

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 304**

51 Int. Cl.:

A61K 8/20 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 13181653 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2689767**

54 Título: **Métodos para mejorar el estado y el aspecto de la piel**

30 Prioridad:

22.12.2004 US 21073

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

27.12.2019

73 Titular/es:

**AVON PRODUCTS, INC. (100.0%)
777 Third Avenue
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**DRYER, LAURENCE y
PTCHELINTSEV, DMITRI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 736 304 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

Métodos para mejorar el estado y el aspecto de la piel

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere, en general, al uso de composiciones cosméticas para mejorar el estado y el aspecto de la piel.

Antecedentes de la invención

10 Hay una creciente demanda en la industria cosmética de desarrollo de productos que puedan aplicarse por vía tópica en la piel que mejoren el estado y el aspecto de la piel. A los consumidores les interesa mitigar o retrasar los signos dermatológicos de la piel envejecida cronológica u hormonalmente o fotoenvejecida, tales como líneas de expresión, arrugas y flacidez de la piel y otros problemas debidos a la degradación progresiva de la unión dermis-epidermis (DEJ, por sus siglas en inglés) y de la cohesión célula-célula en la epidermis. Durante el proceso de envejecimiento, la complejión de la piel, es decir, el color y el aspecto de la piel, se deteriora lentamente por el envejecimiento o la exposición a la luz solar. Se han desarrollado numerosos tratamientos cosméticos y médicos en un intento por tratar la piel que envejece o la piel envejecida. Dichos cosméticos o tratamientos contienen comúnmente ácidos orgánicos como principios activos o componentes. Estos principios activos con frecuencia se asocian a molestias para el consumidor, tales como ardor, picor y enrojecimiento.

15 Por lo tanto, hay una necesidad general en la industria cosmética de productos que retarden o contrarresten los efectos del envejecimiento en la piel y más específicamente de productos que produzcan dichos efectos sin los efectos secundarios indeseables. En particular, hay la necesidad de composiciones cosméticas que se apliquen por vía tópica que supongan beneficios antienvjecimiento y de la textura de la piel usando materiales vegetales naturales como componentes activos.

20 *Plumbago indica* Linn. de la familia Plumbaginaceae, también conocida como Plumbago rojo y Jettamoonpleung se ha empleado para diversos fines medicinales. Se han usado raíces raspadas en emplastos en el caso de que se apliquen los emplastos en la cabeza o en el área que esté dolorida o inflamada. También se puede usar la corteza como un parche eficaz para ampollas y puede aplicarse en la columna vertebral para tratar ciertas fiebres. También se dice que la *Plumbago indica* Linn., presenta actividades antidispépticas, antimicrobianas y antifertilidad. El laurel *Plumbago indica* Linn., se encuentra comúnmente en Asia tropical y en Tailandia.

25 *Cananga odorata* Lamk. de la familia Annonaceae, comúnmente conocida como Ylang-Ylang, Alanguilan y Kradung-nga y específicamente sus aceites esenciales pueden usarse en medicina tradicional para aliviar el dolor y para relajación. *Cananga odorata* Lamk. se distribuye por toda la región de Asia del Sur, pero principalmente como planta cultivada. En particular, este árbol se encuentra comúnmente en todas las regiones de Tailandia.

30 *Sapindus rarak* de la familia Sapindaceae comúnmente conocida como el árbol de nueces de lavado y Ma Kam Dee Kao en tailandés, puede usarse en medicina tradicional. Puede tomarse la decocción de frutos de *Sapindus rarak* como antipirético y para aliviar el asma. También pueden usarse externamente extractos de agua caliente de frutos y flores como antifúngico, antibacteriano, anticaspa y contra enfermedades del cuero cabelludo y para reducir la inflamación que resulta de erupciones cutáneas. Además de los beneficios mencionados, *Sapindus rarak* también presenta actividades antiparasitarias y analgésicas. *Sapindus rarak* crece comúnmente en bosques vírgenes en lo alto de una montaña principalmente en la parte del Norte de Tailandia.

35 *Curcuma Xanthorrhiza* Roxb. de la familia Zingiberaceae, comúnmente conocida como cúrcuma silvestre y Wan Too Ra Hod en tailandés, soporta una sorprendente similitud con la cúrcuma australásica, solo las brácteas de las flores son de un color rosa intenso/púrpura y tienen una raya oscura en el centro de la hoja. Sin embargo, *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. no es igual que la cúrcuma común o Khamin chan como se conoce en tailandés, aunque tengan parecido. Con frecuencia se ha usado *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. medicinalmente como bebida cociendo rodajas secas de rizoma en agua con azúcar de palma. Otra bebida de hierbas utiliza bulbos desmenuzados que se hierven en agua y azúcar de palma. También pueden comerse crudos o cocidos brotes, flores y rizomas, así como partes jóvenes de la planta. En los cultivos asiáticos se usa esta planta en mezclas para dolencias de hígado, cálculos e indigestión. También se ha demostrado que la *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., ayuda en la reducción del colesterol y en la limpieza de la sangre. La familia de la planta *Curcuma* se ha usado durante siglos en Tailandia, Java y Bali para embellecer, perfumar, tensar y desodorizar la piel. Se ha demostrado que la cúrcuma o *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivíricas. El constituyente clave de la *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., la curcumina, reduce la inflamación por hasta aproximadamente un 50 % y actúa como antioxidante.

40 *Physalis minima* Linn., de la familia Solanaceae, también conocida como hierba mora, grosella espinosa y Tong Tang, se usa comúnmente en medicina tradicional. Se considera que el fruto es tónico, diurético y purgante en Punjab (India). Los Mundas (una tribu) de Chhota-Nagpur mezclan el jugo de las hojas con agua y aceite de mostaza y lo usan como remedio contra los dolores de oído. La planta *Physalis minima* presenta actividades estimuladoras del apetito, diuréticas, laxantes y antiinflamatorias. También puede usarse la planta para tratar el

agrandamiento del bazo y diversas afecciones abdominales. La *Physalis minima* Linn., se encuentra comúnmente en Tailandia, en particular en las provincias de Chiang Mai, Angtong, Nakornsrihummarath y Mahasarakham.

5 *Stephania rotunda* Lour. de la familia Menispermaceae es una planta de vid y su nombre común tailandés es Boorapet Pung Chang. La decocción de las hojas y raíces se toma como un estimulante del apetito en la medicina tradicional. Las flores se pueden usar de manera externa para tratar enfermedades cutáneas tales como dermatofitosis e infección fúngica. También se puede usar *Stephania rotunda* Lour. para el tratamiento de úlceras y generalmente se sabe que presenta actividades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias. Esta planta se cultiva comúnmente en el Sur de Tailandia.

10 Sería deseable tener una composición tópica que comprenda un material vegetal natural para mejorar el aspecto estético de la piel. También sería deseable tener un tratamiento eficaz para los signos dermatológicos de envejecimiento. Por lo tanto, los métodos seguros, eficaces y nuevos para tratar, prevenir, reducir, inhibir o mejorar los signos dermatológicos del envejecimiento, serían ventajosos para la formulación de tratamientos para la piel. Como se describe en la presente memoria, se proporcionan métodos nuevos y beneficiosos, así como su modo de acción, para el tratamiento de arrugas y similares, por la presente invención.

15 En la base de datos GNPT (Mintel), ID de registro 262567, se describe un champú que se considera que contiene un extracto de *Sapindus rarak*. E. Wina et al., *Journal of Animal and Feed Sciences*, vol. 13, enero de 2004, pp. 247-250 describen el uso de un extracto de *Sapindus rarak* para fines veterinarios. Kumar Naphatsorn et al., *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, febrero de 2012, pp. 765-771 se refieren a *Sapindus rarak* como planta medicinal tradicional para el tratamiento del cabello. En la Patente Japonesa JP 2001-220320 A se describe una composición de agente para hacer crecer el cabello que puede contener un extracto de *Sapindus rarak*. En la Patente Japonesa JP 2004-002267 A se describe un inhibidor de la colagenasa que puede comprender un extracto de *Lerak/Sapindus rarak*.

Sumario de la invención

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método cosmético no terapéutico para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel que comprende aplicar por vía tópica a la piel una composición tópica que comprende:

(a) una cantidad cosmética, dermatológica, farmacéutica o fisiológicamente eficaz de al menos un extracto vegetal suficiente para incrementar los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa, ácido hialurónico sintasa y sus combinaciones y

30 (b) un vehículo cosmética, dermatológica, farmacéutica o fisiológicamente aceptable,

en una cantidad eficaz para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel, en donde al menos dicho extracto vegetal se selecciona del grupo que consiste en: *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*, *Cananga odorata*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Physalis minima*, *Stephania rotunda*.

35 Estos y otros objetos y ventajas de la presente invención, y sus equivalentes, se consiguen mediante composiciones cosméticas con un ingrediente vegetal natural o sus mezclas y métodos para uso de dichas composiciones para aplicación tópica para mejorar el aspecto estético de la piel.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención usa composiciones tópicas que tienen un componente activo procedente de un material vegetal natural. Más en particular, en la presente invención se usan composiciones tópicas que tienen materiales vegetales naturales en forma de extractos procedentes de ahí o mezclas de materiales vegetales naturales de estos, que mejoran el aspecto estético o el estado de la piel y rejuvenecen o realzan la piel proporcionando diversos beneficios contra el envejecimiento y para la textura de la piel. Las mejoras en el aspecto estético de la piel pueden conseguirse por aplicación tópica de estas composiciones cosméticas a la piel a diario.

45 La presente invención se refiere al nuevo uso de materiales vegetales naturales en forma de extracto de plantas de *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de las plantas *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* y *Stephania rotunda*, respectivamente, en una composición cosmética tópica para aplicación en el rostro o en el cuerpo para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel.

50 Las composiciones tópicas que tienen un material vegetal natural en forma de extracto procedente de ahí pueden usarse para tratar, prevenir, paliar o reducir los signos dermatológicos del envejecimiento cronológico, que representa los cambios estructurales, funcionales y metabólicos en la piel que se producen en paralelo con el envejecimiento y los cambios degenerativos en otros órganos del cuerpo o piel fotoenvejecida, que es un proceso separado e implica en gran parte el daño del colágeno y las fibras de elastina en la piel, como líneas de expresión, arrugas y flacidez de la piel y otros problemas debidos a una degradación progresiva de la unión dermis-epidermis (DEJ) y de la cohesión célula-célula en la epidermis, para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel.

