumentar los efectos mencionados anteriormente de la alfa-MSH, la ACTH y la beta-endorfina.

Dicha sustancia aumenta la expresión de al menos un receptor de un neuromediador codificado por el gen POMC en queratinocitos, para prevenir y/o combatir los efectos de estrés que inducen las variaciones observadas durante el envejecimiento cutáneo.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a la estimulación de estos receptores, en particular para paliar una desregulación, especialmente una disminución de la interacción de la alfa-MSH y/o la ACTH, y/o la beta-endorfina con sus receptores respectivos, vinculada al envejecimiento celular y que afecta a los queratinocitos.

La sustancia que estimula la expresión de los receptores MC-1R y/o MC-2R, y/o de opioide μ en queratinocitos es un extracto vegetal de *Achillea millefolium* (milenrama común).

De acuerdo con una realización preferente, el extracto vegetal se obtiene preferentemente macerando dicha planta (preferiblemente raíces, rizomas, tallos, corteza, flores, frutas, semillas, germen u hojas) al 1-10 % (p/p), habitualmente al 1-5 % en un disolvente o una mezcla de disolventes, habitualmente una mezcla de agua y alcohol, glicol o poliol (tal como etanol, glicerol, butilenglicol y otros glicoles, xilitol, etc.) de 100/0 a 0/100, y preferentemente en agua. Los extractos obtenidos finalmente se filtran o se destilan para recuperar la parte soluble, que después se filtra, preferentemente a 0,45 μ m.

Las sustancias activas mencionadas anteriormente se usan preferentemente en las composiciones cosméticas en una cantidad comprendida entre el 0,01 % y el 5 % (v/v) para extractos vegetales.

La sustancia activa mencionada anteriormente se puede utilizar en combinación con otra sustancia activa elegida del grupo que consiste en:

- componentes activos que estimulan la troficidad de los nervios cutáneos y/o que activan los nervios cutáneos sensitivos, como, por ejemplo, los citados en la solicitud de patente FR 2825273, extracto de pimentón (*Capsicum annuum*), pigmento rojo (pimiento rojo) o pimienta (*Piper nigrum*), o glutamilamidoetilindol (Exsymol);
- los componentes activos que imitan el efecto de la beta endorfina para mejorar la función de barrera de la piel, como, por ejemplo, los citados en la solicitud de patente US 2006069032, extracto de cáscara de grano de cacao;
- Los componentes activos que estimulan la síntesis de la beta endorfina para proporcionar una sensación de bienestar, por ejemplo, Tefrolina, de la planta *Tephrosia purpurea* (Soliance);
- Los componentes activos que estimulan la proliferación celular y/o la diferenciación celular, destinados a tener actividad anti envejecimiento, tales como las siguientes moléculas: NGF, α -MSH, β endorfina, o derivados, por ejemplo los descritos en la solicitud de patente FR 2857874, P3-endorfina.

- componentes activos que protegen al factor de crecimiento de fibroblastos contra la degradación, especialmente FGF2, tal como el extracto vegetal descrito en la solicitud de patente presentada por el solicitante publicada como el documento GB244036, en particular extracto de *Hibiscus Abelmoscus*;
- 5 - componentes activos que estimulan la actividad y/o la proliferación de fibroblastos, tal como un péptido fermentado de soja, como un producto comercializado por el solicitante con el nombre comercial Phytokine™, opcionalmente en combinación con un extracto de *Hibiscus abelmoscus*;
- componentes activos que estimulan la hialuronasa sintasa, especialmente la hialuronasa sintasa 2 como se describe en la patente FR2893252,
- 10 - componentes activos que estimulan la actividad y/o la síntesis de una lisil oxidasa como LOXL, tal como los componentes descritos en la patente número FR2855968, en particular extracto de eneldo para la estimulación de las fibras elásticas.
- componentes activos con propiedades antiinflamatorias, tales como los que inhiben PLA2 y, en particular, los componentes descritos en la patente FR2847267, y especialmente un extracto de raíces de *Pueraria lobata* (Inhipase®);
- 15 - sustancias activas que permiten un cambio del color de la piel, tales como componentes activos para aclarar y/o blanquear la piel;
- sustancias activas con propiedades drenantes, como el laurato de hesperitina (Flavagrum®), o caprilato de quercitina (Flavenger®).

20 Los compuestos utilizados de acuerdo con la presente invención se preparan en forma de composiciones cosméticas tópicas. Por lo tanto, para estas composiciones, el excipiente contiene, por ejemplo, al menos un compuesto elegido del grupo que consiste en conservantes, emolientes, emulsionantes, tensioactivos, humectantes, espesantes, suavizantes, agentes matificantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes texturizantes, agentes de brillo, agentes filmogénicos, solubilizantes, pigmentos, colorantes, perfumes y filtros solares. Estos excipientes se eligen preferentemente del grupo que consiste en aminoácidos y sus derivados, poligliceroles, ésteres, polímeros y derivados de celulosa, derivados de lanolina, fosfolípidos, lactoferrinas, lactoperoxidasas, estabilizantes a base de sacarosa, vitamina E y sus derivados, ceras naturales y sintéticas, aceites vegetales, triglicéridos, insaponificables, fitoesteroles, ésteres vegetales, siliconas y sus derivados, hidrolizados de proteína, aceite de jojoba y sus derivados, ésteres lipo/hidrosolubles, betaínas, aminoxidos, extractos vegetales de éster de sacarosa, dióxidos de titanio, glicinas, parabenos e incluso más preferentemente del grupo que consiste en butilenglicol, steareth-2, steareth-21, glicol -15

25 estearil éter, alcohol cetearílico, fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, butilenglicoles, tocoferoles naturales, glicerina, fosfato de sodio dihidroxietilo, isopropil hidroxietil éter, estearato de glicol, triisononanoína, cocoato del octilo, poliacrilamida, isoparafina, laureth-7, carbómero, propilenglicol, glicerol, bisabolol, dimeticona, hidróxido de sodio, PEG 30-dipolihidroxiesterato, triglicéridos de caprílico/cáprico, octanoato de cetearilo, dibutil adipato, aceite de semilla de uva, aceite de jojoba, sulfato de magnesio, EDTA, ciclometicona, goma de xantano,

30 ácido cítrico, lauril sulfato de sodio, ceras y aceites minerales, isoestearato de isoestearilo, dipelargonato de propilenglicol, isoestearato de propilenglicol, PEG 8, cera de abejas, glicérido del aceite de semilla de palma hidrogenado, aceite de lanolina, aceite de sésamo, lactato de cetilo, alcohol de lanolina, dióxido de titanio, lactosa, sacarosa, polietileno de baja densidad y solución salina isotónica.

40 Idealmente, los compuestos mencionados anteriormente se formulan en una forma elegida del grupo que consiste en una solución acuosa o a base de aceite, una crema o gel a base de agua o un gel oleoso, habitualmente en un frasco o un tubo, particularmente un gel de ducha, champú, leche, emulsión, microemulsión o nanoemulsión, particularmente de aceite en agua o agua en aceite, o múltiples a base de silicona; una loción, particularmente en un recipiente de vidrio o plástico de un recipiente de pulverizador o aerosol, un envase alveolado, jabón líquido, una barra de jabón dermatológico, una pomada, muses, un producto anhidro, preferentemente líquido, en crema o sólido, por ejemplo, en

45 forma de barra, particularmente en forma de barra de labios.

La expresión "aplicación tópica" utilizada en este caso, significa aplicar o pulverizar la composición de la presente invención sobre la superficie de la piel.

50 Los profesionales conocen numerosos principios cosméticos activos para mejorar la salud y/o el aspecto físico de la piel. Los profesionales saben cómo formular composiciones cosméticas para obtener los mejores efectos. Además, los compuestos descritos en la presente invención pueden tener un efecto sinérgico cuando se combinan entre sí. Estas combinaciones también están abarcadas por la presente invención. El CTFA Cosmetic Ingredients Handbook, segunda edición (1992), describe distintos ingredientes cosméticos y farmacéuticos utilizados actualmente en la industria cosmética y farmacéutica que están particularmente adaptados al uso tópico. Los ejemplos de estos tipos de

55 ingredientes incluyen, pero sin limitación, los siguientes compuestos: abrasivos, compuestos absorbentes, compuestos con fines estéticos tales como perfumes, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, astringentes, etc. (por ejemplo: aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo y destilado de hamelis), agentes antiacné, agentes antifloculantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, butilcarbamato de yodopropilo), los antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tampón, agentes de hinchamiento, quelantes, aditivos, agentes biocidas, desnaturalizantes, analgésicos externos, materiales formadores de película,

60 polímeros, agentes opacificantes, ajustadores de pH, agentes reductores, agentes despigmentantes o aclarantes (por ejemplo: hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil glucosamina), agentes

acondicionadores (por ejemplo: humectantes), agentes calmantes para la piel y/o agentes cicatrizantes (por ejemplo: pantenol y sus derivados, por ejemplo, etil pantenol), aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoina, bisabolol y glicirricinato dipotásico), espesantes, vitaminas, y los derivados o equivalentes de estos.

En las figuras:

- 5 La Figura 1 muestra una disminución significativa de la expresión de los genes de los receptores MC-1R, MC-2R y el receptor de opioide μ en biopsias humanas, en queratinocitos durante el proceso de envejecimiento.
 La Figura 2 muestra una disminución significativa de la expresión de tubulina β III y de neurofilamentos 200 a través de un método de inmunofluorescencia en cortes de biopsia de piel humana normal.
 Las figuras 3 y 4 representan las tasas relativas de expresión de tubulina β III y de neurofilamentos 200, respectivamente, en sujetos de edades comprendidas entre los 15 y 75 años.
 10 Las figuras 5 y 6 representan el análisis estadístico correspondiente a los estudios presentados en las figuras 3 y 4, respectivamente.

