

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 126**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2014 PCT/EP2014/053143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014 E 14705345 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2958547**

54 Título: **Uso cosmético de la queuina**

30 Prioridad:

21.02.2013 FR 1351486

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**AMABIOTICS (100.0%)
47, rue de Montmorency
75003 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DANCHIN, ANTOINE y
SEKOWSKA, AGNIESZKA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 772 126 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

Uso cosmético de la queuina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la cosmética, en particular, a productos para prevenir o luchar contra el envejecimiento de la piel y de las faneras.

Antecedentes de la invención

10 Como tejido protector y contorno de intercambio, la piel se renueva rápidamente a todo lo largo de la vida. El tiempo que transcurre da lugar inevitablemente a un envejecimiento de la piel. Un envejecimiento prematuro puede sobrevenir también como consecuencia de agresiones medioambientales múltiples. Como superficie interfacial con el medioambiente externo, la piel está sometida constantemente a deterioros que resultan de todo tipo de agresiones fisicoquímicas: cambio de temperatura, humedad, luz, contaminación, etc. Las células de la piel envejecen y seguidamente se hacen senescentes y mueren después de aproximadamente 80 divisiones. Durante estos procedimientos, la piel pierde su grosor y su elasticidad, dando lugar a la aparición de arrugas, pero también su función protectora, en particular contra las radiaciones UV del día. Puede tener también una pigmentación irregular (manchas de envejecimiento).

20 Las causas moleculares del envejecimiento de la piel afectan a todos los compartimentos de la piel. Como en otros tejidos, las proteínas inducidas por tensiones desempeñan una función protectora central, en particular las proteínas chaperones que permiten el repliegue conveniente de las proteínas y corrigen los defectos de este repliegue y las proteasas que degradan las proteínas químicamente alteradas mal replegadas. Los procedimientos de traducción y de repliegue son progresivamente menos eficaces cuando las células envejecen, dando lugar así a una producción y una sensibilidad aumentada a las modificaciones oxidantes accidentales y a las glicaciones. Las especies reactivas de oxígeno alteran los aminoácidos (en particular cisteínas, histidina, metionina, tirosina y triptófano) y las cadenas principales proteicas. Alteran también en dirección ascendente los procedimientos que conducen a la síntesis de nuevas proteínas.

25 La acumulación de agregados proteicos durante los procedimientos de envejecimiento bloquea progresivamente la maquinaria de control y la calidad de las proteínas celulares. Este envejecimiento de la piel supone una degradación de la matriz extracelular al mismo tiempo que de un nivel de las capas de la epidermis y de la dermis, dejando signos visibles de envejecimiento en la superficie de la piel y modificando las propiedades físicas de la misma.

30 La consecuencia global es igualmente una alteración de la actividad enzimática normal y una agregación de proteínas enteras, que implica signos visibles como una sequedad irregular, una pigmentación irregular, arrugas profundas, un cutis céreo y/o apergaminado, una flacidez de la piel, etc.

Hay tres procedimientos que permiten que las células superen el envejecimiento: la neosíntesis, la reparación y la degradación seguida de resíntesis. A largo plazo, estos dos últimos procedimientos son esenciales ya que permiten un rejuvenecimiento de las células.

35 Por tanto, existe una necesidad y una considerable demanda de nuevos productos cosméticos para luchar contra el envejecimiento de la piel.

Descripción de la invención

40 Los inventores han descubierto de forma muy sorprendente que un aporte exógeno de queuina remedia los efectos perjudiciales de tensiones a los que de manera inevitable está sometida la piel, retrasando así la aparición de los signos de envejecimiento. La queuina contribuye así de forma importante al mantenimiento de las células. La queuina tiene un efecto protector durante tensiones múltiples y repetidas. Más particularmente, la presente invención explota la necesidad de optimizar el procedimiento de re-síntesis de proteínas suministrando queuina a las células. En efecto, esta molécula es necesaria para el desarrollo óptimo de la síntesis proteica y el organismo no es capaz de producirla. Se ha descubierto en el contexto de la presente invención que un aporte exógeno de queuina contribuye de forma sorprendente a la resistencia de las células de la piel. Por tanto, la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende queuina, un precursor o un derivado de la misma según la reivindicación 1 como principio activo. La presente invención tiene más particularmente como objeto una composición cosmética para una aplicación tópica.

50 La presente invención se refiere también a la utilización de queuina, un precursor o un derivado de la misma, según la reivindicación 1, como principio activo en una composición cosmética y, más particularmente, una composición cosmética para una aplicación tópica.

La invención tiene también por objeto una utilización cosmética de queuina, o un precursor o derivado de la misma, como principio activo para disminuir o prevenir los signos de envejecimiento de la piel y/o las faneras. Por faneras se entiende preferentemente los pelos y las uñas. La utilización o composición según la invención está destinada muy

particularmente a disminuir o prevenir las arrugas y las pequeñas arrugas y/o el marchitamiento de la piel y/o la falta de elasticidad y/o de tonicidad de la piel y/o la flacidez de la piel y/o el cutis céreo y/o apergaminado y/o las irregularidades en la textura de la piel y las irregularidades en la pigmentación como las manchas de envejecimiento.

5 La invención se refiere además a un método de preparación de una composición cosmética que comprende la adición de queuina, un precursor o derivado de la misma a los componentes de la composición cosmética y la recuperación de la composición cosmética obtenida.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento cosmético para prevenir y/o tratar los signos de envejecimiento de la piel y/o las faneras, que comprende la aplicación sobre la piel y/o las faneras de una composición cosmética según la invención.

10 En un modo de realización particular, la queuina, el precursor o derivado de la misma se escoge entre el grupo que consiste en queuina, queuosina, epoxiqueuosina y epoxiqueuina. Entre estos derivados se encuentran los derivados glicosilados de la queuina y la queuosina, como la manosilqueuina, galactosilqueuina así como los derivados aminoacilados como la glutamilqueuina. La queuina, un precursor o derivado de la misma puede estar en forma purificada o en forma de extracto bacteriano o de extracto o savia de planta, en que dicho extracto o dicha savia
15 tiene un elevado contenido de queuina precursor o derivado de los mismos. En un modo de realización muy particularmente preferido, la composición cosmética comprende queuina.

Preferentemente, la queuina, el precursor derivado de la misma está presente en la composición cosmética en una cantidad de 0,1 µg a 100 µg por ml o g de composición cosmética, preferentemente de 0,5 a 10 µg por ml o g de composición cosmética y de forma incluso más preferida de 1 a 5 µg por ml o g de composición cosmética. Para
20 derivados de liberación lenta, las concentraciones se calculan de forma que la velocidad de liberación cumpla en cada momento de las condiciones anteriormente citadas de conformidad con los procedimientos fisicoquímicos de liberación. De forma facultativa, la composición cosmética puede comprender queuina, un precursor o derivado de la misma en la cantidad de al menos 0,1 µg a 100 µg por ml o g de composición cosmética, preferentemente de al menos 0,5 a 10 µg por ml o g de composición cosmética y, de forma incluso más preferida, de al menos 1 a 5 µg por
25 ml o g de composición cosmética.