Los síntomas del envejecimiento cronológico incluyen: piel seca y fina, arrugas finas, vasos sanguíneos anormales, manchas de envejecimiento y tumores de la piel benignos y malignos. La piel joven se renueva más frecuentemente que una piel envejecida. Las capas superiores de ese modo pierden más humedad debido al proceso de envejecimiento y una piel envejecida tiene un aspecto más seco y más deshidratado. La producción disminuida de colágeno conduce a arrugas finas observadas inicialmente alrededor de los ojos (comúnmente conocidas como «patas de gallo»), la frente y otras áreas expuestas al sol. Efectos más pronunciados incluyen surcos en el lugar de las líneas de expresión faciales y pliegues flácidos en los párpados, el cuello, la mandíbula y los brazos. En muchos vasos sanguíneos delicados y pequeños que suministran nutrientes a la piel, se desarrollan anomalías. Esto es particularmente llamativo en la nariz y en las mejillas. Las manchas de envejecimiento son pigmentaciones que surgen como resultado de una desregulación de las células pigmentarias en las áreas expuestas al sol.

Si bien la genética desempeña un papel significativo, el número de arrugas presentes depende mucho de la cantidad de exposición al sol. Las líneas en un «rostro maduro», especialmente para los que pasan una cantidad de tiempo considerable en el exterior, es una consecuencia en parte del daño oxidativo debido a la sobreexposición a luz solar ultravioleta (UV) - tanto UVA (responsable del bronceado, la formación de arrugas y melanoma) como UVB (responsable de quemaduras solares y carcinoma de células basales y escamosas). La luz ultravioleta puede dañar además la piel incrementando la producción de enzimas proteolíticas que destruyen el colágeno, el tejido conjuntivo localizado bajo la dermis.

La piel está constituida por múltiples capas de células que experimentan constantemente autodescarnación y regeneración cada 30 días en ciclos repetidos. Las capas pueden dividirse ampliamente en dos secciones - la epidermis superior y la dermis subyacente. Los estudios histológicos de la piel muestran que se forma una arruga después de una serie de cambios celulares principales. Durante la fase temprana de envejecimiento (de 35 a 45 años), hay una ralentización gradual y progresiva de la renovación y la regeneración celulares. Esto da como resultado que la piel se vuelve más fina. Como resultado, la unión dermis-epidermis (DEJ) del tipo surco que se ondula normalmente se vuelve más plana. Esta lisura reduce la superficie de intercambio nutricional entre la dermis subyacente en el fondo y la epidermis en la parte superior.

La nutrición reducida en la epidermis a causa del envejecimiento es un factor que ocasiona el agotamiento y la debilidad celulares. Sin una nutrición apropiada de la epidermis, el metabolismo celular de la célula epidérmica se ralentiza. Por otra parte, el transporte de ciertos subproductos no deseados del metabolismo celular tales como los radicales libres se reduce. La acumulación de dichos radicales libres en la célula puede conducir a daños mutacionales no deseables en la célula y por último a cáncer.

La adhesión en la DEJ es suministrada normalmente por el colágeno 4 (una estructura multilaminar o capa basal) y colágeno 7 (anclado a la estructura de las láminas). La pérdida progresiva de nutrientes en la DEJ ralentiza la circulación de los mensajeros que sirven para promover el proceso de neosíntesis de dicho colágeno. Sin una cantidad óptima de colágeno, la piel se vuelve flácida incluso más, propagándose la escasez de nutrientes. Paradójicamente, una piel madura que envejece contiene más elastina, que usa el cuerpo para rellenar el espacio vacío que queda por la deficiencia de colágeno. Dicha elastina, desafortunadamente, se fragmenta, calcifica y contiene lípidos en exceso. Además de la pérdida de espesor de la piel debido a la falta de soporte de colágeno, la piel que envejece o envejecida está más floja y carece de elasticidad. Estas dos propiedades son características de las arrugas. Este proceso de envejecimiento y el aspecto de las arrugas se aceleran durante la fase posterior de envejecimiento (más de 45 años). A los 50, muy pocas mujeres pueden escapar de las arrugas.

Las realizaciones de la invención se refieren al descubrimiento de que los materiales vegetales naturales identificados en la presente invención disminuyen las líneas de expresión y las arrugas, así como atenúan la flacidez u otros problemas debido a una matriz cutánea debilitada, en una composición o formulación cosmética tópica. Preferiblemente, se aplica la composición por vía tópica al área afectada de la piel una vez, dos veces o más al día y se deja en el área afectada. La aplicación diaria puede dejarse en el área afectada de la piel durante un periodo de al menos una semana, pero puede ser durante un periodo de hasta dos, cuatro, ocho, doce semanas o más para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel.

En particular, el material vegetal natural en forma de extracto vegetal de *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* y *Stephania rotunda*, incrementa la expresión de uno o más de los siguientes genes: beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa, de manera que cuando se administra por vía tópica la composición que tiene el material vegetal natural, mejora el estado y el aspecto estético de la piel debido a los signos dermatológicos del envejecimiento por suavizado de las líneas faciales, las arrugas y la piel flácida. Las composiciones tópicas se aplican preferiblemente y se dejan en el área afectada a diario.

Composición tópica

Para los fines de la invención, el material vegetal natural puede estar en forma de extractos derivados directa o sintéticamente de la planta.

En una realización de la invención, las composiciones tópicas que tienen un material vegetal natural en forma de un

extracto vegetal seleccionado del grupo que consiste en *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* y *Stephania rotunda* son útiles para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel, en particular la piel madura o que va madurando, por uno cualquiera de los métodos siguientes: reducir los signos dermatológicos de envejecimiento cronológico, fotoenvejecimiento, envejecimiento hormonal o envejecimiento actínico; prevenir o reducir el aspecto de las líneas o arrugas; reducir la evidencia de las líneas y arrugas faciales, arrugas faciales en las mejillas, la frente, arrugas perpendiculares entre los ojos, arrugas horizontales sobre los ojos y alrededor de la boca, líneas de marioneta y en particular arrugas profundas o pliegues; prevenir, reducir o disminuir el aspecto o la profundidad de las líneas o arrugas; mejorar el aspecto de las líneas suborbitales o las líneas periorbitales; reducir el aspecto de las patas de gallo; rejuvenecer o revitalizar la piel en particular la piel que envejece; reducir la fragilidad de la piel; prevenir o revertir la pérdida de glucosaminoglucanos o colágeno; paliar los efectos de desequilibrio de estrógenos, prevenir la atrofia de la piel, prevenir, reducir o tratar la hiperpigmentación; minimizar la decoloración de la piel; mejorar el tono de la piel, la luminosidad, la claridad o la tersura; prevenir, reducir o paliar la flacidez de la piel; mejorar la firmeza de la piel, la plenitud, la flexibilidad o la suavidad; mejorar la producción de procolágeno o colágeno; mejorar la textura de la piel o promover la retexturización; mejorar la reparación de la barrera de la piel o la función; mejorar el aspecto de los contornos de la piel; restaurar el lustre de la piel o el brillo; minimizar los signos dermatológicos de fatiga o estrés; resistir al estrés medioambiental; reponer los ingredientes en la piel disminuidos por el envejecimiento o la menopausia; mejorar la comunicación entre las células cutáneas; incrementar la proliferación o multiplicación celular; incrementar el metabolismo de las células cutáneas disminuido por el envejecimiento o la menopausia; retardar el envejecimiento celular; mejorar la hidratación de la piel; reforzar el espesor de la piel; incrementar la elasticidad de la piel o la resiliencia; reforzar la exfoliación; mejorar la microcirculación; disminuir o prevenir la formación de celulitis y cualquiera de sus combinaciones:

Los materiales vegetales naturales para uso en la presente invención se seleccionan de las siguientes plantas: *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* y *Stephania rotunda*.

Incrementan los niveles de expresión de los genes asociados a los signos dermatológicos del envejecimiento. Estos genes incluyen, sin limitación, beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa.

La composición puede tener un extracto procedente de un material vegetal natural en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, preferiblemente de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 20 %, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 1 %, basado en el peso total de la composición, donde la composición es útil para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel.

El material vegetal natural procede de *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* y *Stephania rotunda* e incrementa los niveles de expresión de uno cualquiera de los genes a continuación o sus combinaciones: beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa. Los materiales vegetales naturales que incrementan los niveles de expresión de los genes asociados a los signos dermatológicos de la piel envejecida cronológica u hormonalmente o fotoenvejecida, tales como líneas de expresión, arrugas y piel flácida y otros estados debidos a una degradación progresiva de la unión dermis-epidermis (DEJ) y de la cohesión célula-célula en la epidermis, para mejorar el estado y el aspecto estético de la piel y la composición que comprende una o más de estas plantas son eficaces cuando se aplican por vía tópica, preferiblemente a diario. Sin ánimo de apoyar ninguna teoría, los materiales vegetales naturales, que incrementan la expresión génica de los genes mencionados, ejercen su efecto por un mecanismo de acción que implica la unión dermis-epidermis de la piel, la comunicación entre la dermis y la epidermis de la piel y las propiedades mecánicas de la piel, así como, la cohesión célula a célula en la epidermis de la piel, anclando las células de la piel, la comunicación entre células de la piel y la estabilidad tisular de la piel. La aplicación tópica de la planta también facilita el suministro diana de los componentes activos sin el requerimiento de una inyección o la experiencia de un profesional del sector de la salud.

Los componentes activos se usan además en el tratamiento, que incluye prevenir, detener, paliar, reducir o disminuir, los problemas médicos o cosméticos de la piel. Dichos problemas, como se usan en la presente memoria, incluyen comúnmente, sin limitación, envejecimiento dermatológico (envejecimiento cronológico, envejecimiento hormonal o envejecimiento actínico), dermatitis, fragilidad de la piel o del pelo, hirsutismo, rosácea, manchas cutáneas, piel sensible, hiperpigmentación o hipopigmentación, adelgazamiento de la piel, aspereza, queratosis, atrofia de la piel, arrugas, líneas, hiperplasia, fibrosis y cualquiera de sus combinaciones. Los componentes activos también pueden ser útiles en el refuerzo de la salud general, la vitalidad, el estado y el aspecto de la piel.