- Otros objetivos, características y beneficios de la invención se harán evidentes para los profesionales al leer la descripción explicativa que se refiere a los ejemplos dados únicamente con fines ilustrativos y que no deben limitar de
 15 ninguna manera el alcance de la invención.

Los ejemplos son una parte integral de la presente invención y cualquier característica que parezca nueva en comparación con cualquier técnica anterior de la descripción tomada en su totalidad, incluyendo los ejemplos, es una parte integral de la invención en su función y generalidad.

Por lo tanto, cada ejemplo tiene un alcance general.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Demostración de una caída en el nivel de expresión de las proteínas MC-1R, MC-2R y receptor de opioide μ en biopsias humanas a través de inmunohistoquímica durante el proceso de envejecimiento

- Los inventores han demostrado una variación de la expresión de MC-1R, MC-2R y receptores de opioide μ a nivel proteico durante el proceso de envejecimiento cronobiológico en biopsias tomadas de mujeres jóvenes (menores de
 25 40 años) y mujeres de edad avanzada (mayores de 50 años). (véase la figura 1: Expresión de receptores en biopsias humanas de pacientes humanos de 30 o 60 años, resultados de inmunohistoquímica)
 Este estudio se implementó utilizando un estudio de inmunohistología.
 Esta demostración se obtuvo sin ambigüedad gracias al uso de los anticuerpos anti-MC-1R (1/500), anti-MC-2R (1/200) y anti-receptor opioide μ (1/1000).
 30 El modelo de piel reconstruida (Mimeskin®, Coletica, Lyon, Francia) y las biopsias se prepararon para inmunomarcajes en cortes transversales congelados o después del sellado en parafina.

- Los anticuerpos utilizados son los siguientes: anti-MC-1R, anti-MC-2R y anti-receptor de opioide anti μ (Chemicon International). La detección se realiza con un anticuerpo secundario conjugado apropiado.
 Los resultados mostrados en la Figura 1 prueban que la expresión a nivel de los genes de los receptores MC-1R, MC-
 35 2R y opioide μ R disminuye en los queratinocitos con el envejecimiento.

Ejemplo 2: Demostración de una caída en el nivel de expresión de los genes de MC-1R, MC-2R y receptor opioide μ y de un aumento en la expresión del gen POMC en queratinocitos adultos durante el proceso de envejecimiento, a través del método de RT-PCR en tiempo real

- La invención también se ocupa de la variación de la expresión de los genes de los receptores MC-1R, MC-2R y opioide
 40 μ R, y de la variación de la expresión del gen POMC durante el proceso de envejecimiento cronobiológico en queratinocitos tomados de biopsias humanas. La expresión de los cuatro genes de interés, así como de la actina, se ha analizado mediante RT-PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa). Esta técnica permite la cuantificación precisa de la expresión de un gen relacionándola con la de la actina (considerada como constante). La regulación del nivel de expresión de este gen puede, así, cuantificarse.
 45 El ARN total se purifica con el kit "SV 96Total RNA Isolation System" kit (Promega, Charbonnières, Francia). El ARN purificado se suspende en 100 μ l de agua sin ARNasa (Promega, Charbonnières, Francia), se mide y divide en placas (placas de microtitulación de 96 pocillos, 10 μ l de ARN total a 5 ng/ μ l por PCR). Los iniciadores seleccionados para su uso en este proyecto son los siguientes y materia de la tabla I:

Tabla I:

Actina sentido (SEQ ID NO: 5)	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
Actina antisentido (SEQ ID NO: 6)	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC
MC-1R sentido (SEQ ID NO: 7)	GGGCTCTGAGAACGACTTTT
MC-1R antisentido (SEQ ID NO: 8)	CCGGGCTCCTGTCTGGTTGG
MC-2R sentido (SEQ ID NO: 9)	TCACGTCGCTGTTCCCGCTGAT
MC-2R antisentido (SEQ ID NO: 10)	AAGAGAGACATGTAGCAGGCGCAGTA
receptor opioide μ sentido (SEQ ID NO: 11)	CTCAGCCAGGACTGGTTTCTGTAAGA
receptor opioide μ antisentido (SEQ ID NO: 12)	TGGGACAGGTTGCCATCTAAGTG
POMC sentido (SEQ ID NO: 13)	CGCCAGTGAAGGTGTACCC
POMC antisentido (SEQ ID NO: 14)	GGCGTCTGGCTCTTCTCGGAGGTC

5 La técnica de RT-PCR en tiempo real se realiza con el kit "Quanti Tect SYBR Green RT-PCR" (Qiagen, Francia) en placas que contienen ARNm, en un termociclador OPTICON, que lleva a cabo ciclos de amplificación. La retrotranscripción (RT) tiene lugar durante 30 minutos a 50 °C, seguido de 15 minutos a 95 °C para inhibir la transcriptasa inversa, activar la polimerasa y alterar el ADN complementario (ADNc) obtenido. Se llevan a cabo 50 ciclos de polimerización de secuencia (PCR) (15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 30 segundos a 72 °C). Al final de cada ciclo, se lee la fluorescencia, la cual es proporcional al número de fragmentos. El nivel de expresión se define por el nivel de expresión de cada gen en comparación con la actina.

10 Los inventores han demostrado que la expresión del gen de MC-1R es de 4 veces menos expresado en mujeres de más de 52 años en comparación con las mujeres jóvenes, y esto de una manera estadísticamente significativa.

Los inventores han demostrado que la expresión del gen de MC-2R es de 8 veces menos expresado en mujeres de más de 5 años en comparación con las mujeres jóvenes, y esto de una manera estadísticamente significativa.

15 Los inventores han demostrado que la expresión del gen del receptor de opioide μ es de 6,5 veces menos expresado en mujeres de más de 55 años en comparación con las mujeres jóvenes, y esto de una manera estadísticamente significativa.

Los inventores han demostrado que la expresión del gen de POMC es de 5 veces más expresado en mujeres de más de 50 años en comparación con las mujeres jóvenes, y esto de una manera estadísticamente significativa.

20 En conclusión, la invención permite la demostración de una alteración del equilibrio entre la expresión de los receptores y su ligando en queratinocitos humanos a favor de un aumento del ligando y de una disminución de todos los receptores.

Ejemplo 3: Análisis de la expresión de los ARN mensajeros de los receptores MC-1R, MC-2R y opioide μ R y de los ARNm de POMC, por ejemplo, a través de RT-PCR cuantitativa con o sin la puesta en contacto de componentes activos con queratinocitos

25 La divulgación describe, en particular, un método para explorar nuevas moléculas capaces de inducir la síntesis de los 3 receptores MC-1R, MC-2R y/u opioide μ R, con el objetivo de restablecer una expresión fisiológica, tal como la encontrada en los queratinocitos de la piel joven, de los receptores observados en los queratinocitos envejecidos en la piel reconstruida, en biopsias de piel humana.

El componente activo es de origen vegetal.

30 En particular, los extractos vegetales se obtiene macerando las plantas (preferentemente raíces, rizomas, tallos, corteza, flores, frutas, semillas, germen u hojas) al 1-10 % (p/p), habitualmente al 1-5 % en un disolvente o una mezcla de disolventes, habitualmente una mezcla de agua y alcohol, glicol o poliol (tal como etanol, glicerol, butilenglicol y otros glicoles, xilitol, etc.) de 100/0 a 0/100, y preferentemente en agua. Después, los extractos obtenidos se filtran o se destilan para recuperar la parte soluble, que después se filtra, preferentemente a 0,45 μ m.

35 El componente activo se analiza en cuanto a los queratinocitos después de la disolución en el medio de cultivo: habitualmente entre el 0,1 % y el 2 % (v/v) para plantas. Los resultados presentes se obtienen con el 1 % en el medio de cultivo para el extracto vegetal.

Los queratinocitos tomados de cirugías plásticas en adultos normales a través de digestión enzimática se amplificaron en un medio específico para queratinocitos y después se sembraron, por ejemplo, a 50.000 por cm^2 en placas de 24 pocillos, y se cultivaron en una única capa en un medio definido sin suero. Cuando están en confluencia, las células

se ponen en contacto con activos diluidos en el medio de cultivo, habitualmente durante 24 horas.

En paralelo, un control no tratado (medio solo) y 3 controles positivos (TGF- β a 1 ng/ml, IL-1 α a 50 pg/ml y TNF- α a 100 ng/ml) se llevan habitualmente a cabo, por ejemplo en la misma placa de cultivo.

5 Se probaron previamente TGF- β a 1 ng/ml, TNF- α a 100 ng/ml e IL-1 α a 50 pg/ml y se verificó la estimulación de la síntesis de ARNm de los 3 receptores inducida por estas 3 citocinas a estas concentraciones mediante un análisis de ARNm, por ejemplo, mediante RT-PCR cuantitativa ($\times 2$ o $\times ,08$ para los 3 inductores).

10 Después del tiempo de contacto de los activos con las células, por ejemplo 24 horas, se eliminan los medios y se conservan las células, por ejemplo, mediante liofilización a -80 °C después de lavar con una solución de fosfato a pH 7,4. Se extrae el RNA total, por ejemplo, utilizando un kit de extracción de 96 pocillos en columnas de sílice y dividido en un espectrofotómetro de 96 pocillos a 260 nm (indicador de pureza: dosificación de proteínas a 280 nm). El ARN se diluye, por ejemplo a 5 ng/ μ l. Se lleva a cabo RT-PCR cualitativa en 1 etapa, por ejemplo, sobre 50 ng de ARN inicial en una placa de 96 pocillos, sobre los genes de actina, MC-1R, MC-2R, opioide μ R y POMC. Se utilizan los cebadores específicos de cada gen, por ejemplo a 0,5 μ M, especificados en la tabla I anterior.