La composición cosmética se puede presentar en forma de suero, loción, crema, leche, gel acuoso o aceitoso, hidrogel, microemulsión, nanoemulsión, mascarilla, bastoncillo, parche, aceite, ungüento, cera, espuma, tónico, agua de cuidado, bálsamo, maquillaje, pulverización, sombra de párpados, crema reafirmante, pintura de labios, una
30 pasta, una pomada o un champú o acondicionador del cabello, o cualquier forma adecuada homogénea o heterogénea que permita el uso de la queuina y sus derivados.

Queuina, precursores y derivados de la misma

La queuina es conocida también con el nombre químico siguiente:

2-amino-5-(((1s,4s,5r)-4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-il)amino)metil)-1,7-dihidro-4H-pirrolo(2,3-d)pirimidin-4-ona.
Número CAS : 72496-59-4

35 La epoxiqueuina es conocida también con el nombre químico siguiente:

7-(5-[(3,4-epoxi-2,5-dihidroxiciclopent-1-il)amino]metil)-7-deazaguanino-2-amino-5-(((1R,2R,3R,4R,5S)-3,4-dihidroxi-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-il)amino)metil)-3,7-dihidro-4H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ona. (Número CID : 56927905)

La queuosina es conocida también con el nombre químico siguiente:

40 2-amino-5-[[[(1S,4S,5R)-4,5-dihidroxi-1-ciclopent-2-enil]amino]metil]-7-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-2-tetrahidrofuranil]-1H-pirrolo [3,2-e]pirimidin-4-ona. (Número CAS : 57072-36-3)

La epoxiqueuosina es conocida también con el nombre químico siguiente:

7-(5-[(3,4-epoxi-2,5-dihidroxiciclopent-1-il)amino]metil)-7-deazaguanosina-2-amino-5-(((1R,2R,3R,4R,5S)-3,4-dihidroxi-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-il)amino)metil)-7-(beta-D-ribofuranosil)-3,7-dihidro-4H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ona
(Número CID : 56927875)

45 En el contexto de la presente solicitud, un derivado de queuina hace referencia a cualquier molécula o macromoléculas que comprendan queuina en una forma adecuada para ser utilizada para la piel o las faneras. En particular, la queuina puede estar en forma libre o como parte de un complejo covalente o iónico. Por ejemplo, puede estar complejada con ribosa para formar queuosina, una galactosil-queuosina, una manosil-queuosina o una glutamil-queuosina. Se puede considerar también en forma de ARNt-queuosina o un oligonucleótido que comprenda
50 queuosina. Entre estos derivados se encuentran los derivados glicosilados de queuina y de queuosina, como manosilqueuina, galactosilqueuina así como derivados aminoacilados como glutamilqueuina.

En el contexto de la presente solicitud, un precursor de queuina hace referencia, por ejemplo, a su precursor intermedio, epoxiqueuina, ya sea en forma libre o en forma de complejo covalente con moléculas o macromoléculas.

Un derivado de queuina puede ser también una queuina químicamente modificada que puede ser fácilmente metabolizada en queuina por enzimas como las presentes en la superficie de la piel. Otros derivados de la queuina son derivados que liberan queuina cuando son aplicados a la superficie de la piel de las faneras y sometidos a tratamientos fisicoquímicos (por ejemplo, luz UV natural o artificial).

5 De forma preferida la queuina, sus precursores y derivados pueden ser preparados mediante síntesis química. La síntesis química de la queuina es conocida. Particularmente, se han descrito dos vías principales de síntesis (Barnett and Grubb, 2000, Tetrahedron 56, 9221- 9225 ; Brooks et al, 2010, Tetrahedron Letters 51, 4163-4165) y pueden llevarse a cabo por un experto en la técnica.

10 De forma alternativa la queuina, así como sus precursores y derivados, pueden ser obtenidos por medio de bacterias que sintetizan estas moléculas.

Por tanto, la queuina puede ser obtenida mediante purificación a partir de extractos de microorganismos, particularmente bacterias.

De forma alternativa la queuina, sus precursores o derivados están en forma de extractos bacterianos, en su caso enriquecidos en queuina, sus precursores o derivados.

15 Preferentemente, el extracto bacteriano es un extracto bacteriano escogido entre las bacterias Firmicutes comestibles, preferentemente de las cepas *Bacillus subtilis* y de su cercana *Bacillus Amyloliquifaciens*, pero generalmente de los *Bacillus cerius* no patógenos, de los *Streptococcus thermophilus* que producen queuina, de los *Staphylococcus epidermidis* no patógenos y en general de los Firmicutes no patógenos, preferentemente utilizados en alimentación- Entre las bacterias gran-negativas, se prefieren los probióticos de gamma-Proteobacterias como
20 *E.coli* Nissle 1917, o proteobacterias utilizadas para alimentación como *Zyomononas mobilis*. Las cianobacterias no toxicógenas son también fuentes de queuina preferidas, en particular las especies comestibles *Arthrospira* (Spirulina).

En otro modo de realización la queuina, así como sus precursores y derivados, pueden ser obtenidos a partir de plantas que han extraído estas moléculas en su medioambiente, después de una verificación de su contenido en
25 queuina o sus derivados. Particularmente, las plantas que presentan nódulos con alfa-proteobacterias, particularmente las especies *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium* son una excelente fuente de queuina. Además, la savia de plantas es también una fuente interesante de queuina cuando su crecimiento ha sido asegurado en un medioambiente microbiano con elevado contenido de bacterias adaptadas a la rizosfera en la que han sido colonizadas por microorganismos epicitos y endófitos que sintetizan queuina, en particular de las familias
30 Bacteroidetes, Firmicutes y proteobacterias (por ejemplo, pero sin limitación, *Pseudomonas fluorescens* ou *Serratia marcescens*. Los extractos (hojas, raíces, frutos, cortezas, etc.) de las plantas utilizadas pueden ser de los organismos habitualmente utilizados en alimentación, en cosmética o en medicina tradicional, por ejemplo, de plantas tan diversas como: *Acalypha indica*, *Acanthus ebracteatus*, *Aloe vera*, *Avena sativa*, *Cocos nucifera*, *Coffra arabica*, *Colocasia esculenta*, *Curcuma longa*, *Hippophae rhamnoides*, *Jasminum sambac*, *Juglans mandshurica*,
35 *Matricaria recutita*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Opuntia ficus indica*, *Oryza sativa*, *Pittocaulon praecox*, *Plagiochila beddomei*, *Populus balsamifera*, *Psidium guajava*, *Scutellaria baicalensis*, *Vaccinium spp.*, *Vitis vinifera*, en función de su contenido en queuina que deberá ser evaluado. Las plantas utilizadas tradicionalmente por su efecto positivo sobre la crianza, a menudo de las familias de las papilionáceas, solanáceas o asteráceas, pero que comprenden un gran número de plantas reconocidas por su efecto sobre la calidad y la resistencia de la piel, pueden
40 ser seleccionadas. Los cultivos fuera del suelo y sin aporte microbiano o sin aporte de queuina no son utilizados si no es con la condición de añadir un aporte exógeno de la molécula. No obstante, pueden ser escogidas las plantas raras o protegidas, como *Leontopodium alpinum*, cultivadas en laboratorio, si son cultivadas en presencia de microorganismos productores de queuina y después de una evaluación de su capacidad para captar y concentrar la molécula.