Las composiciones tópicas que tienen los componentes activos mencionados de un material vegetal natural, donde los componentes activos incrementan los niveles de expresión de los genes, seleccionados de beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa, mejoran el estado, el aspecto cosmético o estético de la piel.

Las proteínas Wnt forman una familia de moléculas de señalización segregadas altamente conservadas que regulan

- 5 las interacciones célula a célula durante la embriogénesis. Los genes Wnt y la señalización Wnt también están implicados en el cáncer. Las apreciaciones en los mecanismos de acción Wnt han emergido de varios sistemas, incluyendo, genéticos en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*; así como la bioquímica en cultivo celular y expresión de genes ectópicos en embriones *Xenopus*. Muchos genes Wnt en el ratón han mutado, conduciendo a defectos de desarrollo muy específicos. Las proteínas Wnt se unen a los receptores de la familia Frizzled (FZ) en la superficie celular. A través de diversos componentes de transmisión citoplasmáticos, la señal se transduce a beta-catenina, que entra después en el núcleo y forma un complejo con factor de transcripción (TCF) para activar la transcripción de los genes diana Wnt.
- 10 Los genes Frizzled (Fz) codifican una familia de receptores de ligandos Wnt, que presentan un dominio de unión de Wnt rico en cisteína conservado e incluye formas tanto transmembrana como segregadas. Alterar la señalización de Wnt da como resultado formación de pelo, crecimiento de pelo y estructura del pelo aberrantes. La expresión elevada de Fz10 se confinó a desarrollar folículos de pelo (Reddy, et al. Expression of Frizzled Genes in Developing and Postnatal Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 123 (2), 275-282,2004; incorporado por referencia).
- 15 La beta-catenina es un componente citoesquelético que entra en el núcleo para actuar como cofactor de transcripción. La fosforilación de la beta-catenina induce la ubiquitinación y la degradación proteolítica de la beta-catenina por el proteasoma. La beta-catenina no fosforilada es estable y entra en el núcleo para regular la transcripción con TCF. El complejo beta-catenina/TCF activa de ese modo genes que promueven la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celulares durante el desarrollo.
- 20 El colágeno, que presenta diversas formas, es una proteína corporal principal y justifica casi un 20 % de la proteína total en el cuerpo humano. Además de su papel crítico en la formación de estructura de soporte de la piel, también es el constituyente principal de la matriz extracelular. Se sabe que las mutaciones en el colágeno 7 están implicadas en muchos tipos de epidermólisis bullosa, una enfermedad humana caracterizada por la separación de capas de la dermis y la epidermis (Pulkkinen L, et al. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18:29-42, 1999; incorporado por referencia). El colágeno 4 se asocia a la matriz extracelular y la formación de la zona de membrana basal, que es responsable de la adhesión de la epidermis a la dermis en la piel humana.
- 25 La activación de ER α es responsable de muchos procesos biológicos, incluyendo crecimiento y diferenciación celulares, morfogénesis y muerte celular programada (Katzenellenbogen, B. S. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod.*, 54, 287-293, 1996; Katzenellenbogen, B. S., et al. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 44, 23-38, 1997; ambas incorporadas por referencia). Además, ER α desempeña un papel importante en el desarrollo y el progreso del cáncer de mama por regulación de genes y rutas de señalización implicadas en la proliferación celular.
- 30 El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido que se encuentra en la matriz extracelular de los tejidos de los vertebrados y en el recubrimiento superficial de ciertos *Streptococcus* y patógenos bacterianos *Pasteurella*. Las HA sintasas (las HAS) son las enzimas que polimerizan HA. Se sabe que HA es segregada de la célula y, por consiguiente, las HAS se encuentran normalmente en las membranas externas de los organismos.
- 35 Incrementos en los niveles de expresión de genes específicos asociados a la degradación progresiva de la unión dermis-epidermis (DEJ), incluyendo una comunicación deficiente entre dermis y epidermis, deficientes propiedades mecánicas de la piel y de la cohesión célula-célula, incluyendo un deficiente anclaje de las células, una deficiente comunicación célula-célula y una deficiente estabilidad de los tejidos, en la epidermis son particularmente útiles en las composiciones tópicas de la presente invención. En una realización, los genes útiles incluyen, sin limitación, beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa. Cualquier material vegetal natural, incluyendo un extracto derivado de ahí, que incremente la expresión de uno cualquiera de estos genes, se encuentra útil en las composiciones tópicas de la presente invención.
- 40 La expresión génica puede medirse por la determinación de los niveles de ARN en las células cultivadas, por ejemplo, usando técnicas tales como la tecnología *Northern blot* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), por ejemplo, PCR en «tiempo real» y PCR de transcripción inversa (RT PCR) como se practica en la técnica. (véase, por ejemplo, J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, Nueva York; R. Higuchi et al., 1992, *Biotechnology*, 10:413-417; R. Higuchi et al., 1993, *Biotechnology*, 11:1026-1030; E. S. Kawasaki, 1990, *Amplification of RNA*, en: *RNA Protocols: A Guide to Methods & Applications*, M. A. Innis et al., *Academic Press*, San Diego, CA, pp. 21-27; todas las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia). Además, la expresión génica en la piel, sustituto de piel o células cultivadas puede evaluarse usando matrices de genes (ADNc) (micromatrices o matrices de ensayo de genechip de ácidos nucleicos comprendiendo membrana, materiales de soporte del vidrio o plástico), análisis en serie de expresión génica (SAGE), (por ejemplo, como describen V. E. Velculescu et al., *Science*, 270(5235):484-487, 1995; A. Lal et al., *Cancer Res.*, 59(21):5403-5407, 1999; ambos incorporados en la presente memoria como referencia) o técnicas de representación diferenciada. En el ejemplo 3 se muestran los resultados de la expresión génica de beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa en el tratamiento con materiales vegetales naturales.
- 55

- También se describe el uso de genes asociados a signos dermatológicos de envejecimiento, tales como líneas de expresión, arrugas y piel flácida como biomarcadores para compuestos que pueden mejorar el estado y el aspecto de la piel. Si los niveles de expresión de dichos biomarcadores de ácidos nucleicos son elevados en presencia de un material vegetal natural, el material vegetal natural puede usarse en una composición tópica de la invención para mejorar el estado y el aspecto de la piel. Dichas pruebas abarcan diversos métodos para medir niveles de ácidos nucleicos en células que han sido expuestas a una o más de las sustancias de ensayo. Los métodos adecuados incluyen la detección y evaluación de la activación de genes o expresión de genes, por ejemplo, ADN, ARN o ARNm. Como ejemplos no limitantes, pueden emplearse pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, RT-PCR), *Northern blotting*, hibridación *in situ* y otras pruebas como se conocen y se practican en la técnica para cuantificar ARN en las células en las que se está probando la tolerancia a un tratamiento particular (véase, por ejemplo J. O'Connell, 2002, RT-PCR Protocols, *Humana Press*, Totowa, NJ; R. Rapley y D. L. Manning, 1998, RNA Isolation and Characterization Protocols, *Humana Press*; R. Rapley, 2000, Nucleic Acid Protocols Handbook, *Humana Press*; todos los cuales se incorporan en la presente memoria por referencia). De acuerdo con dichas pruebas, si los niveles de al menos un biomarcador de ácidos nucleicos son elevados en presencia de una o más sustancias de ensayo, esto puede predecir que las sustancias mejorarán los signos dermatológicos de envejecimiento. Estas sustancias o los materiales vegetales naturales pueden usarse después en una composición tópica, aplicarse preferiblemente a diario en la piel, para tratar, prevenir, paliar o reducir los signos de envejecimiento dermatológico, especialmente líneas de expresión, arrugas y piel flácida, mejorando de ese modo el estado y el aspecto estético de la piel.
- El material vegetal natural como se usa en la presente memoria, también incluye extractos «sintéticos», es decir, diversas combinaciones de componentes de materiales vegetales naturales conocidos o constituyentes que se combinan para imitar sustancialmente la composición o la actividad del material vegetal natural. Dichos extractos sintéticos se incluyen en el término «extracto de material vegetal natural». Lo más preferiblemente, los extractos sintéticos presentan sustancialmente el mismo número de componentes activos que un material vegetal natural. La correspondencia de la incidencia numérica de principios activos entre los extractos sintéticos y el material vegetal natural también puede describirse en términos de «porcentaje de coincidencia».
- Otra realización se refiere a un extracto sintético que tiene aproximadamente un 50 % o más de coincidencia para la composición química del material vegetal natural. Por ejemplo, el extracto sintético presenta aproximadamente un 50 % o más de los componentes activos encontrados en el material vegetal natural. La composición química del extracto sintético puede presentar aproximadamente un 70 % o más de coincidencia para la composición química del material vegetal natural. Un extracto sintético puede presentar aproximadamente un 90 % o más de coincidencia para la composición química del material vegetal natural.
- Para uso en el método de la invención, el material vegetal natural o los componentes activos derivan directamente del material vegetal natural, incluyendo la planta completa, sus semillas, agujas, hojas, raíces, corteza, piñas, tallos, rizomas, células de callosidades, protoplastos, órganos y sistemas de órganos y meristemas. Los componentes pueden estar en una forma pura, una forma semipura o una forma no purificada. El material vegetal natural en forma de extracto puede obtenerse por extracción de toda la planta o de varias partes de la misma, con etanol al 80 %.
- En resumen, el método de extracción en disolvente orgánico implica lavar y extraer el material vegetal usando un disolvente orgánico. Ejemplos no limitantes de disolventes orgánicos incluyen metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, cloroformo, hexano, xileno y éter de petróleo. Puede usarse una máquina de extracción para extracción en disolvente orgánico como se conoce en el campo.
- La extracción en disolvente orgánico implica recoger las materias primas de la planta que contiene los constituyentes deseados, tales como semillas, agujas, hojas, raíces, corteza, piñas, tallos, rizomas, células de callosidades, protoplastos, órganos y sistemas de órganos y meristemas. Estos materiales vegetales se trituran en tamaños de partícula pequeños y después se ponen en una máquina de extracción a través de una entrada para las materias primas por una máquina de carga medible. Se presiona la materia prima vegetal en la máquina de extracción mediante un empuje y se desplaza lentamente el material bruto vegetal hacia adelante. Puede añadirse disolvente orgánico (por ejemplo, etanol) en la máquina por una entrada de disolvente en la parte superior de una salida de descarga de desechos. Debido a la diferencia de gravedad y de equilibrio, el disolvente fluye hacia la entrada de materia prima, se remojan los materiales y fluye fuera del lado opuesto de la entrada del disolvente. Puesto que los materiales vegetales y el disolvente se desplazan en direcciones opuestas entre sí, los materiales vegetales están constantemente sumergidos en una disolución que contiene una concentración baja de extracto. Como resultado del equilibrio, puede conseguirse un alto rendimiento de constituyentes vegetales por la extracción continua del material vegetal contra la disolución de baja concentración.
- Es adecuado un tiempo de extracción entre aproximadamente 1 y 8 horas y más preferiblemente está entre aproximadamente 2 y 6 horas y lo más preferiblemente está entre aproximadamente 3 y 5 horas. La temperatura de extracción está entre aproximadamente 30 °C y 90 °C, preferiblemente entre aproximadamente 40 °C y 70 °C y más preferiblemente entre aproximadamente 50 °C y 60 °C. El extracto recogido se filtra fino después para retirar partículas y puede usarse directamente o se concentra, por ejemplo, destilando el disolvente o por otro tratamiento convencional, donde el extracto también puede proporcionarse como polvo seco.