15 Los parámetros de amplificación han sido habitualmente los siguientes: La técnica de RT-PCR en tiempo real se realiza con el kit "Quanti Tect SYBR Green RT-PCR" (Qiagen, Francia) en pocillos que contienen ARNm, en un termociclador OPTICON, que lleva a cabo ciclos de amplificación. La retrotranscripción (RT) tiene lugar durante 30 minutos a 50 °C, seguido de 15 minutos a 95 °C para inhibir la transcriptasa inversa, activar la polimerasa y alterar el ADN complementario (ADNc) obtenido. Se llevan a cabo 50 ciclos de polimerización de secuencia (PCR) (15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C). Al final de cada ciclo, se lee la fluorescencia, la cual es proporcional al número de fragmentos amplificados. El nivel de expresión se define comparando la expresión de cada gen con la actina.

20 El nivel de expresión de los genes MC-1R, MC-2R, opioide μ R y POMC se expresaron en porcentaje de variación en comparación con los obtenidos para el control negativo (sin tratamiento). El activo es el siguiente y es la materia de la tabla II.

25 **Tabla II**

Nombre (latín)	Parte de la planta	Control X MC-1R:	Control X MC-2R:	control X opioide μ R:	Control X POMC:
<i>Achillea millefolium</i>	Planta	2,73	3,0	23,0	3,38
"control X" significa "control multiplicado por"					

Conclusión: El activo es capaz de aumentar significativamente, en las condiciones consideradas, las tasas de ARNm en los genes que codifican MC-1R o MC-2R, u opioide μ R en queratinocitos.

Ejemplo 4: Detección de las proteínas MC-1R, MC-2R y del receptor opioide μ en queratinocitos después de la acción de los componentes activos

30 La electroforesis muestra la caracterización de las proteínas MC-1R, MC-2R y el receptor opioide μ gracias a los siguientes anticuerpos policlonales comerciales respectivos: OPA1-15013 (Affinity bioreagents), AB5128 (Chemicon International) y AB5511 (Chemicon International).

Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en el medio de K-SFM (Invitrogen) que contiene BPE (25 mg), EGF (2,5 μ g) y normocina.

35 Las células se lavaron una vez con solución de PBS y las proteínas se extrajeron a los 30 min a 4 °C en solución de lisis (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5, triton al 1 %), en presencia de inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g. Los sobrenadantes se diluyen antes de la electroforesis con solución de Laemmli en presencia de beta mercaptoetanol.

40 Para la inmunodetección, las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 4-12 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad). Las membranas se saturan después durante una hora a temperatura ambiente en solución de TBS con BSA al 3 %. Finalmente, las proteínas se inmunodetectan después de la incubación del anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche, seguido por el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (Invitrogen), 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos se utilizaron en la siguiente dilución: anti-MC-1R 5 μ g/ml, anti-MC-2R 5 μ g/ml y anti- opioide μ R

1/1000.

La semicuantificación se llevó a cabo mediante análisis de imágenes. El activo es el siguiente y es la materia de la tabla IV.

Tabla IV

Nombre	Parte de la planta:	Control X MC-2R:	control X opioide μ R:
<i>Achillea millefolium</i>	Planta	18,2	2,81
"control X" significa "control multiplicado por"			

- 5 Conclusión: Los aumentos inducidos por el activo observados a nivel génico se confirman por los aumentos a nivel de proteína.

Ejemplo 5: Inmunodetección de tubulina β III y de neurofilamento 200 en biopsias humanas

- 10 Los inventores han demostrado mediante inmunofluorescencia que durante el proceso de envejecimiento cronobiológico, la expresión de la tubulina β III y del neurofilamento 200 disminuyó durante el proceso de envejecimiento neurobiológico (fig. 2). Los inventores han elegido estos dos marcadores que permiten la detección de la presencia de prolongaciones axonales en la piel. El marcador tubulina β III permite una cuantificación del número de núcleos celulares y de la densidad de la red neurítica, y el marcador neurofilamento 200 es más indicativo de una maduración de la red neurítica. A partir de un estudio por inmunofluorescencia llevado a cabo en 80 biopsias por mamografía de mujeres de entre 17 y 75 años, los inventores han podido demostrar que la expresión de la tubulina β III disminuía 3,7 veces después de los 38 años y que la expresión de los neurofilamentos 200 disminuía 3,5 veces. 15 Los anticuerpos se utilizaron en la siguiente dilución: 1:500 (anti-tubulina β III) y 1:500 (anti-neurofilamento 200). Los complejos inmunitarios se detectan con un anti IgG de ratones (cabra) unidos a ALEXA 594, diluidos a 1:100.

En la Figura 2, se representa la detección a través de inmunofluorescencia de tubulina β III y de neurofilamentos 200 en piel humana normal.

- 20 La inmunodetección de tubulina β III en un sujeto denominado como joven (26 años) está indicada en A y la inmunodetección de tubulina β III en un sujeto denominado como de edad avanzada (56 años) está indicada en B. La inmunodetección de neurofilamentos 200 en un sujeto denominado como joven (26 años) está indicada en C y la inmunodetección de neurofilamentos 200 en un sujeto denominado como de edad avanzada (56 años) está indicada en D. La posición de la unión dermoepidérmica está indicada por la línea blanca. Los cuadrados en la parte superior 25 izquierda de cada figura indican un control negativo utilizando un anticuerpo de control de isotipo.

Las figuras 3 y 4 representan las tasas relativas de expresión de la tubulina β III y de neurofilamentos 200, respectivamente, en sujetos de edades entre los 15 y 75 años. La flecha roja indica la ruptura en la curva.

- 30 Las figuras 5 y 6 representan el análisis estadístico correspondiente a los estudios presentados en las figuras 3 y 4, respectivamente. Los resultados indican que la tubulina β III y los neurofilamentos 200 se expresan 3,7 y 3,5 veces más (respectivamente) en los sujetos menores de 38 años. Los resultados presentados representan el promedio \pm DT con una prueba t con $P = 0,05$.

Ejemplo 6: Dosificaciones de NGF y VEGF secretados en sobrenadantes en un cultivo de queratinocitos

- 35 Los queratinocitos en sujetos de edad avanzada se ponen en cultivo, y después del tiempo en contacto de los activos con las células, por ejemplo 24 horas, los medios se recuperan y se someten a una técnica de ELISA que permite la detección de la secreción de NGF o VEGF. El método de uso está en conformidad con el protocolo seguido por el proveedor R and D system (DY256) para NGF y Clinisciences (KHG0112) para VEGF. Entre los activos analizados, el siguiente activo presenta la modulación más fuerte, en particular de NGF, y es la materia de la tabla V.

Tabla V

Planta	Parte de la planta	NGF multiplicado por control
<i>Achillea millefolium</i>	Planta	11,28

Ejemplo 7: Inmunodetección de tubulina beta III y de neurofilamento 200 en biopsias humanas sobrevivientes

- 40 Se mantienen en supervivencia biopsias de cirugía plástica en adultos durante 4 días en un medio de cultivo DMEM, en presencia o no de NGF o de un componente activo. Después, las biopsias se congelan y se someten a estudios de inmunofluorescencia para la identificación de marcadores neuronales, en particular los indicados en el ejemplo 5.

Ejemplo 8: Inmunodetección de marcadores de diferenciación y proliferación en modelos de piel reconstruida.

Este modelo es la asociación de un cultivo de una dermis reconstruida en la que luego se lleva a cabo el cultivo suplementario de una epidermis reconstruida.

El modelo de dermis reconstruida se crea de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 5 - 0,5 a 1,10⁶ fibroblastos de piel humana normal se siembran en una matriz de sustrato a base de colágeno, habitualmente de glucosaminoglucano quitosano, y después se cultiva en un medio nutritivo, por ejemplo, DMEM-Glutamax complementado con suero de ternera al 10 %, ácido ascórbico y, preferentemente, una concentración final de 1 mM de EGF (factor de crecimiento epidérmico), y preferentemente una concentración final de 10 ng/ml de normocina, y preferentemente una concentración final de 100 µg/ml, durante 21 días.
- 10 El modelo de piel reconstruida se crea de acuerdo con el siguiente protocolo:
- 0,5 a 1,10⁶ queratinocitos humanos normales se siembran en el equivalente dérmico, después se cultivan en un medio nutritivo, por ejemplo, DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementado con suero de ternera, ácido ascórbico y, preferentemente, a una concentración final de 1 mM, EGF (*factor de crecimiento epidérmico*) y preferentemente a una concentración final de 10 ng/ml de hidrocortisona, y preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml de umulina y preferentemente a una concentración final de 0,12 UI/ml de isuprel, y preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml de triyodotironina, y preferentemente a una concentración final de adenina 2,10⁻⁹ M de adenina y preferentemente a una concentración final de 24,3 µg/ml de normocina y preferentemente a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo tiene lugar durante 7 días en condiciones de inmersión. Después, los cultivos se colocan en una interfaz aire-líquido durante 14 días adicionales en el mismo medio que el cultivo en inmersión, a excepción del suero de ternera, hidrocortisona, isuprel, triyodotironina y umulina.

25 La piel reconstruida (Mimeskin®, Coletica, Lyon, Francia) se preparó después en solución de fijación Boulin (LOX, LOXL, elastina) o en una solución de formol al 10 % (para elastina), después se selló en parafina para un estudio inmunoquímico, o se congeló directamente en nitrógeno líquido para el análisis por inmunofluorescencia. Se extrajeron de la parafina cortes de 6 µm de espesor y se blanquearon en glicina-HCl (100 mmol/l). Las inmunodetecciones de Ki67 (marcador de proliferación), Queratina 14 (marcador de todas las capas celulares), queratina 10 (marcador de las capas suprabasales de queratinocitos), involucrina, transglutaminasa y el nestina se llevaron a cabo en la piel reconstruida el día 45.