45 El contenido de queuina de sus precursores y derivados, de los extractos bacterianos o de los extractos de plantas está preferentemente garantizado. Por esta razón, debido a la degradación de la flora microbiana asociada a los extractos de plantas obtenidos en un cultivo intensivo, estos no son preferentemente usados en las preparaciones si no es con un aporte exógeno de queuina. De forma general, los extractos bacterianos de plantas pueden ser enriquecidos en queuina, sus precursores y derivados.

50 Composición cosmética

Según la invención, la queuina, un precursor y/o derivado de queuina puede ser utilizado como principio activo en una composición cosmética destinada a prevenir o tratar signos de envejecimiento cutáneo, cronológicos y/o fotoinducidos, en particular, signos de envejecimiento prematuro que afectan a personas de 25-30 años y que se plasman lo más a menudo en la aparición de pequeñas arrugas y/o un aspecto apagado y/o heterogéneo del cutis.

55 La composición según la invención comprende un medio fisiológicamente aceptable, es decir, compatible con la piel y/o las faneras. Se trata preferentemente de un medio aceptable en cosmética, es decir, que presente un color, un olor y una consistencia agradables y que no genere incomodidades como cosquilleos, irritaciones u otros, que

puedan desalentar al consumidor de su empleo.

5 Según la invención, la composición cosmética puede ser, por ejemplo, un producto de cuidado o de maquillaje, en forma de suero, loción, crema, leche, gel acuoso o aceitoso, hidrogel, mascarilla, bastoncillo, parche, aceite, ungüento, cera, espuma, tónico, agua de cuidado, bálsamo, maquillaje, pulverización, sombra de párpados, pintura de labios, pasta, pomada o un champú o acondicionador del cabello.

La composición cosmética puede ser utilizada también como composición reafirmante que comprende, además de queuina, un precursor y/o derivado de queuina o un agente reafirmante.

10 Al estar destinada la composición a una administración tópica sobre la piel y/o las faneras, se puede presentar en cualquier forma galénica normalmente utilizada para una aplicación tópica. En particular, se puede presentar ventajosamente en forma de soluciones acuosas, hidroalcohólicas, emulsiones de aceite en agua (H/E) o de agua en aceite (E/H) o múltiple (triple: E/H/E o H/E/H) o de micro- o nano-emulsiones.

Cuando la composición se presenta en forma acuosa, particularmente en forma de dispersión, emulsión o solución acuosa, puede comprender una fase acuosa que puede comprender agua, agua floral y/o agua mineral.

15 Estas composiciones pueden contener también vehículos o diluyentes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, habituales y apropiados, en particular, como agente diluyente, agente dispersante, agente gelificante, emoliente sólido, gomas, resinas, disolventes, materiales de carga como almidones modificados y polimerizados, dióxido de titanio o un estearato metálico, conservantes, aceites esenciales, agentes nacarados, colorantes, absorbentes del olor, agentes reguladores del pH o agentes neutralizantes, agentes espesantes, agentes favorecedores de la absorción y, en particular, etanol y/o fosfolípidos, agentes aromatizantes o perfumantes, 20 pigmentos minerales como óxidos de hierro, agentes aceitosos como aceites o grasas de origen vegetal, grasas de origen animal, aceites de síntesis, aceites de silicona (cilometicona), aceites fluorados, ésteres de alcoholes grasos (alcohol cetílico), ceras, arcillas modificadas, lodos bentoníticos, sales metálicas de ácidos grasos, sílice hidrofobizada, polietilenos, mica y/o otras sustancias utilizadas en cosmética.

25 La composición cosmética según la invención puede comprender además otras moléculas activas como vitaminas, filtros y protectores solares, componentes activos antienvjecimiento, antiarrugas, como en particular péptidos, antioxidantes, un componente activo de aclarado, un componente activo autobronceante, un acelerador del bronceado, un componente activo estirante, un reafirmante, un componente activo reafirmante, un componente activo hidratante, un componente activo exfoliante, un seborregulador, antibrillo, etc. Preferentemente, la composición cosmética podrá comprender componentes activos antienvjecimiento, antiarrugas y/o antioxidantes, 30 un componente activo estirante, un componente activo reafirmante y/o un componente activo hidratante. De forma general, el experto de la técnica sabrá escoger y adaptar las cantidades de las moléculas activas adicionales de forma que las propiedades de la composición según la invención no resulten alteradas por su adición.

En un modo e realización preferida, la queuina, el precursor o derivado de la misma está presente en la composición cosmética con co-factores o vitaminas, por ejemplo, vitamina C o Tocoferol.

35 La invención se comprenderá mejor mediante la lectura de los experimentos y ejemplos que siguen y a través del examen de las figuras que se acompañan. Estos se proporcionan con carácter ilustrativo y en absoluto limitativo de la invención.

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran la migración celular en un cultivo de fibroblastos incubado en DMEM, 2,5% de SVF a las 0 horas (Figura 1) y 24 horas (Figura 2) o en DMEM, 10% de SVF a las 24 horas (Figura 3).

40 Las Figuras 4 y 5 muestran la migración celular en un cultivo de fibroblastos incubado con 10 µg/ml de queuina en 2,5% de SFV a las 24 horas (Figura 4) o 30 µg/ml de queuina en 2,5% de SVF a las 24 horas (Figura 5);

Las figuras 6 y 7 muestran la migración celular en un cultivo de fibroblastos incubado con 10 µg/ml de metanol en 2,5% de SVF a las 24 horas (Figura 6) o de 30 µ/ml de metanol en 2,5% de SVF a las 24 horas (Figura 7).

Experimentos

45 En estos experimentos se estudian los efectos de la queuina (citotoxicidad, proliferación, migración celular) sobre fibroblastos de dermis humanas adultas normales.

Material y métodos

Se seleccionó el suero de ternera fetal SVF, Dutscher, P30-8100M (lote P130903) para una utilización con queuina, que no contamine el medio.

50 Se utiliza en este caso metanol como vehículo de la molécula activa.

La solución madre de queuina se preparó a 15 mg/ml en metanol y seguidamente se prepararon diluciones en medio de DMEM (medio esencial modificado de Dulbecco) en presencia de una concentración variable de suero de ternera

ES 2 772 126 T3

fetal (SVF) (DMEM + 2,5% SVF + antibióticos (penicilina/estreptomicina) + glutamina): medio empobrecido con 2,5% de SVF para los experimentos de viabilidad, proliferación y migración celular.

Intervalos de dilución

El intervalo de la dilución preparada para el estudio de toxicidad/viabilidad es el siguiente:

5 Tabla 1: intervalo de dilución para el estudio de toxicidad/viabilidad

| Concentraciones (µg/ml) de queuina | Porcentaje de metanol final (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 100 | 0,6 |
| 10 | 0,06 |
| 1 | 0,006 |
| 0,1 | 0,0006 |

Este primer estudio permite afinar el intervalo de concentración estudiado.

El intervalo de dilución preparado para el estudio de la cinética de proliferación celular es el siguiente:

Tabla 2: intervalo de dilución para el estudio de la cinética de proliferación celular

| Concentraciones (µg/ml) de queuina | Porcentaje de metanol final (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 30 | 0,18 |
| 10 | 0,06 |
| 3 | 0,018 |
| 1 | 0,006 |
| 0,3 | 0,0018 |

10 El intervalo de dilución preparado para el estudio de migración es igual al del estudio de cinética, con la exclusión del punto de 0,3 µg/ml.