De manera similar, la extracción de disolvente acuoso-orgánico implica recoger inicialmente las materias primas de una planta que contiene los alcaloides deseados, tales como semillas, agujas, hojas, raíces, corteza, piñas, tallos, rizomas, células de callosidades, protoplastos, órganos y sistemas de órganos y meristemos de la planta, que se trituran en tamaños de partícula pequeños. El material vegetal triturado se remoja en una disolución acuosa que es
 5 ácida o alcalina, dependiendo de la solubilidad y la estabilidad del extracto deseado en condiciones ácidas o alcalinas (básicas). Para extracción en condiciones ácidas, se añade un ácido tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico a agua, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 3 % (p/v). Para extracción en condiciones alcalinas, se añade un álcali tal como hidróxido de sodio o carbonato de sodio al agua. El tiempo de extracción y la temperatura de extracción son típicamente similares a los usados en el método de extracción en disolvente orgánico
 10 descrito anteriormente.

El extracto se recoge después y se filtra fino para retirar partículas. Los agentes alcalinos (por ejemplo, amoníaco) o agentes acidificantes (por ejemplo, ácido sulfúrico) pueden añadirse al extracto para neutralizar la disolución ajustando el pH, dependiendo de la acidez o alcalinidad del extracto recogido. El extracto acuoso puede usarse directamente, concentrarse o secarse. Alternativamente, puede añadirse después disolvente orgánico a la disolución
 15 neutralizada para transferir los principios activos del extracto de una fase acuosa a una fase orgánica. Ejemplos no limitantes de dichos disolventes orgánicos incluyen, sin limitación, etanol, isopropanol, butanol, pentanol, hexanol y xileno. El extracto que comprende los principios activos del extracto transferidos disueltos en disolvente orgánico puede usarse directamente, usarse como un concentrado o secarse.

Pueden mezclarse y extraerse juntas diferentes plantas conteniendo diferentes constituyentes. Este proceso de extracción mixta puede usarse preferiblemente para extraer aquellas plantas que contengan constituyentes con una solubilidad similar en el disolvente usado para la extracción, tal como etanol. La mezcla de extractos puede ser concentrada y almacenada en un disolvente apropiado.
 20

Formulaciones

Según la invención, las composiciones tópicas que comprenden componentes del material vegetal natural incluyen, sin limitación, formulaciones aplicadas por vía tópica, antioxidantes, antiinflamatorios, filtros solares, cosméticos, incluyendo maquillaje, formulaciones para reducir los signos dermatológicos del envejecimiento, incluyendo arrugas, líneas de expresión y piel flácida, tópicos, potenciadores de la penetración en la piel y similares. También, según esta invención, el material vegetal natural, los componentes y los constituyentes adicionales que comprenden dichas composiciones pueden formularse en diversas formas del producto. Las composiciones pueden prepararse en sistemas de suministro diana, por ejemplo cremas, lociones, máscaras, geles, tónicos, sueros, parches transdérmicos y similares para administración tópica. La mejora de suministro diana o de penetración también puede conseguirse por iontoforesis.
 25
 30

Las composiciones que comprenden los materiales vegetales naturales para administración tópica pueden usarse sin inducir una irritación significativa. Las composiciones son adecuadas para todo tipo de piel, tal como piel sensible, normal, seca o grasa, preferiblemente de sensible a seca. En realizaciones particulares, las composiciones pueden ser adecuadas para piel seca. Las composiciones se aplican en la piel durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel. Las composiciones tópicas pueden aplicarse por vía tópica una, dos o más veces al día. La aplicación diaria puede aplicarse durante un periodo de una semana, dos semanas, cuatro semanas o más. La composición o la formulación tópica preferida puede aplicarse y dejarse en el área afectada una vez al día.
 35
 40

Las composiciones tópicas pueden formularse en liposomas que pueden comprender otros aditivos o sustancias o que pueden modificarse para alcanzar o permanecer de manera más específica en un sitio después de la administración. Las composiciones usadas en las realizaciones de la presente invención proporcionan mejoras en el estado y en el aspecto estético de la piel mediante el tratamiento de al menos uno de los estados previamente descritos o sus combinaciones.
 45

También se describen para uso en el método de la invención composiciones que comprenden una formulación cosmética o dermatológicamente aceptable que es adecuada para el contacto con tejido animal vivo, incluyendo tejido humano, virtualmente sin efecto fisiológico adverso para el usuario. Las composiciones tópicas usadas por esta invención pueden estar en cualquier forma cosmética o dermatológicamente adecuada, preferiblemente como loción o crema, pero también en una base anhidra o acuosa, así como en una forma líquida pulverizable. Otras formas adecuadas del producto cosmético para las composiciones incluyen, por ejemplo, una emulsión, una crema, un bálsamo, un brillo, una loción, una máscara, un suero, un tónico, un ungüento, una mousse, un parche, una pomada, una disolución, una pulverización, una barra a base de cera o una toallita. Además, las composiciones usadas en esta invención pueden incluir uno o más adyuvantes cosméticamente aceptables compatibles usados comúnmente y conocidos por el profesional experto, tales como colorantes, fragancias, emolientes, humectantes, conservantes, vitaminas, quelantes, espesantes, aceite de perilla o aceite de semilla de perilla, (Patente Internacional (WO 01/66067 para un Method of Treating a Skin Condition, incorporado adjunto) y similar, así como otros productos botánicos tales como aloe, camomila, y similares, y como se describe además a continuación.
 50
 55

También, están abarcados por la invención modos transdérmicos de suministro, tales como parches y similares, con

- o sin potenciadores de la penetración adecuados. Los métodos y las composiciones expresados por la invención proporcionan un medio por el cual pueden administrarse de manera eficaz los componentes del material vegetal natural en un sistema transdérmico. De acuerdo con esto, un medio transdérmico de suministro de una composición o formulación (con frecuencia con una composición que mejore la penetración) a la piel es el del parche transdérmico o un dispositivo similar como se conoce y se describe en la técnica. Ejemplos de dichos dispositivos se describen en las Patentes Estadounidenses números 5,146,846; 5,223,262; 4,820,724; 4,379,454 y 4,956,171, todas incorporadas en la presente memoria como referencia y sin pretensión de que tales descripciones sean limitantes. El modo transdérmico de almacenamiento y suministro de las composiciones en la piel, incluyendo el pelo, y la formación de la composición activa es conveniente y apropiado para los fines de una realización de la presente invención. En un método preferido, la aplicación es a través de un vehículo de liberación prolongada, por ejemplo, un parche de liberación prolongada aplicado por vía tópica. Preferiblemente, cuando se usa un parche tópico, el parche se aplica al área deseada durante un periodo de tiempo prolongado. Preferiblemente, el periodo de tiempo prolongado es mayor que una hora, lo más preferiblemente el periodo de tiempo prolongado es durante la noche, es decir, cuando el usuario está durmiendo.
- Los componentes del material vegetal natural están contenidos preferiblemente en un vehículo, medio, diluyente o portador, cosmética, dermatológica, fisiológica y farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento, la reducción, la paliación o la prevención de problemas asociados a una acumulación, producción o excreción en exceso de sebo y acumulación o producción en exceso de grasa subcutánea.
- En una realización que abarca aplicación tópica, las composiciones de esta invención comprenden un medio (vehículo, diluyente o portador) que sea compatible con la piel humana, incluyendo el pelo. Las composiciones pueden formularse como una fase acuosa, una fase oleosa, alcohol o disoluciones con base acuosa o a base de alcohol, ungüentos, lociones, geles, una emulsión de cera en agua o emulsiones de agua en aceite, de aceite en agua o emulsiones triples de agua-aceite-agua con el aspecto de una crema o un gel, microemulsiones o aerosoles.
- La fase acuosa es una mezcla de uno o más ingredientes solubles en agua o dispersibles en agua, que pueden ser líquidos, semisólidos o sólidos a temperatura ambiente (25 °C). El vehículo comprende o puede estar en la forma de suspensión, dispersión o disolución en agua o un vehículo acuoso-alcohólico, que puede contener un espesante o gelificante. Un experto en la materia puede seleccionar la forma cosmética apropiada, los ingredientes contenidos en la misma, así como el método para prepararla, sobre la base del conocimiento que posea el trabajador cualificado.
- En una realización, la composición puede incluir una fase acuosa que puede contener agua o una mezcla de agua y al menos un disolvente orgánico hidrófilo, en particular un alcohol, especialmente un monoalcohol inferior lineal o ramificado que contenga de 2 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, etanol o propanol; un poliol por ejemplo, propilenglicol, sorbitol, glicerol, diglicerol, pantenol o polietilenglicol y sus mezclas. Esta fase acuosa puede representar desde aproximadamente un 0,5 % en peso a aproximadamente 99,99 % en peso, basado en el peso total de la composición.
- En otra realización más cuando la composición está en forma de emulsión, la composición también puede comprender opcionalmente un tensioactivo, preferiblemente en una cantidad de desde aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente 30 % en peso y en particular, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, basado en el peso total de la composición.
- En una realización más de la invención, la composición también puede comprender un polímero espesante tal como un poliuretano anfífilo, un homopolímero o copolímero poliacrílico, un poliéster o una resina con base hidrocarbonada.
- En una realización de la invención se usa además una composición de la invención que también puede comprender una fase oleosa que contenga ingredientes solubles en aceite o dispersibles en aceite que sean líquidos a temperatura ambiente (25 °C) o sustancias oleosas o cerosas que sean sólidas a temperatura ambiente, tales como ceras, semisólidos, gomas y sus mezclas. Esta fase oleosa también puede contener disolventes orgánicos.
- Los materiales oleosos adecuados que son líquidos a temperatura ambiente, referidos con frecuencia como aceites, incluyen aceites con base hidrocarbonada de origen animal tales como perhidroescualeno; aceites vegetales con base hidrocarbonada tales como triglicéridos líquidos de ácidos grasos de 4 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, triglicéridos de ácido heptanoico u octanoico o aceites tales como aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de semillas de uva, aceite de ricino, aceite de aguacate, triglicéridos de ácido caprílico/cáprico, aceite de jojoba; hidrocarburos lineales o ramificados de origen mineral o sintético tales como parafinas líquidas y sus derivados, vaselina; ésteres y éteres sintéticos en particular ésteres de alcoholes grasos, es decir, por ejemplo, miristato de isoprilo, palmitato de 2-etilhexilo, estearato de 2-octildodecilo, isoestearato de isoestearilo; ésteres hidroxilados tales como lactato de isoestearilo, hidroxiestearato de octilo, hidroxiestearato de octildodecilo, heptanoatos, octanoatos y decanoatos de alcoholes grasos; ésteres de poliol tales como dioctanoato de propilenglicol, diheptanoato de neopentilglicol, diisononanoato de dietilenglicol y ésteres de pentaeritritol; alcoholes grasos que contienen de 12 a 26 átomos de carbono tales como octildodecanol, 2-butiloctanol, 2-hexildecanol, 2-undecilpentadecanol, alcohol oleílico; fluoroaceites con base parcialmente hidrocarbonada o aceites de fluorosilicona; aceites de silicona tales como polidimetilsiloxanos volátiles o no volátiles, lineales o cíclicos (PDMS) que sean