Ejemplo 9: Uso del producto de la invención en combinación con moléculas patentadas existentes

30 Es posible combinar el producto de la invención con, en particular, extractos que estimulan la troficidad de los nervios cutáneos activos en los nervios cutáneos sensitivos, como por ejemplo extracto de pimentón (*Capsicum annuum*) y/o pigmento rojo (pimiento rojo), y/o pimienta (*Piper nigrum*) (L'OREAL FR2825273), y/o glutamilamidoetilindol (Exsymol).

Es factible combinar el producto de la invención con extractos que imitan la acción de la β endorfina para mejorar la función de barrera de la piel, como por ejemplo el extracto de cáscara de grano de cacao (L'OREAL US2006069032).

35 Además, es factible combinar el producto de la invención con extractos que activan la β endorfina para generar una sensación de bienestar, como por ejemplo el extracto de *Tephrosia purpurea* (falso índigo).

40 Además, es factible combinar el producto de la invención con otras moléculas tales como α-MSH, β endorfina, o derivados tales como, por ejemplo, P3-endorfina y aceites esenciales para estimular la diferenciación de los queratinocitos destinados a tener un efecto antienvjecimiento (documento CODIF FR2857874) de NGF, para tener un efecto sobre la troficidad nerviosa.

Ejemplo 10: Uso de los productos de la invención en formulaciones cosméticas o farmacéuticas del tipo emulsión de aceite en agua

Formulación 10a:

A	Agua	csp 100
	Butilenglicol	2
	Glicerina	3
	Dihidroxietil fosfato de sodio, Isopropil hidroxietil éter	2
B	Estearato de glicol SE	14
	Triisonaoina	5

ES 2 730 836 T3

(continuación)

	Cocoato del octilo	6
C	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, pH ajustado a 5,5	2
D	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Formulación 10b:

A	Agua	csp 100
	Butilenglicol	2
	Glicerina	3
	Poliacrilamida, Isoparafina, Laureth-7	2,8
B	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno;	2
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	2
	Butilenglicol	0,5
D	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Formulación 10c:

A	Carbómero	0,50
	Propilenglicol	3
	Glicerol	5
	Agua	csp 100
B	Cocoato del octilo	5
	Bisabolol	0,30
	Dimeticona	0,30
C	Hidróxido de sodio	1,60
D	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,50
E	Perfume	0,30
F	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 11: Uso de los productos de la invención en una formulación del tipo agua en aceite

A	PEG 30 - dipolihiidroxiesterato	3
	Triglicéridos de cáprico	3
	Octanoato de cetearilo	4
	Adipato de dibutilo	3
	Aceite de semilla de uva	1,5
	Aceite de jojoba	1,5
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
B	Glicerina	3

ES 2 730 836 T3

(continuación)

	Butilenglicol	3
	Sulfato de magnesio	0,5
	EDTA	0,05
	Agua	csp 100
C	Ciclometicona	1
	Dimeticona	1
D	Perfume	0,3
E	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 12: Uso de los productos de la invención en una formulación del tipo champú o gel de baño

A	Goma de xantano	0,8
	Agua	csp 100
B	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno	0,5
	Fenoxietanol, Metilparabeno Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
C	Ácido cítrico	0,8
D	Laureth sulfato de sodio	40,0
E	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 13: Uso de los productos de la invención en una formulación del tipo barra de labios u otros productos anhidros

A	Cera mineral	17,0
	Isoestearato de isoestearilo	31,5
	Propilenglicol dipelargonato	2,6
	Propilenglicol isoestearato	1,7
	PEG 8 cera de abejas	3,0
	Glicéridos de aceite de semilla de palma hidrogenado,	3,4
	Glicéridos de palma hidrogenados	
	Aceite de lanolina	3,4
	Aceite de sésamo	1,7
	Lactato de cetilo	1,7
	Aceite mineral, Alcohol de lanolina	3,0
B	Aceite de ricino	csp 100
	Dióxido de titanio	3,9
	CI 15850:1	0,616
	CI 45410:1	0,256
	CI 19140:1	0,048
	CI 77491	2,048
C	Productos de la invención	0,01 - 5 %

Ejemplo 14: Uso de los productos de la invención en una formulación de geles acuosos (contorno de ojos, adelgazante, etc.)

5

ES 2 730 836 T3

A	Agua	csp 100
	Carbómero	0,5
	butilenglicol	15
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
B	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 15: Uso de los productos de la invención en una formulación del tipo triple emulsión

Emulsión primaria A1/A

A	PEG 30 -	4
	dipolihidroxiestearato	
	Triglicéridos de cáprico	7,5
	Isohexadecano	15
	PPG-15 estearil éter	7,5
B	Agua	65,3
C	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,7

Emulsión secundaria A1/A/A2

A	Emulsión primaria	60
B	Poloxámero 407	2
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, 2-bromo-2nitropropano-1,3 diol	0,3
	Agua	csp 100
C	Carbómero	15
D	Trietanolamina	PH 6,0-6,5

Ejemplo 16: Preparación de formulaciones farmacéuticas que contienen el producto de la invención

5 Formulación 176a: preparación de pastillas

A	Excipientes	En g por pastilla
	Lactosa	0,359
	Sacarosa	0,240
B	Productos de la invención*	0,001 -0,1

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

Formulación 176b: preparación de una pomada

A	Excipientes	
	Polietileno de baja densidad	5,5
	Parafina líquida	csp 100

(continuación)

B	Productos de la invención*	0,001 -0,1
---	----------------------------	------------

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

Formulación 16 c: preparación de una fórmula inyectable

A	Excipiente	
	Solución isotónica de sal	5 ml

B	Productos de la invención*	0,001 - 0,1 g
---	----------------------------	---------------

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

Zarzaparrilla (<i>Smilax ornata</i>)	raíz	3,9	1,0	2,74
<i>Juniperus communis</i>	fruto	0,4	1,0	0,25
<i>Cecropia obtusifolia</i>	brotos	3,2	1,0	2,18
Bacterias lácticas de la papaya		2,58	1,0	1,0
Zanahoria	fruto	1,97	1,0	1,0
Cereza ácida	fruto	2,0	1,0	1,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> de altramuz		1,0	1,0	2,15
Harina de soja	//	1,0	1,0	2,42
<i>Lactobacillus plantarum</i> de dátil	fruto	3,23	1,0	1,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> de soja		2,0	1,0	1,0
"Control X" significa "control multiplicado por"				

Conclusión: 10 activos aumentan la expresión del gen de MC-1R en melanocitos; 9 activos aumentan la expresión del gen de POMC y 2 activos disminuyen la expresión del gen de POMC en los melanocitos.

5 Ejemplo 5: Detección de las proteínas MC-1R, MC-2R y del receptor opioide μ en queratinocitos después de la acción de los componentes activos

La electroforesis muestra la caracterización de las proteínas MC-1R, MC-2R y el receptor opioide μ gracias a los siguientes anticuerpos policlonales comerciales respectivos: OPA1-15013 (Affinity bioreagents), AB5128 (Chemicon International) y AB5511 (Chemicon International).

10 Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en el medio de K-SFM (Invitrogen) que contiene BPE (25 mg), EGF (2,5 μ g) y normocina.

Las células se lavaron una vez con solución de PBS y las proteínas se extrajeron a los 30 min a 4 °C en solución de lisis (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5, triton al 1 %), en presencia de inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g. Los sobrenadantes se diluyen antes de la electroforesis con solución de Laemmli en presencia de beta mercaptoetanol.

15

Para la inmunodetección, las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 4-12 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad). Las membranas se saturan después durante una hora a temperatura ambiente en solución de TBS con BSA al 3 %. Finalmente, las proteínas se inmunodetectan después de la incubación del anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche, seguido por el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (Invitrogen), 1 hora a temperatura ambiente.

20

Los anticuerpos se utilizaron en la siguiente dilución: anti-MC-1R 5 μ g/ml, anti-MC-2R 5 μ g/ml y anti- opioide μ R 1/1000.

La semicuantificación se llevó a cabo mediante análisis de imágenes. Los activos son los siguientes y es la materia de la tabla IV.

Tabla IV

Nombre	Parte de la planta:	Control MC-2R:	X control opioide μ R:
<i>Achillea millefolium</i>	Planta	18,2	2,81
<i>Galeopsis ochroleuca</i>	Planta	1,0	2,54
<i>Colocasia esculenta</i>	tubérculo	1,0	1,52
<i>Prunus cerasus</i>	Tallo	1,0	1,44
<i>Oenothera biennis</i>	semilla	1,0	1,46
<i>Prunus spinosa</i>	fruto	8,26	2,02
(Z)-decahidro-6,8a-dihidroxi-1-isopropil-3a, 6-dimetilazulen-5-ilo 2-metilbut-2-enoato		1,99	1,37
Ácido fenil-acético 3,6,9-trimetil-2,7-dioxo-2,3,3a,4,5,7,9a,9b-octahidrozulen[4,5-b]furan-4-ilo		1,96	1,66
"Control X" significa "control multiplicado por"			

Conclusión: Los aumentos inducidos por los activos observados a nivel génico se confirman por los aumentos a nivel de proteína. *Galeopsis ochroleuca*, *Oenothera biennis* y las dos moléculas caracterizadas inducen un aumento en la expresión de la proteína opioide μ R, aunque la expresión del gen no aumenta.