Productos utilizados:

Tabla 3: lista de los productos utilizados

| Producto | Proveedor | Referencia |
|---------------------------|------------|-------------|
| DEM w/o L-glutamina | Dutscher | L0101-500 |
| PBS 1X, w/o Ca Mg | PAA | H15-002 |
| Penicilina/estreptomicina | PAA | P11-010 |
| L-glutamina | PAA | M11-004 |
| Tripsina-EDTA 10X | PAA | L11-003 |
| SVF | Dutscher | P30-8100M |
| BrdU | Roche | 11647229001 |
| MTT | Calbiochem | 475989 |
| Colágeno | Nutacon | NBC_100A |
| HDFa | TebuBio | 106-05a |

Protocolos experimentales

1. Línea celular

15 Tipo celular: HDFa, fibroblastos dérmicos humanos adultos, mujer de 39 años, utilizados entre el paso 4 y el paso 6.

Para todos los experimentos preparados, se añadieron sistemáticamente los 3 testigos de SVF siguientes:

- DMEM sin suero
- medio empobrecido en suero (DMEM complementado con 2,5% de SVF); y
- medio completo (DMEM complementado con 10% de SVF).

5 2. Evaluación de la citotoxicidad y la proliferación celular

Los HDFa utilizados se sembraron a razón de 5×10^3 células/pocillos en placas de 96 pocillos (paso 4) en 200 μ l de medio de cultivo sin SVF (DMEM complementado + 0% de SVF). Después de 24 h desde el sembrado, el medio de cultivo se cambió y se añadieron las diferentes diluciones del producto o de su vehículo (metanol) sobre 200 μ l por pocillo, con 3 pocillos por condición de cultivo.

10 Se estudiaron también 3 testigos (3 pocillos/testigo):

- DMEM sin suero;
- medio empobrecido en suero (DMEM complementado + 2,5% de SVF); y
- medio completo (DMEM complementado + 10% de SVF).

3. Migración celular

15 Los HDFa utilizados se sembraron en presencia de insertos de cultivo previamente esterilizados, que permitieron crear zonas acelulares calibradas. Se añadieron respectivamente 100.000 HDFa sobre 600 μ l y 30.000 células sobre 150 μ l en el exterior y el interior de los insertos, en DMEM + 2,5% de SVF. Después de 5 h de incubación a 37°C, los insertos se retiraron y los pocillos se lavaron con dos veces en PBS 1X con el fin de retirar cualquier célula que no se hubiera adherido. Seguidamente se añade la molécula de queuina a 30, 10, 3 o 1 μ g/ml en DMEM con 2,5% de SVF, y se prepara también un intervalo equivalente de metanol, dos pocillos por condición. Los pocillos se fotografian a $t = 0$ h y seguidamente las placas se incubaron 24 h. Las células se fijaron seguidamente en paraformaldehído antes de realizar las fotografías a las 24 h.

Mediciones y análisis de los resultados

1. Cuantificación de la citotoxicidad: ensayo MTT

25 Se evaluó la proliferación de las células mediante un ensayo colorimétrico (ensayo MTT) después de 1, 2 y 3 días de cultivo. Este ensayo se basa en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio (MTT) [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol)] en un producto de formazano azul-violeta mediante las reductasas NADPH mitocondriales de las células, con la condición de que estuvieran vivas. Seguidamente los cristales se disolvieron en una mezcla de etanol al 100%-DMSO (v/v). Se midió la coloración de la materia sobrenadante, proporcional a la cantidad de células vivas, mediante una lectura de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 570 nm. El ensayo se realizó en los D1, D2 y D3 (correspondiendo J0 a la adición de las soluciones que van a ser ensayadas).

Las medias de las DO de los triplicados se representan gráficamente para cada tiempo de la cinética. Se representan las desviaciones típicas.

2. Cuantificación de la proliferación celular: ensayo BrdU

35 Se evaluó la proliferación de las células mediante un ensayo de tipo ELISA (ensayo BrdU, bromodesoxiuridina) después de 1, 2 y 3 días de cultivo.

El BrdU es un nucleósido sintético análogo a la timidina, que puede ser reconocido por un anticuerpo anti-BrdU. Va a ser incorporado en el transcurso de la replicación del ADN de las células proliferantes. El anticuerpo anti-BrdU se acopla a una enzima que, en presencia de su sustrato, lo va a degradar. Por tanto, la detección del BrdU se realiza mediante un ensayo enzimático colorimétrico.

40 La degradación del sustrato de la enzima coloreará la materia sobrenadante, proporcionalmente a la cantidad de BrdU incorporado. Seguidamente se hace la medición mediante la lectura de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. El ensayo se efectuó los D1, D2 y D3 (correspondiente el D0 al momento de adición de las soluciones que van a ser ensayadas).

45 Los valores medios de DO, las desviaciones típicas y las cifras de las dosis-respuestas se detallan seguidamente para cada tiempo de la cinética.

3. Cuantificación de la migración celular: comparación de las imágenes de migración con respecto al testigo

ES 2 772 126 T3

Las imágenes se analizaron con el programa de ordenador ImageJ, con el fin de mejorar el contraste. Seguidamente se estudiaron los campos y los dos más representativos de cada condición se presentan para cada tiempo. El análisis se hace mediante comparación con el testigo.

Resultados

5 Viabilidad celular

Tabla 4: viabilidad celular 24 h después de poner en contacto

| | Queuina 0,1 µg/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 100 µg/ml | Metanol 0,0006% | Metanol 0,006% | Metanol 0,06% | Metanol 0,6% |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Medias de las DO | 0,228 | 0,250 | 0,246 | 0,233 | 0,242 | 0,250 | 0,259 | 0,248 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,273 | 0,303 | 0,187 | 0,095 |
| Media-blanco | 0,133 | 0,155 | 0,151 | 0,138 | 0,146 | 0,154 | 0,164 | 0,153 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,177 | 0,207 | 0,091 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,007 | 0,006 | 0,011 | 0,004 | 0,014 | 0,023 | 0,019 | 0,010 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,019 | 0,017 | 0,014 | 0,005 |

Tabla 5: viabilidad celular 48 h después de poner en contacto

| | Queuina 0,1 µg/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 100 µg/ml | Metanol 0,0006% | Metanol 0,006% | Metanol 0,06% | Metanol 0,6% |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Medias de las DO | 0,304 | 0,331 | 0,328 | 0,273 | 0,329 | 0,315 | 0,324 | 0,345 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,250 | 0,344 | 0,314 | 0,085 |
| Media-blanco | 0,219 | 0,246 | 0,243 | 0,188 | 0,244 | 0,231 | 0,239 | 0,260 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,165 | 0,259 | 0,229 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,001 | 0,020 | 0,018 | 0,005 | 0,006 | 0,012 | 0,019 | 0,014 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,011 | 0,011 | 0,035 | 0,004 |

Tabla 6: Viabilidad celular 72 h después de poner en contacto

5

| | Queuina 0,1 µg/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 100 µg/ml | Metanol 0,0006% | Metanol 0,006% | Metanol 0,06% | Metanol 0,6% |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Medias de las DO | 0,341 | 0,362 | 0,395 | 0,272 | 0,386 | 0,400 | 0,362 | 0,376 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,259 | 0,429 | 0,466 | 0,118 |
| Media-blanco | 0,223 | 0,244 | 0,277 | 0,154 | 0,268 | 0,282 | 0,244 | 0,259 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,141 | 0,311 | 0,348 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,035 | 0,024 | 0,010 | 0,010 | 0,017 | 0,026 | 0,011 | 0,028 |
| | | | | | 10% SVF | 5% SVF | 0% SVF | Sin células |
| | | | | | 0,008 | 0,020 | 0,015 | 0,001 |

Interpretación de los resultados

Los testigos negativos y positivos son correctos y permiten validar este experimento. En efecto, con el ensayo MTT, el testigo con 2,5 de SVF es siempre superior al testigo con 10% de SVF a las 24 h. El testigo de 2,5 SVF es

equivalente al testigo de 10% SVF a las 48 h e inferior al de las 72 h.