líquidos o semisólidos a temperatura ambiente tales como ciclometiconas y dimeticonas, que comprendan opcionalmente un grupo fenilo, por ejemplo, fenil trimeticonas, siloxanos y sus mezclas. Estos aceites están presentes normalmente en una cantidad de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 90 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 80 % en peso por peso de la fase oleosa.

- 5 La fase oleosa de la composición también puede comprender uno o más disolventes orgánicos cosméticamente aceptables. Estos disolventes están presentes en una cantidad de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 60 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 30 % en peso, basado en el peso total de la composición y pueden seleccionarse del grupo que consiste en disolventes orgánicos lipófilos, disolventes orgánicos anfífilos y sus mezclas. Los disolventes adecuados que pueden usarse en la composición de la invención incluyen ésteres de ácido acético tales como acetato de metilo, etilo, butilo, amilo o 2-metoxietilo; acetato de isopropilo; hidrocarburos tales como tolueno, xileno, p-xileno, hexano o heptano; éteres que contienen al menos 3 átomos de carbono y sus mezclas.

- 15 La composición puede comprender además cualquier ingrediente usado convencionalmente en el campo cosmético. Estos ingredientes incluyen agentes conservantes, espesantes de fase acuosa (biopolímeros de polisacáridos, polímeros sintéticos) y espesantes de fase de grasa, fragancias, agentes activos hidrófilos y lipófilos y sus mezclas. Las cantidades de estos diversos ingredientes son las usadas convencionalmente en el campo cosmético para conseguir su fin deseado y varían típicamente desde aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, basado en el peso total de la composición. La naturaleza de estos ingredientes y sus cantidades deben ser compatibles con la producción de las composiciones de la invención.

- 20 La composición también puede comprender una fase de partículas adicional, típicamente presente en una cantidad de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 30 % en peso, basado en el peso total de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 20 % en peso y que puede comprender pigmentos o agentes nacarantes o cargas usados en composiciones cosméticas. Los pigmentos inorgánicos adecuados incluyen, sin limitación, óxido de titanio, óxido de circonio y óxido de cerio, así como óxido de cinc, óxido de hierro, óxido de cromo y azul férrico. Los pigmentos orgánicos adecuados incluyen, lacas de bario, estroncio, calcio y aluminio y negro de carbono. Los agentes nacarantes adecuados incluyen mica recubierta con óxido de titanio, con óxido de hierro o con pigmento natural.

- 30 Las cargas están presentes normalmente en una cantidad de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 30 % en peso, basado en el peso total de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 15 % en peso. Las cargas adecuadas incluyen polvo de talco, sílice, estearato de cinc, mica, caolín, nailon (en particular orgasol), polvo de polietileno, Teflon®, almidón, nitrato de boro, microesferas de copolímero tales como Expancel® (Nobel Industrie; Suecia), Polytrap® (Dow Coming, Inc.; Midland, MI) y microperlas de resina de silicona (Tospearl®; GE Toshiba Silicones; Japón).

- 35 La fase oleosa de las composiciones puede comprender una o más ceras, gomas o sus mezclas. Las ceras incluyen ceras con base hidrocarbonada, fluoroceras o ceras de silicona y pueden ser de origen vegetal, mineral, animal o sintético. En particular, las ceras tienen un punto de fusión mayor que 25 °C, preferiblemente mayor que 45 °C. Las composiciones de la presente invención pueden contener de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de ceras, basado en el peso total de la composición.

- 40 Las gomas son generalmente polidimetilsiloxanos de alto peso molecular (los PDMS), gomas de celulosa o polisacáridos y los materiales semisólidos son generalmente compuestos con base hidrocarbonada tales como, sin limitación, lanolinas y sus derivados o alternativamente los PDMS. Las composiciones de la presente invención pueden contener de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de gomas, basado en el peso total de la composición, típicamente de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso.

- 45 Más en particular, las composiciones para aplicación tópica pueden estar en forma de una composición para el cuidado protector para la piel, preferiblemente para el rostro, el cuello, las manos, los pies u otras áreas del cuerpo. Ejemplos no limitantes incluyen cremas o lociones de día, crema o lociones de noche, pomadas, cremas solares, lociones fluidas, aceites, ungüentos, geles, máscaras, leches corporales, maquillaje (una base), composiciones para bronceado artificial, depilatorios, emulsionantes, parches o un sólido que se vierte o se funde como una barra o caja, por ejemplo.

- 50 Otra realización particular de la presente invención se refiere al suministro de las composiciones descritas comprendiendo material vegetal natural mediante sistemas de suministro diana, por ejemplo, liposomas, microesferas (véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense núm. 5,770,222 para Unger et al., incorporada en la presente memoria por referencia) y similar, de manera que las composiciones de material vegetal natural o constituyentes activos puedan alcanzar más fácilmente la capa de unión demis-epidermis del área donde se aplica por vía tópica la composición, por ejemplo, el rostro o el cuello u otras áreas afectadas de la piel y afectarla.

En otra realización, las composiciones tópicas también pueden incluir uno o más de lo siguiente: un potenciador de la penetración en la piel, un emoliente, un redensificador de la piel, un difusor óptico, un filtro solar, un potenciador de la exfoliación y un antioxidante. Los detalles con respecto a estos y otros ingredientes cosméticos adecuados

pueden encontrarse en «International Cosmetic Ingredient Dictionary (ICID) and Handbook», décima edición (2004), publicada por the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA), en las pp. 2177-2299, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

5 Un emoliente proporciona los beneficios funcionales de potenciar la lisura de la piel, reducir el aspecto de las líneas de expresión y las arrugas profundas e hidratar. Ejemplos no limitantes incluyen miristato de isopropilo, petrolato, lanolato de isopropilo, siliconas (por ejemplo, meticona, dimeticona), aceites, aceites minerales y ésteres de ácidos grasos o cualquiera de sus mezclas. El emoliente está presente preferiblemente en un porcentaje de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 50 % en peso del peso total de la composición.

10 Un redensificador de la piel sirve como potenciador del colágeno para la piel. Un ejemplo de redensificador adecuado y preferido para la piel es el oligopéptido de palmitoilo. Otros redensificadores de la piel son agentes potenciadores de colágeno o glucosaminoglucano (GAG). El redensificador de la piel está presente preferiblemente en un porcentaje de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso del peso total de la composición.

15 Un difusor óptico es una partícula que cambia la optometría superficial de la piel, dando como resultado una pérdida aparente de definición visual y suavizando, por ejemplo, líneas y arrugas. Ejemplos de difusores ópticos que pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, nitruro de boro, mica, nailon, polimetilmetacrilato (PMMA), polvo de poliuretano, sericita, sílice, polvo de silicona, talco, teflón, dióxido de titanio, óxido de cinc o cualquiera de sus mezclas. El difusor óptico está presente preferiblemente en un porcentaje de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 20 % en peso del peso total de la composición.

20 Un filtro solar protege la piel del daño de los rayos ultravioleta. En una realización ilustrativa de la invención, el filtro solar proporcionaría protección contra tanto UVA como UVB, usando un único filtro solar o una combinación de filtros solares. Entre los filtros solares que pueden emplearse en las presentes composiciones están: avobenzona, derivados de ácido cinámico (tales como octilmetoxicinamato), salicilato de octilo, oxibenzona, dióxido de titanio, óxido de cinc o cualquiera de sus mezclas. El filtro solar puede estar presente en un porcentaje de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente 30 % en peso del peso total de la composición. La adición de un filtro solar puede proteger la piel de la radiación ultravioleta.

Las composiciones que tienen filtro solar provocan mejoras adicionales en el aspecto estético de la piel, incluyendo al menos uno de los siguientes: minimiza las quemaduras solares, minimiza el bronceado y reduce el enrojecimiento.