5 Ejemplo 6: Inmunodetección de tubulina β III y de neurofilamento 200 en biopsias humanas

Los inventores han demostrado mediante inmunofluorescencia que durante el proceso de envejecimiento cronobiológico, la expresión de la tubulina β III y del neurofilamento 200 disminuyó durante el proceso de envejecimiento neurobiológico (fig. 2). Los inventores han elegido estos dos marcadores que permiten la detección de la presencia de prolongaciones axonales en la piel. El marcador tubulina β III permite una cuantificación del número de núcleos celulares y de la densidad de la red neurítica, y el marcador neurofilamento 200 es más indicativo de una maduración de la red neurítica. A partir de un estudio por inmunofluorescencia llevado a cabo en 80 biopsias por mamografía de mujeres de entre 17 y 75 años, los inventores han podido demostrar que la expresión de la tubulina β III disminuía 3,7 veces después de los 38 años y que la expresión de los neurofilamentos 200 disminuía 3,5 veces. Los anticuerpos se utilizaron en la siguiente dilución: 1:500 (anti-tubulina β III) y 1:500 (anti-neurofilamento 200). Los complejos inmunitarios se detectan con un anti IgG de ratones (cabra) unidos a ALEXA 594, diluidos a 1:100.

En la Figura 2, se representa la detección a través de inmunofluorescencia de tubulina β III y de neurofilamentos 200 en piel humana normal.

La inmunodetección de tubulina β III en un sujeto denominado como joven (26 años) está indicada en A y la inmunodetección de tubulina β III en un sujeto denominado como de edad avanzada (56 años) está indicada en B. La inmunodetección de neurofilamentos 200 en un sujeto denominado como joven (26 años) está indicada en C y la inmunodetección de neurofilamentos 200 en un sujeto denominado como de edad avanzada (56 años) está indicada en D. La posición de la unión dermoepidérmica está indicada por la línea blanca. Los cuadrados en la parte superior izquierda de cada figura indican un control negativo utilizando un anticuerpo de control de isotipo.

Las figuras 3 y 4 representan las tasas relativas de expresión de la tubulina β III y de neurofilamentos 200, respectivamente, en sujetos de edades entre los 15 y 75 años. La flecha roja indica la ruptura en la curva. Las figuras 5 y 6 representan el análisis estadístico correspondiente a los estudios presentados en las figuras 3 y 4, respectivamente. Los resultados indican que la tubulina β III y los neurofilamentos 200 se expresan 3,7 y 3,5 veces más (respectivamente) en los sujetos menores de 38 años. Los resultados presentados representan el promedio \pm DT con una prueba t con $P = 0,05$.

30 Ejemplo 7: Dosificaciones de NGF y VEGF secretados en sobrenadantes en un cultivo de queratinocitos

Los queratinocitos en sujetos de edad avanzada se ponen en cultivo, y después del tiempo en contacto de los activos con las células, por ejemplo 24 horas, los medios se recuperan y se someten a una técnica de ELISA que permite la detección de la secreción de NGF o VEGF. El método de uso está en conformidad con el protocolo seguido por el proveedor R and D system (DY256) para NGF y Clinisciences (KHG0112) para VEGF. Entre los activos analizados, los siguientes activos presentan la modulación más fuerte, en particular de NGF, y son la materia de la tabla V.

Tabla V

Planta	Parte de la planta	NGF multiplicado por control
<i>Achillea millefolium</i>	Planta	11,28
<i>Prunus cerasus</i>	Tallo	17,8
<i>Galeopsis ochroleuca</i>	Planta	11,24

Ejemplo 8: Inmunodetección de tubulina beta III y de neurofilamento 200 en biopsias humanas sobrevivientes

Se mantienen en supervivencia biopsias de cirugía plástica en adultos durante 4 días en un medio de cultivo DMEM, en presencia o no de NGF o de un componente activo. Después, las biopsias se congelan y se someten a estudios de inmunofluorescencia para la identificación de marcadores neuronales, en particular los indicados en el ejemplo 6.

Ejemplo 9: Inmunodetección de marcadores de diferenciación y proliferación en modelos de piel reconstruida.

Este modelo es la asociación de un cultivo de una dermis reconstruida en la que luego se lleva a cabo el cultivo suplementario de una epidermis reconstruida.

El modelo de dermis reconstruida se crea de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 10 - 0,5 a $1,10^6$ fibroblastos de piel humana normal se siembran en una matriz de sustrato a base de colágeno, habitualmente de glucosaminoglucano quitosano, y después se cultiva en un medio nutritivo, por ejemplo, DMEM-Glutamax complementado con suero de ternera al 10 %, ácido ascórbico y, preferentemente, una concentración final de 1 mM de EGF (factor de crecimiento epidérmico), y preferentemente una concentración final de 10 ng/ml de normocina, y preferentemente una concentración final de 100 µg/ml, durante 21 días.

- 15 El modelo de piel reconstruida se crea de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 20 - 0,5 a $1,10^6$ queratinocitos humanos normales se siembran en el equivalente dérmico, después se cultivan en un medio nutritivo, por ejemplo, DMEM-Glutamax/Ham F-12 (relación 3/1 v/v) complementado con suero de ternera, ácido ascórbico y, preferentemente, a una concentración final de 1 mM, EGF (*factor de crecimiento epidérmico*) y preferentemente a una concentración final de 10 ng/ml de hidrocortisona, y preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml de umulina y preferentemente a una concentración final de 0,12 UI/ml de isuprel, y preferentemente a una concentración final de 0,4 µg/ml de triyodotironina, y preferentemente a una concentración final de adenina $2,10^{-9}$ M de adenina y preferentemente a una concentración final de 24,3 µg/ml de normocina y preferentemente a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo tiene lugar durante 7 días en condiciones de inmersión. Después, los cultivos se colocan en una interfaz aire-líquido durante 14 días adicionales en el mismo medio que el cultivo en inmersión, a excepción del suero de ternera, hidrocortisona, isuprel, triyodotironina y umulina.

- 30 La piel reconstruida (Mimeskin®, Coletica, Lyon, Francia) se preparó después en solución de fijación Boulin (LOX, LOXL, elastina) o en una solución de formol al 10 % (para elastina), después se selló en parafina para un estudio inmunoquímico, o se congeló directamente en nitrógeno líquido para el análisis por inmunofluorescencia. Se extrajeron de la parafina cortes de 6 µm de espesor y se blanquearon en glicina-HCl (100 mmol/l). Las inmunodetecciones de Ki67 (marcador de proliferación), Queratina 14 (marcador de todas las capas celulares), queratina 10 (marcador de las capas suprabasales de queratinocitos), involucrina, tran glutaminasa y el nestina se llevaron a cabo en la piel reconstruida el día 45.

Ejemplo 10: Uso de los productos en combinación con moléculas patentadas existentes

- 35 Es posible combinar los productos de la invención con, en particular, extractos que estimulan la troficidad de los nervios cutáneos activos en los nervios cutáneos sensitivos, como por ejemplo extracto de pimentón (*Capsicum annum*) y/o pigmento rojo (pimiento rojo), y/o pimienta (*Piper nigrum*) (L'OREAL FR2825273), y/o glutamilamidoetilindol (Exsymol).

Es factible combinar los productos de la invención con extractos que imitan la acción de la β endorfina para mejorar la función de barrera de la piel, como por ejemplo el extracto de cáscara de grano de cacao (L'OREAL US2006069032).

- 40 Además, es factible combinar los productos de la invención con extractos que activan la β endorfina para generar una sensación de bienestar, como por ejemplo el extracto de *Tephrosia purpurea* (falso índigo).

Además, es factible combinar los productos de la invención con otras moléculas tales como α-MSH, β endorfina, o derivados tales como, por ejemplo, P3-endorfina y aceites esenciales para estimular la diferenciación de los

queratinocitos destinados a tener un efecto antienvjecimiento (documento CODIF FR2857874) de NGF, para tener un efecto sobre la troficidad nerviosa.

Ejemplo 11: Uso de los productos en formulaciones cosméticas o farmacéuticas del tipo emulsión de aceite en agua

5 **Formulación 11a:**

A	Agua	csp 100
	Butilenglicol	2
	Glicerina	3
	Dihidroxicetil fosfato de sodio, Isopropil hidroxicetil éter	2
B	Estearato de glicol SE	14
	Triisononaoína	5
	Cocoato del octilo	6
C	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, pH ajustado a 5,5	2
D	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Formulación 11b:

A	Agua	csp 100
	Butilenglicol	2
	Glicerina	3
	Poliacrilamida, Isoparafina, Laureth-7	2,8
B	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno;	2
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno,	2
	Etilparabeno butilenglicol	0,5
D	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Formulación 11c:

A	Carbómero	0,50
	Propilenglicol	3
	Glicerol	5
	Agua	csp 100
B	Cocoato del octilo	5
	Bisabolol	0,30
	Dimeticona	0,30
C	Hidróxido de sodio	1,60
D	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,50
E	Perfume	0,30
F	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 12: Uso de los productos en una formulación del tipo agua en aceite

ES 2 730 836 T3

A	PEG 30 - dipolihidroxiesterato	3
	Triglicéridos de cáprico	3
	Octanoato de cetearilo	4
	Adipato de dibutilo	3
	Aceite de semilla de uva	1,5
	Aceite de jojoba	1,5
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
B	Glicerina	3
	Butilenglicol	3
	Sulfato de magnesio	0,5
	EDTA	0,05
	Agua	csp 100
C	Ciclometicona	1
	Dimeticona	1
D	Perfume	0,3
E	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 13: Uso de los productos en una formulación del tipo champú o gel de baño

A	Goma de xantano	0,8
	Agua	csp 100
B	Butilenglicol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno	0,5
	Fenoxietanol, Metilparabeno propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
C	Ácido cítrico	0,8
D	Laureth sulfato de sodio	40,0
E	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 14: Uso de los productos en una formulación del tipo barra de labios u otros productos anhidros

A	Cera mineral	17,0
	Isoestearato de isoestearilo	31,5
	Propilenglicol dipelargonato	2,6
	Propilenglicol isoestearato	1,7
	PEG 8 cera de abejas	3,0
	Glicéridos de aceite de semilla de palma hidrogenado,	3,4
	Aceite de lanolina de glicéridos de palma hidrogenado	3,4
	Aceite de sésamo	1,7
	Lactato de cetilo	1,7
	Aceite mineral, Alcohol de lanolina	3,0
B	Aceite de ricino	csp 100
	Dióxido de titanio	3,9
	CI 15850:1	0,616
	CI 45410:1	0,256