5 En lo que se refiere al testigo de vehículo solo (intervalo de metanol de 0,6 a 0,0006%), este presenta un ligero efecto citotóxico, pero sin efecto de dosis, y permanece mínimo. Su presencia por tanto no perjudica a la fisiología celular y no será un obstáculo para los siguientes experimentos, incluso a su concentración más elevada. Además, el metanol se conoce que favorece, en el transcurso de los primeros días, la proliferación celular.

En lo que se refiere a la molécula de queuina:

- A las 48 h, la concentración de 100 µg/ml presenta un efecto citotóxico. Las DO obtenidas son análogas a las del testigo negativo (0% de SVF).

Las demás concentraciones ensayadas inferiores a 100 µg/ml no presentan efecto citotóxico alguno.

10 Proliferación celular

Tabla 7: Viabilidad celular 24 h después de poner en contacto

| | Queuina 0,3 µg/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 3 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 30 µg/ml | Metanol 0,0018% | Metanol 0,006% | Metanol 0,018% | Metanol 0,06% | Metanol 0,18% |
|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Medias de las DO | 1,312 | 1,328 | 1,522 | 1,625 | 1,634 | 1,609 | 1,554 | 1,489 | 1,446 | 1,475 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,158 | 1,355 | 1,939 | 0,131 |
| Media-blanco | 1,181 | 1,197 | 1,391 | 1,494 | 1,502 | 1,477 | 1,423 | 1,357 | 1,314 | 1,344 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,027 | 1,223 | 1,808 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,182 | 0,091 | 0,145 | 0,125 | 0,082 | 0,190 | 0,248 | 0,095 | 0,125 | 0,138 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,003 | 0,042 | 0,126 | 0,027 |

15 A las 48 h y 72 h se acortó intencionadamente el tiempo de incubación en presencia del sustrato, con el fin de que las DO no estuvieran más allá del umbral de saturación del espectrofotómetro.

Tabla 8: Viabilidad celular 48 h después de poner en contacto

| | Queuina 0,3 g/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 3 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 30 µg/ml | Metanol 0,0018% | Metanol 0,006% | Metanol 0,018% | Metanol 0,06% | Metanol 0,18% |
|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Medias de las DO | 0,800 | 0,926 | 0,915 | 1,066 | 1,149 | 0,957 | 1,026 | 1,067 | 1,244 | 1,189 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,107 | 0,937 | 1,517 | 0,123 |
| Media-blanco | 0,677 | 0,803 | 0,793 | 0,943 | 1,026 | 0,834 | 0,903 | 0,944 | 1,122 | 1,066 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | -0,016 | 0,815 | 1,394 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,068 | 0,126 | 0,129 | 0,050 | 0,143 | 0,083 | 0,108 | 0,113 | 0,068 | 0,016 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,003 | 0,074 | 0,167 | 0,005 |

Tabla 9: Viabilidad celular 72 h después de poner en contacto

| | Queuina 0,3 g/ml | Queuina 1 µg/ml | Queuina 3 µg/ml | Queuina 10 µg/ml | Queuina 30 µg/ml | Metanol 0,0018% | Metanol 0,006% | Metanol 0,018% | Metanol 0,06% | Metanol 0,18% |
|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Medias de las DO | 0,586 | 0,548 | 0,681 | 0,708 | 0,958 | 0,550 | 0,544 | 0,616 | 0,588 | 0,696 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,133 | 0,499 | 1,159 | 0,170 |
| Media-blanco | 0,416 | 0,378 | 0,511 | 0,538 | 0,787 | 0,380 | 0,374 | 0,446 | 0,418 | 0,525 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | - 0,037 | 0,328 | 0,989 | 0,000 |
| Desviación típica | 0,033 | 0,108 | 0,009 | 0,041 | 0,061 | 0,061 | 0,075 | 0,070 | 0,082 | 0,019 |
| | | | | | | | 0% SVF | 2,5% SVF | 10% SVF | Sin células |
| | | | | | | | 0,009 | 0,059 | 0,062 | 0,002 |

5 El protocolo utilizado se basa en una incubación sin cambio de medio, lo que induce un agotamiento del medio en factor de crecimiento, particularmente neto para el SVF escogido para el experimento (destinado a asegurar que no contiene queuina, lo que interferiría con el experimento). En consecuencia, la DO por unidad de volumen es más baja que para los tiempos más cortos.

Interpretación de los resultados

10 Los testigos negativos y positivos son correctos y permiten validar este experimento.

En efecto, con el ensayo BrdU, el testigo de 2,5% de SVF es siempre inferior al testigo de 10% de SVF cualquiera que sea el tiempo de análisis (24, 48 y 72 horas).

El testigo "metanol" (conocido para estimular la proliferación) presenta:

- Un efecto cercano al de la queuina a 24 y 48 horas.
- Un efecto inferior al de la queuina a las 72 horas y esto a partir de 3 µg/ml.

Se puede concluir que:

- 5 - la queuina no tiene un efecto significativo en el tiempo transcurrido (24 y 48 horas) con respecto al vehículo.
- un efecto proliferativo neto y puesto de manifiesto a las 72 horas para las concentraciones de 3 y 10 µg/ml, particularmente pronunciado para la concentración de 30 µg/ml.

Migración celular

- 10 Las HDFa son sembradas en presencia de insertos de cultivo previamente esterilizados, que van a crear zonas acelulares calibradas en un tapiz celular confluyente. Las células tendrán así una tendencia a rellenar el espacio creado al migrar desde los bordes para cerrar el espacio.

Después de 5 h de incubación a 37°C, los insertos se retiran y los pocillos se lavan dos veces en PBS 1X con el fin de retirar cualquier célula que no se haya adherido.

- 15 Seguidamente se añade la queuina a 30, 10, 3 o 1 µg/ml en DMEM con 2,5% de SVF y se prepara también un intervalo equivalente de metanol, con dos pocillos por condición.

Se toman fotografías de los pocillos a t = 0 h.

Las células se cultivan seguidamente 24 h a 37°C, antes de ser fijadas en paraformaldehído. Seguidamente se toman fotografías a t = 24 h.

Se estudian también 3 testigos, 2 pocillos/testigo.

- 20 - DMEM sin suero,
- medio empobrecido en suero (DMEM complementado + 2,5% SVF)
- medio completo (DMEM complementado + 10% SVF).

- 25 Las Figuras 1 y 2 muestran los efectos del testigo DMEM con 2,5% de SVF (correspondiente a 0 µg/ml de molécula que va a ser ensayada – testigo negativo) sobre los fibroblastos, respectivamente a 0 hora (Figura 1) y 24 horas (Figura 2).