30 En una realización de la invención, las composiciones también pueden tener uno o más promotores de la exfoliación. Ejemplos adecuados de un promotor de la exfoliación que puede usarse en las presentes composiciones incluyen alfa-hidroxiácidos (AHA); peróxido de benzoilo; beta-hidroxiácidos, cetoácidos, ácido pirúvico, ácido 2-oxopropanoico, ácido 2-oxobutanoico y ácido 2-oxopentanoico; oxa ácidos como se describe en las Patentes Estadounidenses números 5,847,003 y 5,834,513 (cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia); ácido salicílico; urea o cualquiera de sus mezclas. Los promotores de exfoliación preferidos son ácido 3,6,9-trioxaundecanodioico, ácido glicólico, ácido láctico o cualquiera de sus mezclas. (Véase también, ICID en la p. 2205).

40 Cuando la realización de la invención incluye el uso de un promotor de la exfoliación, la composición presenta de aproximadamente 0,1 % en peso a 30 % en peso, preferiblemente aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 15 % en peso y más preferiblemente aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso del promotor de exfoliación basado en el peso total de la composición.

45 Un antioxidante actúa, entre otras cosas, eliminando radicales libres de la piel para proteger la piel de agresores medioambientales. Ejemplos de antioxidantes que pueden usarse en las presentes composiciones incluyen compuestos que tienen funciones hidroxifenólicas, tales como ácido ascórbico y sus derivados/ésteres; beta-caroteno; catequinas; curcumina; derivados de ácido ferúlico (por ejemplo, ferulato de etilo, ferulato de sodio); derivados de ácido gálico (por ejemplo, galato de propilo); licopeno; ácido redúctico; ácido rosmarínico; ácido tánico; tetrahidrocurcumina; tocoferol y sus derivados; ácido úrico o cualquiera de sus mezclas. Otros antioxidantes adecuados son aquellos que tienen una o más funciones tiol (-SH), en forma reducida o no reducida, tales como glutatión, ácido lipoico, ácido tioglicólico y otros compuestos de sulfidriilo. El antioxidante puede ser inorgánico, tal como bisulfitos, metabisulfitos, sulfitos u otras sales y ácidos inorgánicos que contengan azufre. Las composiciones pueden tener un antioxidante preferiblemente en un porcentaje de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 10 % en peso y más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, del peso total de la composición. (Véase también, ICID en la p. 2184).

55 En una realización de la invención, la composición también puede presentar uno o más agentes activos cosméticos y farmacéuticos siguientes, excipientes, ingredientes, coadyuvantes: anestésicos, antibióticos, por ejemplo, eritromicinas y tetraciclinas, ácidos salicílicos, antialérgicos, antifúngicos, antisépticos, antiirritantes, agentes antiinflamatorios, antimicrobianos, analgésicos, inhibidores de óxido nítrico sintasa, repelentes de insectos, agentes autobronceadores, potenciadores de la penetración en la piel, agentes refrigerantes de la piel, agentes quelantes, colorantes incluyendo tintes, lacas y pigmentos que puedan ser no tratados o tratados en la superficie químicamente

5 para mejorar la humectabilidad o alguna otra propiedad, bálsamos emolientes, emolientes, emulsionantes, fragancias, humectantes, lubricantes, protectores de la piel, humectantes, agentes para ajuste del pH, conservantes, estabilizantes, tensioactivos, espesantes, formadores de película, plastificantes, modificadores de la viscosidad, vitaminas o cualquiera de sus mezclas. Las cantidades de estas diversas sustancias son aquellas que se usan convencionalmente en los campos cosmético o farmacéutico para conseguir los fines deseados, por ejemplo, pueden constituir de aproximadamente 0,01 % a 20 % del peso total de la composición.

10 Ejemplos no limitantes de agentes activos para formulación en las composiciones incluyen aquellos reactivos con un efecto en el tratamiento de las arrugas o las líneas de expresión, además de los principios activos como se describe, tales como agente queratolíticos, es decir, un agente activo con propiedades descamantes, exfoliantes o depurativas o un agente activo que pueda suavizar la capa córnea de la epidermis de la piel. Otros ejemplos de agentes activos antiarrugas o anti líneas de expresión incluyen hidroxiácidos y retinoides. Estos agentes pueden formularse, por ejemplo, en cantidades de aproximadamente 0,0001 % a 5 % en peso relativo al peso total de la composición.

15 Hidroxiácidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, acilo tartárico, ácido cítrico, ácido 2-hidroxiálcanoico, ácido mandélico, ácido salicílico y derivados alquílicos de los mismos, incluyendo ácido 5-n-octanoilsalicílico, ácido 5-n-dodecanoilsalicílico, ácido 5-n-decanoilsalicílico, ácido 5-n-octilsalicílico, ácido 5-n-heptiloxisalicílico, ácido 4-n-heptiloxisalicílico y ácido 2-hidroxi-3-metilbenzoico o alcoxiderivados de los mismos, tales como ácido 2-hidroxi-3-metioxibenzoico.

20 Los emulsionantes están presentes típicamente en las composiciones en una cantidad de aproximadamente 0,01 % en peso a 30 % en peso, en peso y preferiblemente de aproximadamente 0,1 % en peso a 30 % en peso en peso relativo al peso total de la composición. Sin embargo, no todas las composiciones incluirán necesariamente emulsionantes. (Véase por ejemplo, ICID en p. 2276-2285).

Ejemplos no limitantes de agentes espesantes adecuados incluyen, goma xantana, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carbómero, goma arábica, Sepigel 305 (disponible en Seppic Co., Francia) y arcillas tales como silicato de magnesio y aluminio. (Véase, por ejemplo, ICID en la p. 2293-2299).

25 Las composiciones tópicas pueden incluir uno o más humectantes, tales como ureas, ácidos carboxílicos de pirrolidona, aminoácidos, hialuronatos de sodio, algunos polioles y otros compuestos con propiedades higroscópicas, y su utilidad puede ser potenciada por estos. (Véase ICID en p. 2244).

30 La actividad y la suavidad generales de la piel de las presentes composiciones tópicas también pueden potenciarse por neutralización a pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,0, lo más preferiblemente de pH aproximadamente 3,7 a aproximadamente 5,6. Esta neutralización se lleva a cabo preferiblemente con uno o más de: hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, arginina u otros aminoácidos o trietanolamina.

Retinoides ejemplares incluyen, sin limitación, ácido retinoico (por ejemplo, todos trans o 13-cis) y sus derivados, retinol (vitamina A) y sus ésteres, tales como palmitato de retinol, acetato de retinol y propionato de retinol y sus sales.

35 Los materiales vegetales naturales en forma de extractos de ahí, usados en la presente invención están contenidos preferiblemente en un vehículo, medio, diluyente o portador cosmética o dermatológicamente aceptables. La composición tópica que comprende los materiales vegetales naturales pueden formularse además según procedimientos conocidos en la técnica para proporcionar composiciones cosméticas tales como emulsiones, geles, cremas, lociones, máscaras, tónicos, sueros, aceites, emulsiones de agua en aceite, de aceite en agua, emulsiones triples de agua-aceite-agua con el aspecto de una crema o un gel, microemulsiones, ungüentos, pastas, barras, tortas, lápices, aerosol y esencias, así como otros vehículos cosméticos tópicos. También se considera que las composiciones tópicas pueden incorporarse en sistemas de suministro tales como liposomas y parches tópicos, cintas y pulverizaciones.

40 Además, las composiciones pueden estar en forma de dispersiones vesiculares que contienen lípidos iónicos o no iónicos, como se describió anteriormente. Las formas farmacéuticas para tales composiciones se formulan según el conocimiento y las técnicas convencionales usados en la técnica.

45 En una realización más de la invención, las composiciones para aplicación tópica pueden estar en forma de una composición para el cuidado protector de la piel, preferiblemente para el rostro, el cuello, las manos, los pies u otras áreas del cuerpo. Ejemplos no limitantes incluyen cremas o lociones de día, crema o lociones de noche, cremas solares, lociones o aceites, leches corporales, maquillaje (una base), composiciones para bronceado artificial, depilatorios y parches.

Métodos para usar materiales vegetales naturales

55 La presente invención incluye un método para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel como se define en las reivindicaciones, que comprende aplicar a un área afectada de la piel una composición que contiene un material vegetal natural en forma de extracto vegetal seleccionado del grupo que consiste en: *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*; *Cananga odorata*; *Curcuma xanthorrhiza*; *Physalis minima* o

Stephania rotunda, que incrementa los niveles de expresión de uno cualquiera de los genes o de sus combinaciones: beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa.

5 Como apreciará el profesional habilitado, los tratamientos cosméticos que comprenden composiciones que contienen extractos de material vegetal natural pueden llevarse a cabo, por ejemplo, aplicando por vía tópica la composición cosmética como se describe en la presente memoria según la técnica de rutina para administrar dichas composiciones. La composición cosmética tópica se aplica preferiblemente una vez al día durante un periodo de al menos una semana, pero puede incluir un periodo de aproximadamente 2, 4, 8 o 12 semanas. La composición cosmética se aplica preferiblemente en el rostro y en el cuello, pero puede aplicarse en cualquier área de la piel con necesidad de mejora estética, en el caso de que la composición cosmética permanezca en el área afectada de la piel, y preferiblemente ni se retira ni se enjuaga la piel. Las técnicas de rutina y practicadas comúnmente incluyen la aplicación de cremas, lociones, geles, máscaras, sueros, ungüentos, parches, maquillaje, leches eliminadoras del maquillaje, composiciones de filtro solar o similares en la piel. Preferiblemente, la composición cosmética es una formulación tópica que no se retira, donde también se prevé la pulverización como una forma de aplicación.

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos describen aspectos específicos de la invención para ilustrar la invención y proporcionar una descripción de los presentes métodos para los expertos en la materia.

Ejemplo 1

20 Se puede extraer un extracto vegetal de la presente invención a partir de materias primas naturales usando los métodos de extracción con disolvente acuoso-orgánico como se conoce en la técnica. Uno de dichos procesos de extracción se explica a continuación.