ES 2 730 836 T3

(continuación)

	CI 19140:1	0,048
	CI 77491	2,048
C	Productos de la invención	0,01 - 5 %

Ejemplo 15: Uso de los productos en una formulación de geles acuosos (contorno de ojos, adelgazante, etc.1

A	Agua	csp 100
	Carbómero	0,5
	Butilenglicol	15
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,5
B	Productos de la invención	0,01 - 10 %

Ejemplo 16: Uso de los productos en una formulación del tipo triple emulsión

Emulsión primaria A1/A

A	PEG 30 - dipolihidroxiesterato	4
	Triglicéridos de cáprico	7,5
	Isohexadecano	15
	PPG-15 estearil éter	7,5
B	Agua	65,3
C	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno	0,7

Emulsión secundaria A1/A/A2

A	Emulsión primaria	60
B	Poloxámero 407	2
	Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, 2-bromo-2nitropropano-1,3 diol	0,3
	Agua	csp 100
C	Carbómero	15
D	Trietanolamina	PH 6,0-6,5

5 Ejemplo ilustrativo 17: Preparación de formulaciones farmacéuticas que contienen el producto

Formulación 17 a: preparación de pastillas

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

A	Excipientes	En g por pastilla
	Lactosa	0,359
	Sacarosa	0,240
B	Productos de la invención*	0,001 -0,1

Formulación 17 b: preparación de una pomada

A	Excipientes	
	Polietileno de baja densidad	5,5
	Parafina líquida	csp 100
B	Productos de la invención*	0,001 -0,1

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

Formulación 17 c: preparación de una fórmula inyectable

A	Solución isotónica de sal de excipiente	5 ml
B	Productos de la invención*	0,001 - 0,1 g

*Se obtiene el producto de la invención, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito en el ejemplo 3, seguido de una fase de secado.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE SAS
- 5 <120> Estimulación de los receptores MC-1R, MC-2R y/o de opioide μ
- <130> H197810/68 PCT1
- <150> FR 07 55529
- <151> 06-06-2007
- <160> 14
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 2360
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 15 <400> 1

ES 2 730 836 T3

gagagggcag gtcccgggga agctccggac tcctagaggg gcggccaggt gggggccctg	60
gtgaccagga cagactgtgg tgttttttaa cgtaaaggag atccgcggtg tgagggaccc	120
cctgggtcct gcacgccgcc tgggtggcagg ccgggccatg gtgggtgctc acgcccccg	180
catgtggccg ccctcagtgg gaggggctct gagaacgact ttttaaacg cagagaaaag	240
ctccattctt cccaggacct cagcgcagcc ctggcccagg aaggcaggag acagaggcca	300
ggacgggtcca gaggtgtcga aatgtcctgg ggacctgagc agcagccacc agggaagagg	360
cagggagggga gctgaggacc aggcttggtt gtgagaatcc ctgagcccag gcggtagatg	420
ccaggaggtg tctggactgg ctgggccatg cctgggctga cctgtccagc cagggagagg	480
gtgtgagggc agatctgggg gtgccagat ggaaggaggc aggcattggg gacaccaag	540
gccccctggc agcaccatga actaagcagg acacctggag gggaagaact gtggggacct	600
ggaggcctcc aacgactcct tcctgcttcc tggacaggac tatggctgtg cagggatccc	660
agagaagact tctgggctcc ctcaactcca cccccacagc catccccag ctggggctgg	720
ctgccaacca gacaggagcc cgggtgcctgg aggtgtccat ctctgacggg ctcttcctca	780
gcctggggct ggtgagcttg gtggagaacg cgctggtggt ggccaccatc gccaagaacc	840
ggaacctgca ctcacccatg tactgcttca tctgctgcct ggcttgtcg gacctgctgg	900
tgagcgggag caacgtgctg gagacggccg tcatcctcct gctggaggcc ggtgcactgg	960
tggccccggc tgcggtgctg cagcagctgg acaatgtcat tgacgtgatc acctgcagct	1020
ccatgctgtc cagcctctgc ttctgggcg ccatcgccgt ggaccgctac atctccatct	1080
tctacgcact gcgctaccac agcatcgtga ccctgccgcg ggcgcggcga gccgttgcg	1140
ccatctgggt ggccagtgtc gtcttcagca cgctcttcat cgctactac gaccacgtgg	1200

ES 2 730 836 T3

ccgtcctgct gtgcctcgtg gtcttcttcc tggctatgct ggtgctcatg gccgtgctgt	1260
acgtccacat gctggcccgg gcctgccagc acgcccaggg catcgcccgg ctccacaaga	1320
ggcagcggcc ggtccaccag ggctttggcc ttaaaggcgc tgtcacctc accatcctgc	1380
tgggcatttt ctctctctgc tggggcccct tcttctgca tctcacactc atcgtcctct	1440
gccccgagca cccacgtgc ggctgcatct tcaagaactt caacctcttt ctgcacctca	1500
tcatctgcaa tgccatcatc gacccccctca tctacgcctt ccacagccag gagctccgca	1560
ggacgctcaa ggaggtgctg acatgctcct ggtgagcgcg gtgcacgcgg cttaagtgt	1620
gctgggcaga gggaggtggt gatattgtgt ggtctggttc ctgtgtgacc ctgggcagtt	1680
ccttacctcc ctgggtccccg tttgtcaaag aggatggact aatgatctc tgaaagtgtt	1740
gaagcgcgga cccttctggg tccagggagg ggtccctgca aaactccagg caggacttct	1800
caccagcagt cgtggggaac ggaggaggac atggggagggt tgtggggcct caggctccgg	1860
gcaccagggg ccaacctcag gctcctaaag agacattttc cgcccactcc tgggacactc	1920
cgtctgctcc aatgactgag cagcatccac cccaccccat ctttgctgcc agctctcagg	1980
accgtgccct cgtcagctgg gatgtgaagt ctctgggtgg aagtgtgtgc caagagctac	2040
tcccacagca gccccaggag aaggggcttt gtgaccagaa agcttcatcc acagccttgc	2100
agcggctcct gcaaaaggag gtgaaatccc tgcctcaggc caagggacca ggtttgcagg	2160
agcccccta gtggtatggg gctgagccct cctgagggcc ggttctaagg ctgagactgg	2220
gcaactggggc ctgagcctgc tttcctgcag cagtcgcca agcagacagc cctggcaaat	2280
gcctgactca gtgaccagtg cctgtgagca tggggccagg aaagtctggt aataaatgtg	2340
actcagcatc acccacctta	2360

<210> 2
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 730 836 T3

atgaagcaca ttatcaactc gtatgaaaac atcaacaaca cagcaagaaa taattccgac 60
tgtcctcgtg tggttttgcc ggaggagata tttttcaciaa tttccattgt tggagttttg 120
gagaatctga tcgtcctgct ggctgtgttc aagaataaga atctccaggc acctatgtac 180
tttttcatct gtagcttggc catatctgat atgctgggca gcctatataa gatcttggaa 240
aatatcctga tcatattgag aaacatgggc tatctcaagc cacgtggcag ttttgaacc 300
acagccgatg acatcatcga ctccctgttt gtcctctccc tgcttggctc catcttcagc 360
ctgtctgtga ttgctgcgga ccgctacatc accatcttcc acgcaactgcg gtaccacagc 420
atcgtgacca tgcgccgcac tgtggtgggtg cttacgggtca tctggacggt ctgcacgggg 480
actggcatca ccatgggtgat cttctcccat catgtgccca cagtgatcac cttcacgctc 540
ctgttcccgc tgatgctggc cttcatcctg tgcctctatg tgcacatggt cctgctggct 600
cgatcccaca ccaggaagat ctccaccctc cccagagcca acatgaaagg ggccatcaca 660
ctgaccatcc tgcctggggg cttcatcttc tgcctggccc cctttgtgct tcatgtcctc 720
ttgatgacat tctgcccag taaccctac tgcgcctgct acatgtctct cttccaggtg 780
aacggcatgt tgatcatgtg caatgccgtc attgaccctc tcatatatgc cttccggagc 840
ccagagctca gggacgcatt caaaaagatg atcttctgca gcaggactg gtag 894

<210> 3
<211> 1891
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 730 836 T3

gatgagcctc tgtgaactac taagggtggga gggggctata cgcagaggag aatgtcagat	60
gctcagctcg gtccccctccg cctgacgctc ctctctgtct cagccaggac tggtttctgt	120
aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaagcgg ctgaggcgct tggaaacccga	180
aaagtctcgg tgctcctggc tacctcgcac agcggtgccc gcccggccgt cagtaccatg	240
gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aattgcactg atgccttggc gtactcaagt	300
tgctccccag caccagccc cggttcctgg gtcaacttgt cccacttaga tggcaacctg	360
tccgacctat gcggtccgaa ccgcaccgac ctgggcggga gagacagcct gtgccctccg	420
accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg ccctctactc catcgtgtgc	480
gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc atgtatgtga ttgtcagata caccaagatg	540
aagactgcca ccaacatcta cattttcaac cttgctctgg cagatgcctt agccaccagt	600
accctgccct tccagagtgt gaattacctt atgggaacat ggccatttgg aaccatcctt	660
tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca ccagcatatt caccctctgc	720
accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg tcaaggcctt agatttccgt	780
actccccgaa atgccccaaat tatcaatgtc tgcaactgga tcctctcttc agccattggg	840
cttctgttaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag gttccataga ttgtactacta	900
acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga agatctgtgt tttcatcttc	960
gccttcatta tgccagtgtc catcattacc gtgtgctatg gactgatgat cttgcgccctc	1020
aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca ggaatcttcg aaggatcacc	1080
aggatggtgc tgggtggggg ggctgtgttc atcgtctgct ggactcccat tcacatttac	1140