La Figura 3 muestra los efectos del testigo de DMEM con 10% de SVF (correspondiente al testigo positivo) a las 24 horas sobre los fibroblastos.

Las Figuras 4 y 5 muestran los efectos de la queuina en 2,5% de SVF a las 24 horas sobre los fibroblastos, respectivamente a una concentración de 10 µg/ml (Figura 4) y 30 µg/ml (Figura 5).

- 30 Las Figuras 6 y 7 muestran los efectos del metanol-DMEM con 2,5% de SVF a las 24 horas sobre los fibroblastos, respectivamente, a una concentración de 10 µg/ml (Figura 6) y 30 µg/ml (Figura 7).

El trazo negro visible en todas las Figuras corresponde a un marcado realizado sobre la parte posterior de los recipientes para identificar las zonas para tomar fotografías a las 0 h y 24 h.

- 35 Las fotografías se comparan entre ellas, con el fin de apreciar la diferencia de células que han migrado en el espacio entre las diferentes condiciones ensayadas.

- 40 Se comprueba que, con respecto a la condición de 0 h, las células con 2,5% de SVF así como las 10% de SVF comenzaron a colonizar el espacio después de 24 h. Las células se orientan en la dirección del borde opuesto, para migrar en esta dirección, mientras que al nivel del tapiz celular confluyente visible, las extensiones citoplásmicas de los fibroblastos no tienen una orientación determinada. Además, se puede observar sobre estas imágenes que cuantas más células han migrado en el espacio con 10% de SVF, es apreciable que las células procedentes de los dos bordes opuestos se reúnen en el centro del espacio.

- 45 La observación de las fotografías para la queuina a 10 µg/ml y 30 µg/ml muestran una migración superior a la de 2,5% de SVF. Cuantas más células son visibles en el espacio, conservando al nivel del frente de migración la orientación del lanzamiento hacia el borde opuesto visible en 2,5% de SVF. Finalmente, a 30 µg/ml, las células de los dos bordes se reúnen en el centro del espacio como es visible en presencia de 10% de SVF.

Los resultados muestran que:

- Los testigos de 2,5% de SVF y 10% de SVF presentan una migración proporcional al% de SVF utilizado;
- La queuina tiene un efecto sobre la migración de los fibroblastos ya desde la concentración de 10 µg/ml y este efecto sobre la migración de los fibroblastos se confirma a la concentración de 30 µg/ml;
- La migración en presencia de queuina a 10 y 30 µg/ml es equivalente a la obtenida con el testigo positivo de SVF al 10%;
- El metanol presenta un ligero efecto sobre la migración, pero es menos neto que el de la queuina.

Conclusiones generales

Las concentraciones inferiores a 100 µg/ml de queuina no presentan ningún efecto citotóxico sobre las HDFa. Además, se pone de manifiesto un efecto proliferativo con queuina a las concentraciones siguientes 3, 10 y 30 µg/ml después de 72 horas de incubación. Se observa un efecto proliferativo considerable con la queuina para la concentración de 30 µg/ml a las 72 horas. La queuina tiene un efecto sobre la migración de las HDFa a la concentración de 10 µg/ml. Este efecto se confirma a la concentración de 30 µg/ml. La migración en presencia de queuina a 10 y 30 µg/ml es equivalente a la obtenida con el testigo positivo de SVF al 10%.

Ejemplos de composiciones

15 Crema de base

Se mezclaron cuidadosamente 6 volúmenes de Aloe vera (que puede ser sustituido por infusiones vegetales, minerales o de agua destilada), 2,5 volúmenes de mezcla de manteca de karité y de aceite de jojoba (puede ser sustituido por cualquier otro aceite vegetal o mantequilla) y 1,5 volúmenes de cera emulsionante. Todos los ingredientes se colocan al baño maría para permitir que la cera se funda y seguidamente se mezclan vigorosamente y se colocan sobre hielo para enfriar. Seguidamente se añaden los principios activos. Finalmente se añade metilparaben a una concentración final de 0,19% con fines de conservación.

Están disponibles en el mercado numerosos fabricantes de cremas cosméticas de bases neutras (por ejemplo, Neutra base ®), y cualquier base existente de las marcas importantes puede ser mejorada por la invención.

A esta base se añade queuina a una concentración de 0,1 mg para 100 ml.

25 Para las preparaciones "bio", se añaden 100 mg de extracto de ARNt a 100 ml de crema de base.

Preparación de los extractos de ARN que contienen queuina

Crecimiento bacteriano para la preparación biológica de extractos que contienen queuina

Se adaptaron numerosos medios de crecimiento. Por ejemplo, para *Bacillus Subtilis*:

Medio ED

30 El medio de crecimiento ED contiene: K₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 4,4 mM, glucosa 27 mM; citrato de Na₃ 0,3 mM; L-glutamina 15 mM; citrato de hierro amoniacal 33,5 microM, MgSO₄ 2 mM. Los oligoelementos se añaden a esta base a partir de una solución madre 100 veces concentrada para una concentración final de: MgCl₂ 0,61 microM; CaCl₂ 49,5 microM; FeCl₃ 49,9 microM; MnCl₂ 5,05 microM; ZnCl₂ 12,4 microM; CuCl₂ 2,52 microM; CoCl₂ 2,5 microM; Na₂MoO₄ 2,48 microM.

35 La cepa salvaje de *Bacillus subtilis* es precultivada en medio líquido ED a 37°C con aireación constante. Se inocula un cultivo de nueva aportación durante una noche en 15 ml de medio ED a una densidad óptica de 0,1 a 600 nm (DO600). Las células se cultivan a 37°C hasta 1 DO600 de 1 y se enfrían en un volumen igual de metanol al 60% en tampón HEPES 70 mM, pH 7,5, a -80°C. Todas las etapas siguientes se realizaron en frío y las soluciones destinadas a la preparación del ARN fueron tratadas con poli(carbonato de dietilo) y fueron esterilizadas. Las células se sedimentaron a 4°C, se lavaron con agua y se pusieron en suspensión en 0,5 ml de glucosa al 10%, Tris-HCl 11 mM a pH 7,5 y EDTA 10 mM. Las suspensiones se transfirieron a tubos que contenían 0,1 g de bolitas de vidrio lavadas con ácido (Sigma-Aldrich, G4649).

45 Los tubos se dispusieron en el adaptador CoolPrep del instrumento FastPrep ®-24 (MP Biomedical) que contenía 50 g de hielo seco. Las células se fraccionaron en tres ciclos con los siguientes parámetros: 6 metros por segundo durante 45 s. Después de cada ciclo, las suspensiones se conservaron 1 minuto sobre el hielo. Después de una centrifugación durante 2 minutos a 10.000 rpm, la materia sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Se añadió la solución de sodio a pH 5,2 a la concentración final de 0,3 M y se aisló el ARN total en condiciones ácidas. Se añadió un volumen de fenol ácido: cloroformo y alcohol isoamílico (125:24:1) a pH 4,5 (Amresco, AM9720). Cada muestra se mezcló con centrifugación 10 s y se incubó durante 3 minutos a baño maría a 65°C. Las fases se separaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm y seguidamente la fase acuosa se volvió a extraer una vez mediante el mismo procedimiento de fenol ácido caliente. La fase acuosa se transfirió a un tubo

nuevo y se completó mediante un volumen de fenol ácido frío. Después de una centrifugación de 5 minutos a 14.000 rpm, se precipitó el ARN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h a -80°C. El ARN se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavó con etanol al 70%. El depósito de ARN se disolvió en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5. Puede ser seguidamente utilizada como primera fuente de extracto bacteriano enriquecido en queuina.