Preparación de extracto

A continuación se describe un método adecuado para preparar un extracto vegetal natural útil para preparar una composición tópica de la presente invención.

Extracción de *Plumbago indica*

25 Se obtuvo un extracto extrayendo las raíces de la planta *Plumbago indica* Linn., usando un esquema de extracción con etanol. En resumen, primero se trituraron manualmente las raíces de la *Plumbago indica* Linn., en tamaños de partícula pequeños dando como resultado un polvo de aproximadamente 250 gramos por matraz (dos matraces). El polvo molido se extrajo después con etanol al 80 % (2 x 1000 ml por matraz). Después de filtración y evaporación a vacío, se liofilizó el extracto concentrado total dando como resultado un extracto etanólico de 35,50 gramos. Se retiraron los taninos dando como resultado un extracto etanólico de *Plumbago indica* Linn., de 34,08 gramos.

30 También se extrajeron las raíces de la planta *Plumbago indica* Linn., usando un esquema de extracción con hexano. Donde se trituraron manualmente primero las raíces de la planta *Plumbago indica* Linn., en tamaños de partícula pequeños dando como resultado un polvo de aproximadamente 250 gramos por matraz (dos matraces). El polvo molido se extrajo después con hexano. Después de filtración y evaporación a vacío, se secó el extracto concentrado total mediante una estufa de alto vacío, dando como resultado un extracto de hexano de *Plumbago indica* Linn., de 1,70 gramos.

Extracción de *Cananga odorata* Lamk.

40 Se extrajeron flores de la planta *Cananga odorata* Lamk. usando un esquema de extracción con etanol similar al descrito previamente excepto que no había etapa de eliminación de taninos. El extracto etanólico de *Cananga odorata* Lamk. dio como resultado 62,22 gramos.

También se extrajeron flores de la planta *Cananga odorata* Lamk. usando un esquema de extracción con hexano similar al descrito previamente. El extracto de hexano de *Cananga odorata* Lamk. dio como resultado 6,26 gramos.

Extracción de *Sapindus rarak* A.

45 Se extrajeron frutos de la planta *Sapindus rarak* A. usando un esquema de extracción con etanol similar al método descrito previamente usado en la extracción de la planta *Cananga odorata* Lamk. excepto que el polvo molido se extrajo con etanol al 80 % en 2 x 2000 ml por matraz. El extracto etanólico de *Sapindus rarak* A. dio como resultado 218,0 gramos.

50 También se extrajeron frutos de la planta *Sapindus rarak* A. usando un esquema de extracción con hexano similar al de la planta *Cananga odorata* Lamk. excepto que el polvo molido se extrajo con hexano y se secó en una estufa de aire caliente. El extracto de hexano de *Sapindus rarak* A. dio como resultado 1,03 gramos.

Extracción de *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.

Se extrajeron rizomas de la planta *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. usando un esquema de extracción con etanol similar al usado en la extracción de la planta *Sapindus rarak* A. El extracto etanólico de *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. dio como resultado 48,14 gramos.

5 Se extrajeron también rizomas de la planta *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. usando un esquema de extracción con hexano similar al usado en la extracción de la planta *Sapindus rarak* A. El extracto de hexano de *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. dio como resultado 29,58 gramos.

Extracción de *Stephania rotunda* Lour.

10 Se extrajeron rizomas de la planta *Stephania rotunda* Lour., usando un esquema de extracción con etanol similar al método descrito previamente usado en la extracción de la planta *Cananga odorata* Lamk. El extracto etanólico de *Stephania rotunda* Lour., dio como resultado 48,02 gramos.

Se extrajeron también rizomas de la planta *Stephania rotunda* Lour., usando un esquema de extracción con hexano similar al usado en la extracción de la planta *Cananga odorata* Lamk. El extracto de hexano de la planta *Stephania rotunda* Lour., dio como resultado 3,22 gramos.

Extracción de *Physalis minima* Linn.

15 Se extrajo toda la planta *Physalis minima* Linn., usando un esquema de extracción con etanol. En resumen, primero se trituraron manualmente las raíces de la *Physalis minima* Linn., completa en tamaños de partícula pequeños dando como resultado un polvo de aproximadamente 250 gramos por matraz (dos matraces). El polvo molido se extrajo con etanol al 80 % (2 x 2000 ml por matraz) y se trató con carbón. Después de filtración y evaporación a vacío, se liofilizó el extracto concentrado total dando como resultado un extracto etanólico de *Physalis minima* Linn., de 29,57 gramos.

20 Se extrajo también toda la planta *Physalis minima* Linn., usando un esquema de extracción con hexano, donde se trituró manualmente primero toda la planta *Physalis minima* Linn., en tamaños de partícula pequeños dando como resultado un polvo de aproximadamente 250 gramos por matraz (dos matraces). El polvo molido se extrajo con hexano y se trató con carbón. Después de filtración y evaporación a vacío, se secó el extracto concentrado total mediante aire caliente en una estufa a 40 °C, dando como resultado un extracto de hexano de *Physalis minima* Linn., de 4,89 gramos.

Ejemplo 2

Cultivo celular

30 Se retiró un vial de queratinocitos epidérmicos humanos normales crioconservados (adulto o neonatal) de N₂ líquido y se puso en un baño de agua a 37 °C durante 1 a 2 minutos o hasta que se descongeló completamente. Se retiró después el vial del baño de agua y se eliminó el agua en exceso. Se puso el vial en una tapa de cultivo celular para esterilidad. Se limpió el vial con etanol al 70 % para que se secase al aire durante 30 segundos. Mientras en la tapa de cultivo celular, se retiraron las células del vial y se pusieron en un tubo de 50 ml. Se añadió gota a gota el medio de cultivo apropiado (5 ml) al tiempo que se agitaba el tubo, permitiendo la mezcla uniforme de las células y el medio

35 mientras se limitaba la muerte celular debida a cambios osmóticos ocasionados por el medio de congelación. Se añadió medio (25 ml) al tubo de 50 ml para llevar el volumen hasta 30 ml. En dos matraces de 75 cm², se añadió disolución de medio/células (15 ml) o a seis matraces de 25 cm², se añadió medio (5 ml). Se volvieron a tapar los matraces y se pusieron horizontalmente en una incubadora humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 24 horas. Después de 24 horas, se aspiró el medio antiguo y se añadió medio de cultivo fresco a temperatura ambiente (15 ml)

40 a las células. Previamente a añadir el medio de cultivo fresco, se llevó a temperatura ambiente usando un baño de agua a temperatura ambiente sin la cubierta. Se volvieron a poner los matraces que contenían las células con medio fresco en la incubadora a 37 °C. Se reemplazaron los matraces que contenían el medio antiguo con medio fresco de manera repetida hasta que se consiguió la confluencia deseada (75 %).

Siembra en placas y tratamiento

45 Cuando las células alcanzaron la confluencia deseada, se retiraron de la incubadora y se separó por aspiración el medio usando una trampa de vacío. Se puso en el matraz disolución salina tamponada de Hank (HBSS, en inglés; 10 ml de 1 X; Mediatech, Inc.; Herndon, VA) y se enjuagó toda la superficie. Después se aspiró el HBSS. Se añadió tripsina (1 X; Mediatech, Inc.) en un volumen de 5 ml. Se volvieron a poner los matraces en la incubadora durante 8 minutos. Se tomaron los matraces de la incubadora y se añadieron 15 ml de disolución neutralizante de tripsina (1X; Cascade Biologics; Portland, OR) a cada matraz para neutralizar la tripsina. Se retiró de los matraces la disolución de medio/células y se puso en un tubo de polipropileno de 50 ml. Se centrifugaron las células usando una centrifugadora de mesa a 115 rad/s (1100 rpm) durante 6 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar las células, se suspendieron de nuevo en medio de cultivo (medio basal: medio Epilife con cloruro de calcio (Cascade Biologics, Inc.); enriquecido con factor de crecimiento de queratinocitos humano al 1 % (Cascade Biologics); penicilina/estreptomocina al 1 % (Mediatech, Inc.). Se volvieron a suspender las células pipeteando arriba

50 y abajo. Después se puso el cultivo celular en placas tratadas con cultivo de tejido de 100 mm en volúmenes de 10

ml para incubación en una incubadora humidificada a 37 °C con CO2 al 5 % hasta que se consiguió una confluencia del 75 %. Cuando se alcanzó la confluencia, se retiró medio y se reemplazó con medio de cultivo fresco que contenía el principio activo de ensayo en una concentración específica. Se diluyó cada principio activo de ensayo en un medio de cultivo de un vial de producto almacenado al 10 % que contenía un vehículo (es decir, agua, etanol, DMSO) y el principio activo de ensayo. Se ensayó cada vehículo paralelamente al principio activo de ensayo como control. Se pusieron de nuevo las placas tratadas con cultivo de tejido de 100 mm en la incubadora humidificada a 37 °C con CO2 al 5 % para cantidades variables de tiempo para establecer un transcurso del tiempo para los principios activos para ensayar. Se recogieron las placas de cultivo de tejido al cabo de 1 hora, 4 horas, 8 horas, 24 horas y 32 horas. En cada instante de tiempo, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células con disolución salina tamponada con fosfato 1X (PBS). Se retiró el PBS 1X y se envolvieron en parafina las placas de cultivo de tejido y se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron.

Aislamiento de ARN

Se retiró la parafina del exterior de las placas de cultivo de tejidos de 100 mm y se añadieron a las células 2 ml de reactivo de trizol (1X; Invitrogen, Corp.; Carlsbad, CA). Se raspó la placa y se puso la disolución en tubos de microcentrífuga de 2 ml a 1,7 ml. Se añadió cloroformo (250 µl) a cada tubo y se sometieron a agitadora vortical durante 15 a 30 segundos. Se incubó cada tubo a temperatura ambiente (25 °C) durante 3 a 5 minutos y se centrifugó a 1253 rad/s (12 000 rpm) a 4 °C durante 10 minutos. Se retiró la capa superior de la disolución sin dañar las dos capas del fondo y se puso en un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml separado. Se añadió al tubo isopropanol enfriado en hielo (1,0 ml) y se incubó en hielo durante 10 a 15 minutos. Se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 4 °C y a 1253 rad/s (12 000 rpm). Se vertió isopropanol y se añadió etanol al 70 % enfriado en hielo (1 ml) en el tubo para retirar el precipitado de sal en la muestra de ARN. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 4 °C y a 1253 rad/s (12 000 rpm). Se vertió el etanol al 70 % y se añadió etanol al 100 % enfriado en hielo. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 4 °C y a 1253 rad/s (12 000 rpm). Se secó el tubo por inversión y retirando todo el etanol al 100 % del tubo. Se almacenó el tubo a -80 °C, diluido en agua exenta de RNasa o secado.