ES 2 730 836 T3

```

gtcatcatta aagccttggg tacaatccca gaaactacgt tccagactgt ttcttggcac 1200
ttctgcattg ctctagggta cacaaacagc tgcctcaacc cagtccttta tgcatttctg 1260
gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc caacctcttc caacattgag 1320
caacaaaact ccaactcgaat tcgtcagaac actagagacc acccctccac ggccaatata 1380
gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag aaactgctcc gttgccctaa 1440
caggggtctca tgccattccg accttcacca agcttagaag ccacatgta tgtggaagca 1500
ggttgcttca agaatgtgta ggaggctcta attctctagg aaagtgcctg cttttaggtc 1560
atccaacctc tttcctctct ggccactctg ctctgcacat tagagggaca gccaaaagta 1620
agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg agtccagttt gtgcaagaca 1680
cccagtggaa ccaaaaccca tcgtggtatg tgaattgaag tcatcataaa aggtgaccct 1740
tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac ctcaacaaag aagaaccatc 1800
ttttgttaag ttcaccgtag taacacataa agtaaagtct acctctgatc aaagcacctt 1860
gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt t 1891

```

<210> 4

<211> 1071

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 730 836 T3

```

agcggcggcg aaggagggga agaagagccg cgaccgagag aggccgccga gcgtccccgc      60
cctcagagag cagcctcccc agacagagcc tcagcctgcc tggaagatgc cgagatcgtg      120
ctgcagccgc tcggggggccc tgttgctggc cttgctgctt caggcctcca tggaaagtgcg      180
tggctggtgc ctggagagca gccagtgtca ggacctcacc acggaagca acctgctgga      240
gtgcatccgg gcctgcaagc cggacctctc ggccgagact cccatgttcc cgggaaatgg      300
cgacgagcag cctctgaccg agaacccccg gaagtacgtc atgggccact tccgctggga      360
ccgattcggc cgccgcaaca gcagcagcag cggcagcagc ggcgcagggc agaagcgcg      420
ggacgtctca gcggggaag actgcggccc gctgcctgag ggcgggcccc agccccgcag      480
cgatggtgcc aagccgggcc cgcgcgaggg caagcgctcc tactccatgg agcacttccg      540
ctggggcaag ccggtgggca agaagcggcg cccagtgaag gtgtacccta acggcgccga      600
ggacgagtcg gccgaggcct tccccctgga gttcaagagg gagctgactg gccagcgact      660
ccgggagggg gatggccccg acggccctgc cgatgacggc gcagggggccc aggccgacct      720
ggagcacagc ctgctggtgg cggccgagaa gaaggacgag ggcccctaca ggatggagca      780
cttccgctgg ggcagccccg ccaaggacaa gcgctacggc ggtttcatga cctccgagaa      840
gagccagacg ccctggtga cgctgttcaa aaacgccatc atcaagaacg cctacaagaa      900
gggcgagtga gggcacagcg ggccccaggg ctaccctccc ccaggaggtc gaccccaaag      960
ccccctgctc tccccctgcc tgctgccgcc tcccagcctg gggggtcgtg gcagataatc     1020
agcctcttaa agctgcctgt agttaggaaa taaaaccttt caaatctcac a                1071

```

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sonda actina sentido

<400> 5
 gtggggcgcc ccaggcacca 20

10 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sonda actina antisentido

<400> 6
 ctcttaatg tcacgcacga tttc 24

<210> 7
 <211> 20

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda MCR sentido

 5 <400> 7
 gggctctgag aacgacttt 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda MCR1 Antisentido

 <400> 8
 ccgggctcct gtctggttg 20

 15 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 20 <223> sonda MCR2 sentido

 <400> 9
 tcacgtcgct gttcccgtg at 22

 <210> 10
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda MCR2 antisentido

 <400> 10
 30 aagagagaca tgtagcaggc gcagta 26

 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 35 <220>
 <223> sonda opioide μ sentido

 <400> 11
 ctcagccagg actggttct gtaaga 26

 <210> 12
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda opioide μ antisentido

 45 <400> 12
 tcggacaggt tgccatctaa gtg 23

ES 2 730 836 T3

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> sonda POMC sentido

<400> 13
cgcccagtga aggtgtaccc 20

10 <210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

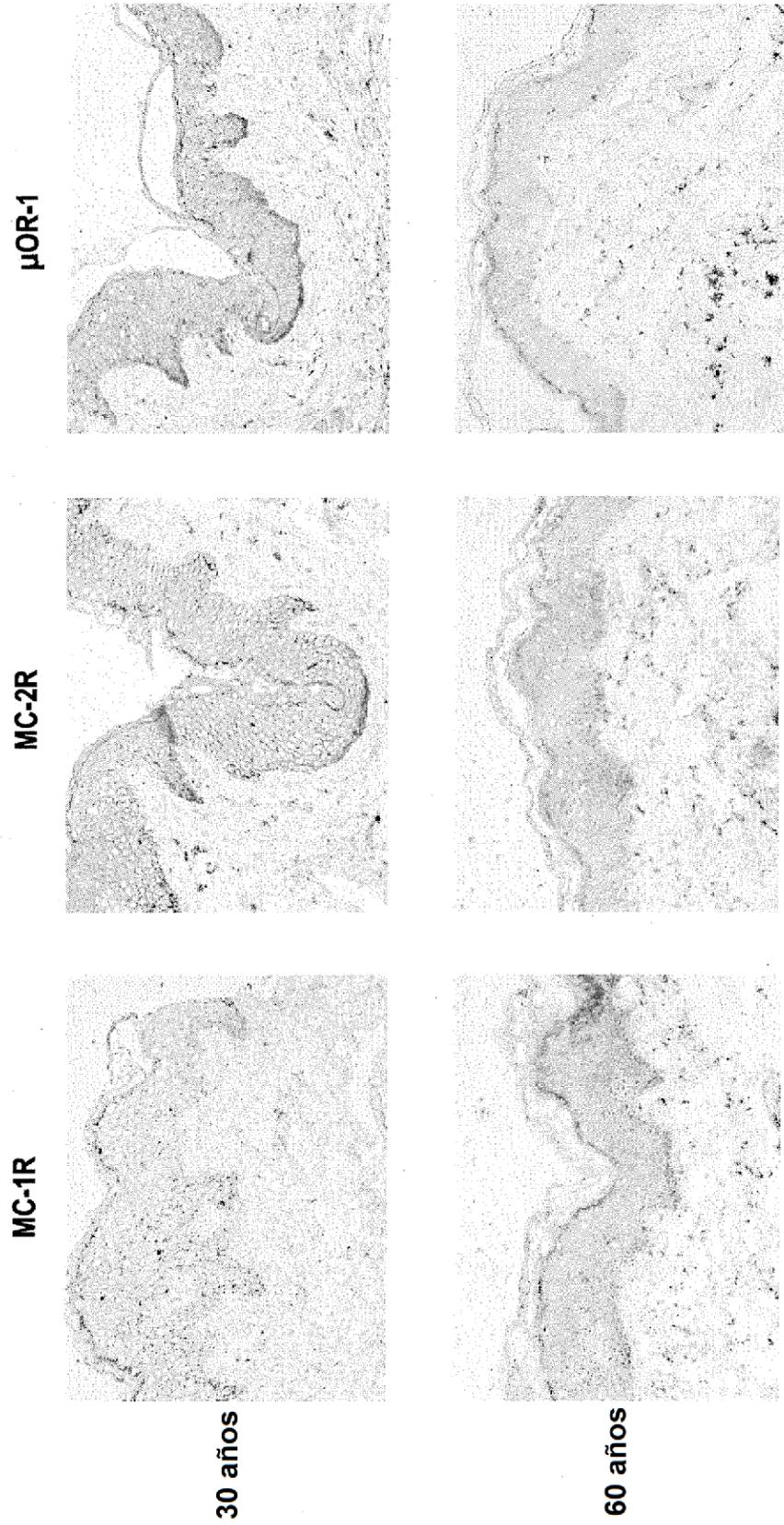
<220>
<223> sonda POMC antisentido

15 <400> 14
ggcgtctggc tcttctcgga ggtc 24

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una sustancia que estimula la expresión de un receptor de un neuromediador codificado por el gen POMC elegido de MC-1R, MC-2R y opioide μ R, en al menos un tipo de células de la piel que expresan al menos uno de estos receptores y un producto del gen POMC, como principio activo en una composición cosmética, en donde
- 5 dicha sustancia es un extracto de la planta milenrama común (*Achillea millefolium*), para prevenir o combatir los efectos de estrés que inducen las variaciones observadas durante el proceso de envejecimiento cutáneo, y/o para prevenir y/o combatir la disminución de la homeostasis epidérmica como parte del contexto general del envejecimiento, y/o para mejorar la proliferación y diferenciación celulares, a nivel epidérmico, y/o para prevenir y/o combatir la disminución del espesor epidérmico durante el envejecimiento cutáneo cronobiológico o fotoinducido, o para generar una sensación
- 10 de bienestar, y en donde las células de la piel son queratinocitos.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha sustancia también aumenta o mantiene la expresión de POMC.
3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para estimular la expresión de dicho receptor para aumentar los efectos cosméticos de la alfa-MSH y/o la ACTH, y/o la β -endorfina.
- 15 4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para combatir o prevenir una desregulación de los efectos de la alfa-MSH y/o la ACTH, y/o la β -endorfina.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicha sustancia es un extracto vegetal y se utiliza en la composición cosmética en una cantidad comprendida entre el 0,01 % y el 5 % (v/v).
- 20 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicha sustancia es un extracto vegetal obtenido mediante la maceración de dicha planta al 1-10 % (p/p) en un disolvente o una mezcla de disolventes.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** la mezcla de disolventes es una mezcla de agua y alcohol, glicol o poliol de 100/0 a 0/100.
- 25 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicho disolvente es agua.