5 Enriquecimiento en ARN de transferencia

La preparación de ARN total anteriormente descrita se mezcló con un volumen de cloruro de litio 4,5 M, pH 8, con acetato de sodio a pH 5,2 a una concentración final de 0,01 mM. Esta solución de ARN se incubó 2 horas a -80°C. Después de una centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el ARNt se encuentra en la materia sobrenadante. Para suprimir la contaminación por medio de la sal, el ARNt se precipitó durante 1 h a -80°C mediante la adición de acetato de sodio 0,3 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Seguidamente el ARNt se sedimentó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavó con etanol al 70%. El sedimento de ARNt se disolvió en tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5. Esta preparación es una preparación de ARN de transferencia con elevado contenido de queuina. Esta preparación puede ser seguidamente utilizada como principio activo para la preparación de una composición cosmética según la invención.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización cosmética de la queuina, o de un precursor o derivado de la misma, como principio activo para disminuir o prevenir los signos de envejecimiento de la piel y/o de las faneras, en la que el precursor o derivado de la queuina se selecciona entre el grupo constituido por queuosina, epoxiqueuina, epoxiqueuosina, manosilqueuina, galactosilqueuina, glutamilqueuina, galactosilqueuosina, manosilqueuosina, glutamilqueuosina y ARNt-queuosina.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la queuina, el precursor o derivado de la misma, está destinado a disminuir o prevenir las arrugas y pequeñas arrugas superficiales y/o el marchitamiento de la piel y/o la falta de elasticidad y/o de tono de la piel y/o la flacidez de la piel y/o el cutis céreo y/o apergaminado y/o las irregularidades en la textura de la piel y las irregularidades en la pigmentación como las manchas de envejecimiento.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma se escoge entre el grupo que consiste en queuina, queuosina y epoxiqueuina.
4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma está en forma de un extracto bacteriano o un extracto o savia de planta, en que dicho extracto o dicha savia tiene un elevado contenido o está enriquecido en queuina, un precursor o derivado de la misma.
- 15 5. Utilización de queuina o de un precursor derivado de la misma, como principio activo para la preparación de una composición cosmética que comprende un medio fisiológicamente aceptable y destinado a disminuir o prevenir los signos de envejecimiento de la piel y/o de las faneras.
6. Utilización según la reivindicación 5, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma está presente en la composición en una cantidad de 0,1 µg a 100 µg por ml o g de composición cosmética, preferentemente de 1 a 5 µg por ml o g de composición cosmética.
- 20 7. Composición cosmética que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, queuina o un precursor o derivado de la misma como principio activo, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma está presente en la composición en una cantidad de 0,1 µg a 100 µg por ml o g de composición cosmética, preferentemente de 1 a 5 µg por ml o g de composición cosmética y porque el precursor o derivado de la queuina se selecciona entre el grupo constituido por queuosina, epoxiqueuina, epoxiqueuosina, manosilqueuina, galactosilqueuina, glutamilqueuina, galactosilqueuosina, manosilqueuosina, glutamilqueuosina y ARNt-queuosina.
- 25 8. Composición cosmética según la reivindicación 7, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma se escoge entre el grupo que consiste en queuina, queuosina y epoxiqueuina.
- 30 9. Composición cosmética según la reivindicación 7, caracterizada porque comprende un extracto bacteriano o un extracto o una savia de planta, en que dicho extracto o dicha savia tiene un elevado contenido o está enriquecido en queuina, precursor o derivado de la misma.
10. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque la queuina, el precursor o derivado de la misma está presente en la composición con co-factores o vitaminas como, por ejemplo, vitamina C o tocoferol.
- 35 11. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizada porque se presenta en forma de suero, loción, crema, leche, gel acuoso o aceitoso, hidrogel, mascarilla, bastoncillo, parche, aceite, ungüento, cera, espuma, tónico, agua de cuidado, bálsamo, maquillaje, pulverización, sombra de párpados, crema reafirmante, pintura de labios, una pasta, una pomada o un champú o acondicionador del cabello.
- 40 12. Composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, caracterizada porque es formulada para una aplicación tópica.
13. Procedimiento de tratamiento cosmético para prevenir y/o tratar los signos de envejecimiento de la piel y/o las faneras, que comprende la aplicación sobre la piel y/o de las faneras de una composición cosmética según una de las reivindicaciones 7 a 12.