Ejemplo 3

Expresión génica por PCR usando extractos vegetales

Los niveles de expresión génica de seis genes diferentes asociados a signos dermatológicos de envejecimiento, específicamente, beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa y ácido hialurónico sintasa, mostraron un incremento en presencia de una o más de las siguientes plantas: *Plumbago indica**, *Cananga odorata**, *Sapindus rarak*, *Curcuma xanthorrhizsa**, *Physalis minima** y *Stephania rotunda**. Se realizó la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se practica comúnmente en la técnica (véase, por ejemplo, J. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). Los parámetros de termociclo específicos usados fueron como sigue: 1 ciclo, 1 minuto, a 95 °C; 40 ciclos, 12 segundos, a 95 °C y 1 ciclo, 30 segundos, a 60 °C en un volumen de 50 microlitros. Los materiales vegetales marcados con «*» son materiales de referencia.

Tabla 1

	β-Catenina		colágeno 4		colágeno 7	
	Transcrito #	p	Transcrito #	p	Transcrito #	p
<i>Plumbago indica</i> (E)	12,51820555	0,01	11,81759611	6,28 x 10 ⁻⁵	14,09093	7,89 x 10 ⁻⁴
	9,736382094		11,17880713		12,96366	
	9,272744852				12,96366	
<i>Plumbago indica</i> (H)	10,0111709	0,004	9,706302	0,0027	8,113628	3,07 x 10 ⁻⁴
	9,269602689		6,130296		7,662871	
	8,157250366		7,918299		8,113628	
<i>Cananga odorata</i> (E)	8,961288	0,01	12,34666	0,001	10,89411	4,1 x 10 ⁻⁴
	7,46774		8,917033		10,89411	

ES 2 736 304 T3

	β-Catenina		colágeno 4		colágeno 7	
	Transcrito #	p	Transcrito #	p	Transcrito #	p
	6,47204133		13,03259		11,49934	
<i>Cananga odorata</i> (H)	11,72896598	0,002	10,66554	1,98 x 10 ⁻⁵	17,68084	0,002
	11,72896598		11,63513		17,11049	
	10,32149006		10,34234		15,39944	
<i>Sapindus rarak</i> (E)	1,602004396	0,024	-	-	-	-
	1,602004396		-	-	-	-
	1,127336427		-	-	-	-
<i>Sapindus rarak</i> (H)	-	-	-	-	-	-
<i>Curcuma xanthorrhizza</i> (E)	1,676812229	0,001	-	-	2,664477	-
	1,64739447		-	-	2,910429	0,015
	1,559141195		-	-	2,254558	
<i>Curcuma xanthorrhizza</i> (H)	1,269907935	0,022	-	-	1,732678	0,00136
	1,455102842		-	-	1,769544	
	1,190538689		-	-	1,732678	
<i>Physalis minima</i> (E)	1,29537639	0,024	-	-	-	-
	1,250707514		-	-	-	-
	1,161371263		-	-	-	-
<i>Physalis minima</i> (H)	-	-	-	-	-	-
<i>Stephania rotunda</i> (E)	-	-	-	-	1,322025	0,04
	-		1,092108			
	-		1,149587			
<i>Stephania rotunda</i> (H)	1,511618817	0,009	-	-	2,041838	5,9 x 10 ⁻⁴
	1,455632935		1,905715			
	1,287675289		1,905715			

Solo se muestran números estadísticamente significativos. Los números de transcrito están normalizados para control del vehículo. Valor p indicado de ensayo t con control del vehículo.

	β-Catenina		colágeno 4		colágeno 7	
	Transcrito #	p	Transcrito #	p	Transcrito #	p
(E): Extracto de etanol (-): No estadísticamente significativo						
(H): Extracto de hexano p<0,05: Estadísticamente significativo						

Tabla 2

	Frizzled 10		Receptor de estrógenos α		Ácido hialurónico sintasa	
	Transcrito #	p	Transcrito #	p	Transcrito #	p
<i>Plumbago indica</i> (E)	12,91926	0,0061	10,60385	3,9 x 10 ⁻⁴	16,45067	0,008
	10,33541		9,766702		12,04104	
	13,24224		10,04575		13,8532	
<i>Plumbago indica</i> (H)	5,553399	0,006	7,141224	0,004	11,35577	0,007
	6,199143		5,802245		9,416984	
	7,103184		6,91806		9,278498	
<i>Cananga odorata</i> (E)	8,843769	2,61 x 10 ⁻⁴	9,288834	0,013	8,18149	0,016
	9,190583		11,68595		9,297147	
	9,190583		13,18415		6,32206	
<i>Cananga odorata</i> (H)	10,78532	0,004	11,85962	0,011	12,96681	0,009
	9,64142		12,42436		11,56499	
	8,987765		16,09519		9,812723	
<i>Sapindus rarak</i> (E)	23,06456	0,0025	-	-	-	-
	21,29036		-		-	
	19,51616		-		-	
<i>Sapindus rarak</i> (H)	7,256429	9,7 x 10 ⁻⁴	3,645494	0,023	-	-
	7,709956		3,410301		-	
	7,029666		2,783119		-	
<i>Curcuma xanthorrhizza</i>	228,9185	6,99 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-

ES 2 736 304 T3

	Frizzled 10		Receptor de estrógenos α		Ácido hialurónico sintasa	
	Transcrito #	p	Transcrito #	p	Transcrito #	p
(E)	228,9185					
	211,3093					
<i>Curcuma xanthorrhizza</i> (H)	52,26041	0,005	-	-	-	-
	44,34217					
	41,96669					
<i>Physalis minima</i> (E)	-	-	-	-	-	-
<i>Physalis minima</i> (H)	1,444326	0,022	-	-	1,135447	0,002
	1,444326				1,173295	
	1,444326				1,324688	
<i>Stephania rotunda</i> (E)	-	-	-	-	-	-
<i>Stephania rotunda</i> (H)	1,950059	0,013	-	-	-	-
	2,145065					
	1,930559					

Solo se muestran números estadísticamente significativos. Los números de transcrito están normalizados para control del vehículo. Valor p indicado de ensayo t con control del vehículo.

(E): Extracto de etanol (-): No estadísticamente significativo

(H): Extracto de hexano p<0,05: Estadísticamente significativo

REIVINDICACIONES

1. Un método cosmético no terapéutico para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel que comprende aplicar por vía tópica a la piel una composición tópica que comprende:

5 (a) una cantidad cosmética, dermatológica, farmacéutica o fisiológicamente eficaz de al menos un extracto vegetal suficiente para incrementar los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: beta-catenina, colágeno 4, colágeno 7, frizzled 10, receptor de estrógeno alfa, ácido hialurónico sintasa y sus combinaciones y

(b) un vehículo cosmética, dermatológica, farmacéutica o fisiológicamente aceptable,

10 en una cantidad eficaz para mejorar el estado o el aspecto estético de la piel, en donde al menos dicho extracto vegetal se selecciona del grupo que consiste en: *Sapindus rarak* o *Sapindus rarak* junto con cualquiera de *Plumbago indica*, *Cananga odorata*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Physalis minima*, *Stephania rotunda*.

2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha composición se aplica durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el aspecto estético de la piel.

15 3. El método según la reivindicación 1, en donde dicha aplicación de la composición ocurre al menos una vez al día durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el aspecto estético de la piel.

4. El método según la reivindicación 1, en donde el extracto vegetal está presente en una cantidad desde aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 50 % en peso, basado en el peso total de la composición.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el extracto vegetal está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, basado en el peso total de la composición.

20 6. El método según la reivindicación 1, en donde la mejora en el aspecto estético se selecciona del grupo que consiste en: reducir los signos dermatológicos de envejecimiento cronológico, fotoenvejecimiento, envejecimiento hormonal o envejecimiento actínico; prevenir o reducir el aspecto de las líneas o arrugas; reducir la evidencia de las líneas y arrugas faciales, arrugas faciales en las mejillas, la frente, arrugas perpendiculares entre los ojos, arrugas horizontales sobre los ojos y alrededor de la boca, líneas de marioneta y en particular arrugas profundas o pliegues;
25 prevenir, reducir o disminuir el aspecto o la profundidad de las líneas o arrugas; mejorar el aspecto de las líneas suborbitales o las líneas periorbitales; reducir el aspecto de las patas de gallo; rejuvenecer o revitalizar la piel, en particular la piel que envejece; reducir la fragilidad de la piel; prevenir o revertir la pérdida de glucosaminoglucanos o colágeno; paliar los efectos de desequilibrio de estrógenos; prevenir la atrofia de la piel; prevenir, reducir o tratar la hiperpigmentación; minimizar la decoloración de la piel; mejorar el tono de la piel, la luminosidad, la claridad o la tersura; prevenir, reducir o paliar la flacidez de la piel; mejorar la firmeza de la piel, la plenitud, la flexibilidad o la suavidad; mejorar la producción de procolágeno o colágeno; mejorar la textura de la piel o promover la retexturización; mejorar la reparación de la barrera de la piel o la función; mejorar el aspecto de los contornos de la piel; restaurar el lustre de la piel o el brillo; minimizar los signos dermatológicos de fatiga o estrés; resistir al estrés medioambiental; reponer los ingredientes en la piel disminuidos por el envejecimiento o la menopausia; mejorar la comunicación entre las células cutáneas; incrementar la proliferación o multiplicación celular; incrementar el metabolismo de las células cutáneas disminuido por el envejecimiento o la menopausia; retardar el envejecimiento celular; mejorar la hidratación de la piel; reforzar el espesor de la piel; incrementar la elasticidad de la piel o la resiliencia; reforzar la exfoliación; mejorar la microcirculación; disminuir o prevenir la formación de celulitis y
35 cualquiera de sus combinaciones.

40