FIG.1



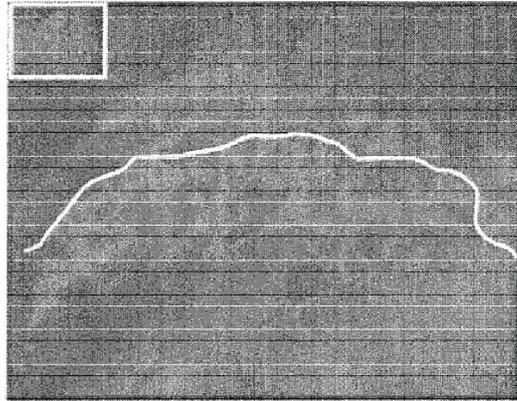


FIG.2A

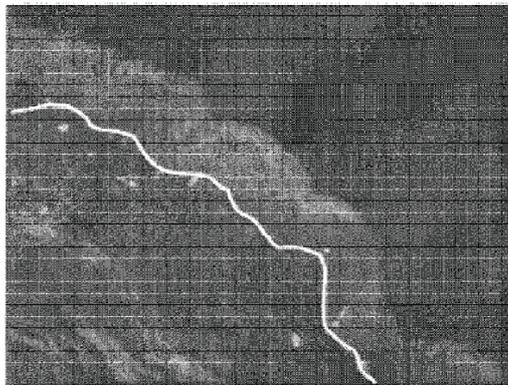


FIG.2B

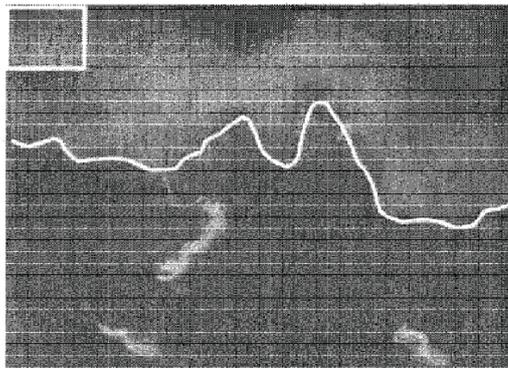


FIG.2C

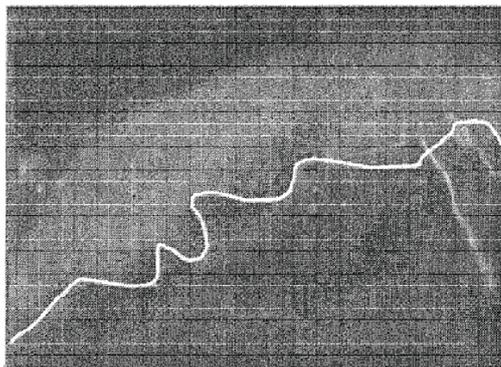


FIG.2D

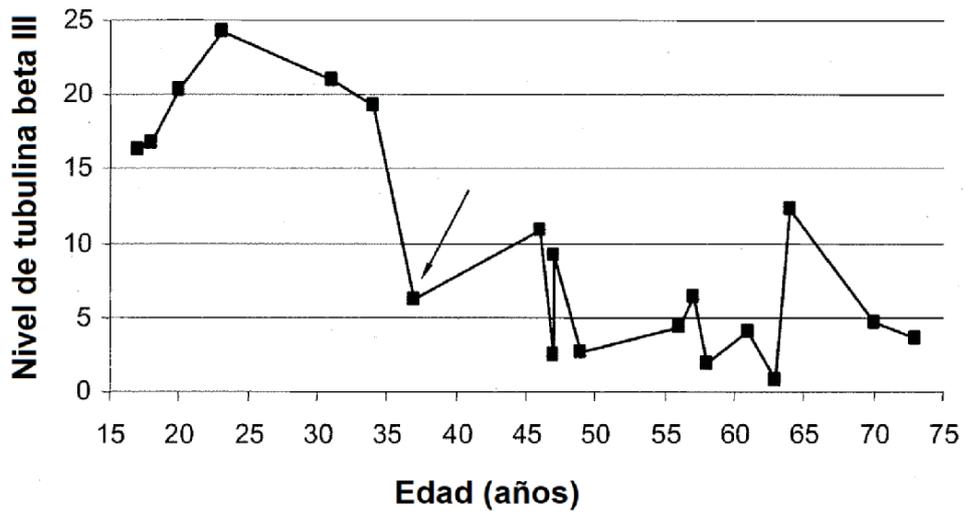


FIG.3

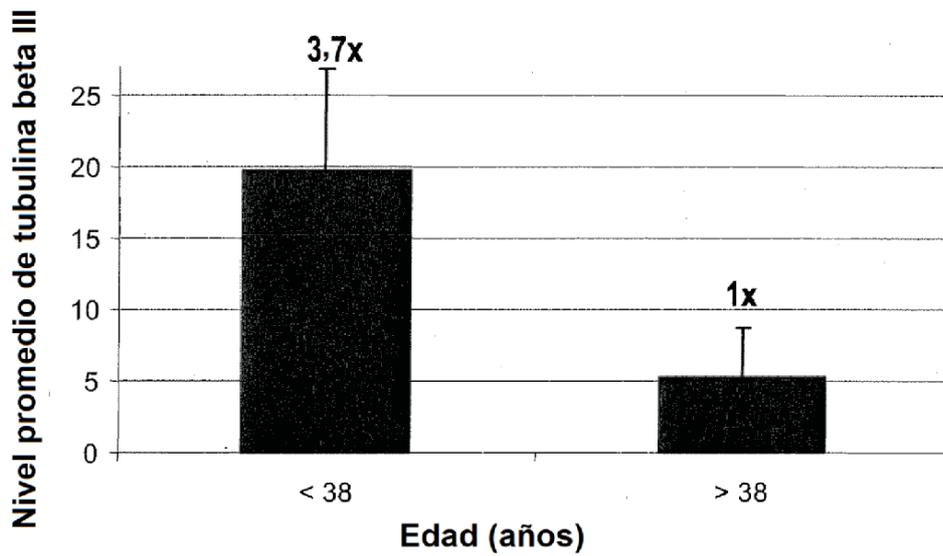


FIG.5

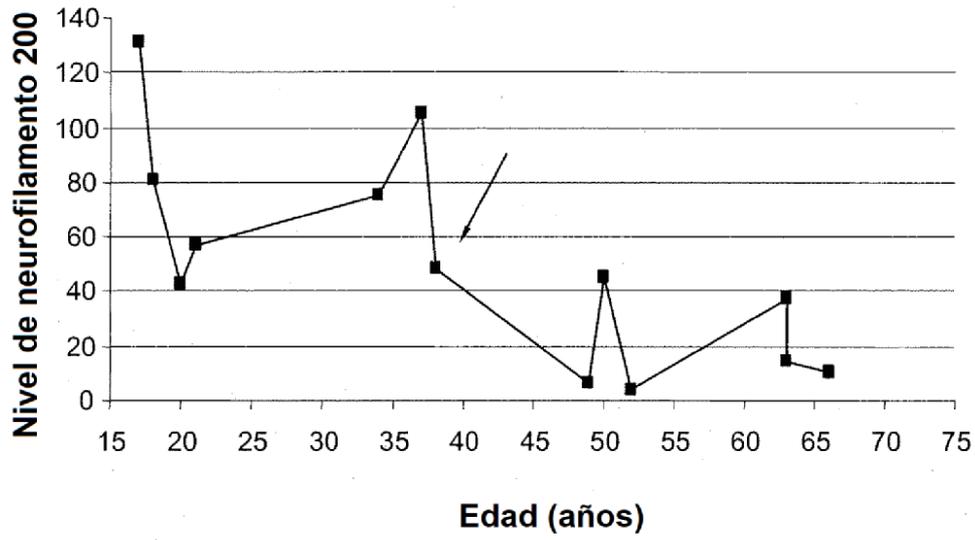


FIG.4

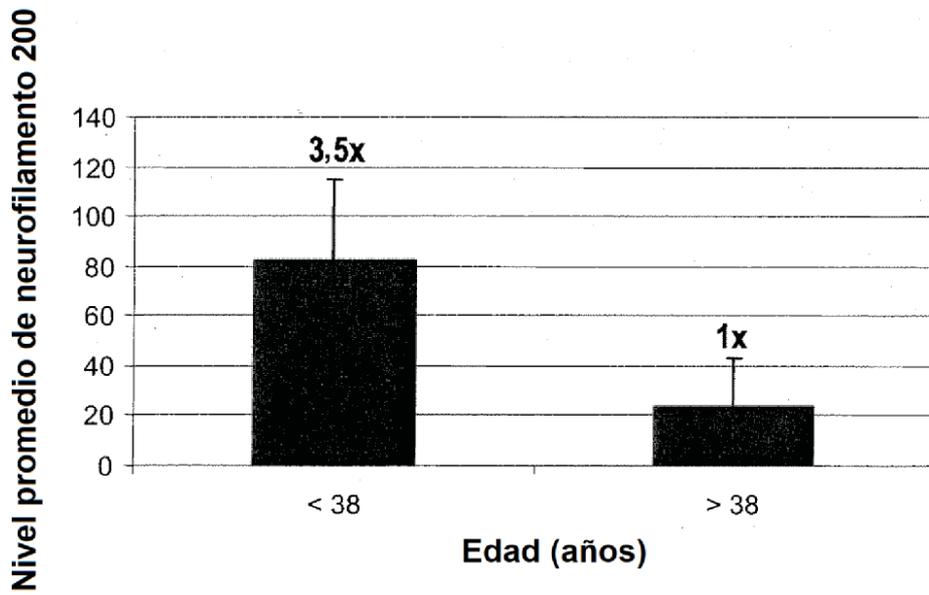


FIG.6