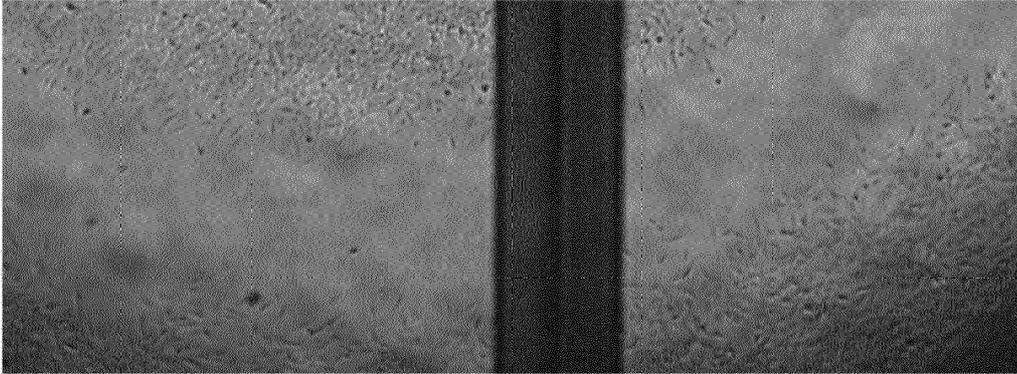


FIGURA 1

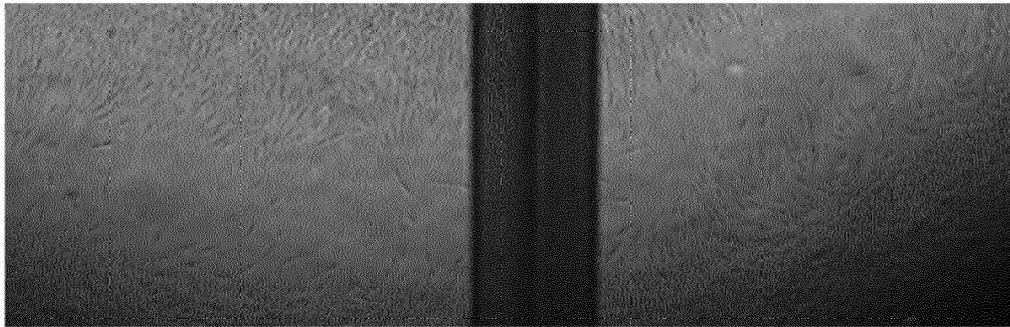


FIGURA 2

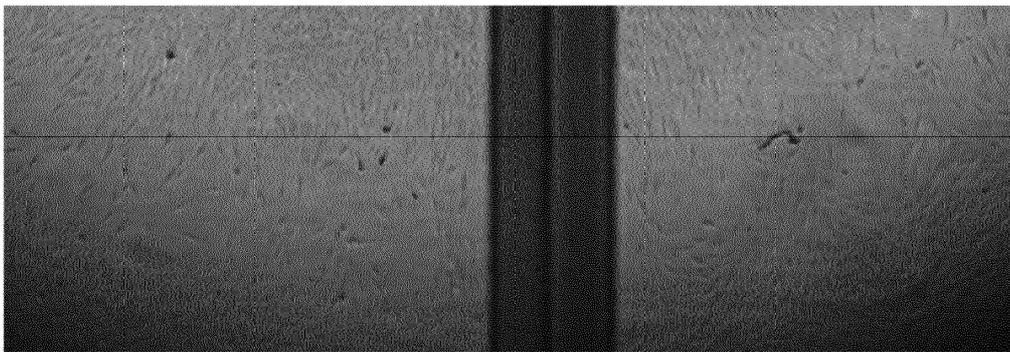


FIGURA 3

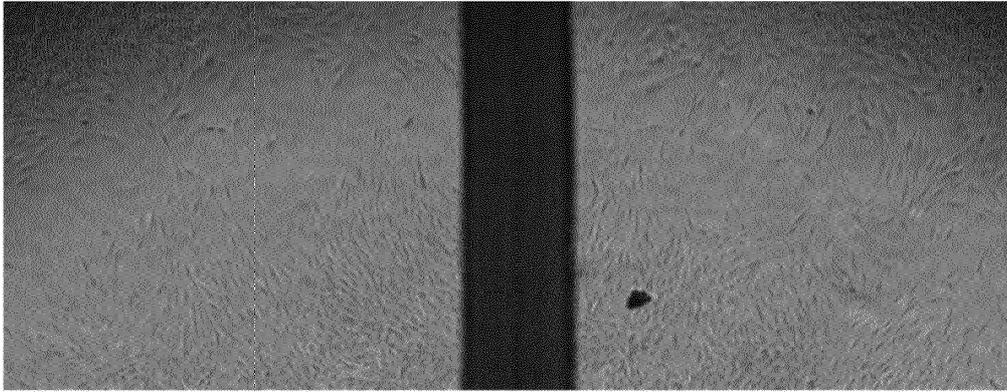


FIGURA 4

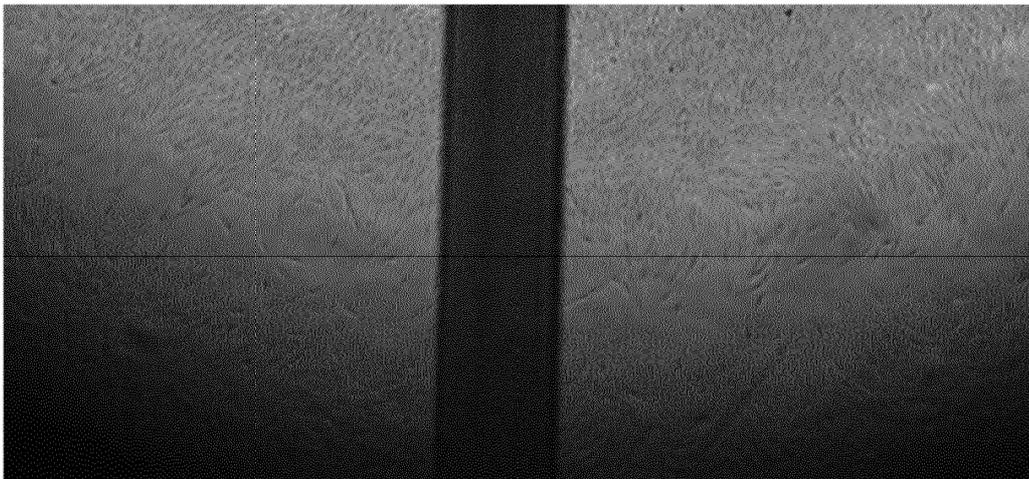


FIGURA 5

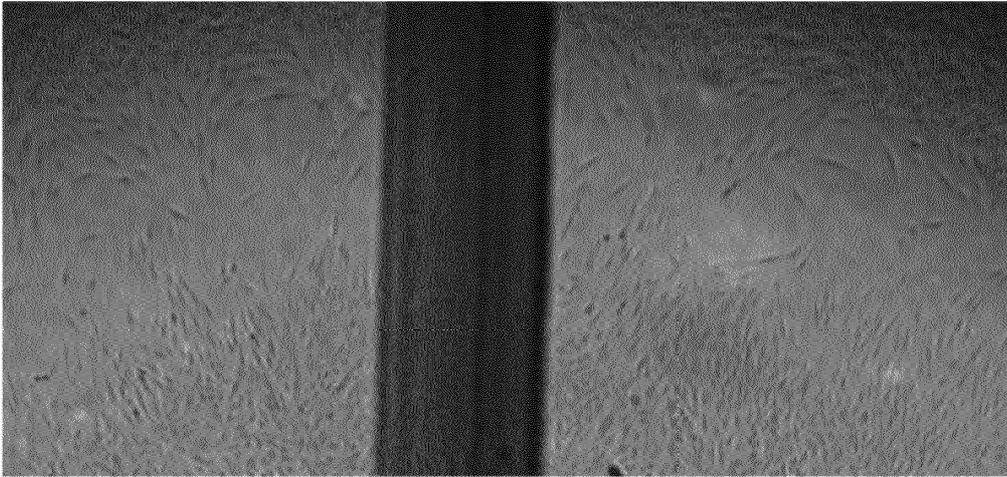


FIGURA 6

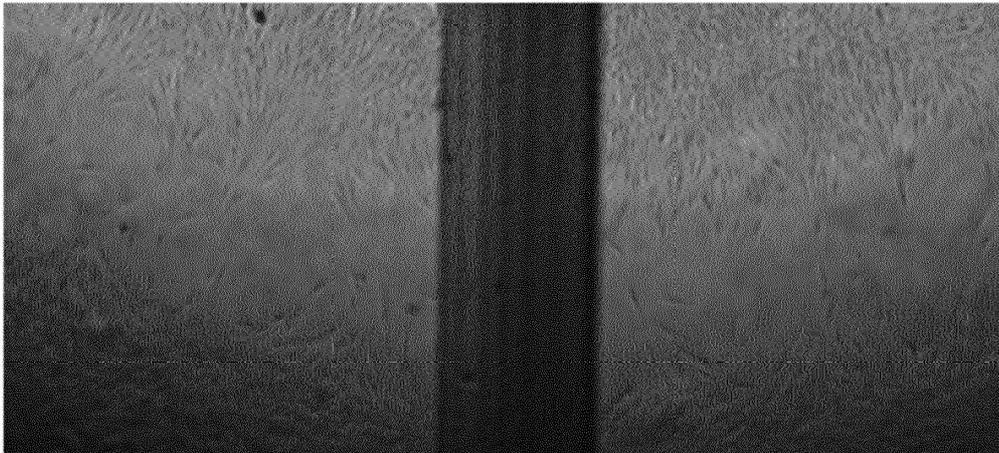


FIGURA 7