



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 861**

(51) Int. Cl.:
A23L 1/302 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05753542 .9**

(96) Fecha de presentación : **24.06.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1768500**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2007**

(54) Título: **Composiciones adecuadas para tratar los signos cutáneos de envejecimiento.**

(30) Prioridad: **25.06.2004 DK 2004 00995**
25.06.2004 US 582855 P
14.09.2004 DK 2004 01397
14.09.2004 US 609784 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

(73) Titular/es: **FERROSAN A/S**
Sydmarken 5
2850 Soeborg, DK

(72) Inventor/es: **Jensen, Annebeth, Siø;**
Kristensen, Annette, Strarup;
Poulsen, Henrik, Enghusen;
Vicanova, Jana y
Smit, Nico

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Composiciones adecuadas para tratar los signos cutáneos de envejecimiento

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden vitamina E, vitamina C y extracto de té blanco para tratar preventivamente y/o curativamente los signos cutáneos de envejecimiento. En una realización preferida, la invención se refiere al uso de vitamina E, vitamina C y extracto de té blanco, o composiciones que comprenden los mismos para reducir los signos cutáneos de envejecimiento aumentando la liberación de células detenidas en G1, por lo que las células se recuperan más rápidamente.

La piel humana es un material compuesto por la epidermis y la dermis. La parte más superior de la epidermis es el estrato córneo. Esta capa es la capa más rígida de la piel, así como la más afectada por el entorno circundante. Por debajo, el estrato córneo es la porción interna de la epidermis. Por debajo de la epidermis, la capa más superior de la dermis es la dermis papilar, que está compuesta por tejidos conjuntivos relativamente laxos. La dermis reticular, dispuesta debajo de la dermis papilar, es tejido conjuntivo muy unido que está organizado espacialmente. La dermis reticular también se asocia con arrugas gruesas. En la parte inferior de la dermis se encuentra la capa subcutánea.

Las funciones principales de la piel incluyen protección, excreción, secreción, absorción, termorregulación, pigmentogénesis, acumulación, percepción sensorial y regulación de procesos inmunológicos. Estas funciones se ven perjudicialmente afectadas por los cambios estructurales en la piel debidos al envejecimiento y a una exposición solar excesiva. Los cambios fisiológicos asociados con el envejecimiento de la piel incluyen la alteración de la función de barrera y una renovación disminuida de células epidérmicas, por ejemplo. [Cerimele, D., et al., Br. J. Dermatol., 122 Supl. 35, págs. 13-20 (abril 1990)].

Las propiedades mecánicas de la piel, tales como la elasticidad, están controladas por la densidad y geometría de la red de tejido de fibras elásticas y colágeno en la misma. El colágeno y la elastina dañados pierden sus propiedades contráctiles, dando como resultado la formación de arrugas en la piel y la aspereza de la superficie de la piel. A medida que la piel envejece o deja de estar sana, adquiere huecos, estrías, golpes, hematomas o arrugas, se vuelve más áspera y tiene una capacidad reducida para sintetizar vitamina D. La piel envejecida también se vuelve más delgada y tiene una interfaz dermoepidérmica aplanada debido a las alteraciones en el colágeno, las elastinas y los glicosaminoglicanos. [Fenske, N. A., y Lober, C. W., J. Am. Acad. Dermatol., 15: 571-585 (octubre 1986); Montagna, W. y Carlisle, K., Journal of Investigative Dermatol., 73(1): 47-53 (1979)].

Se han administrado una diversidad de vitaminas y minerales a individuos para tratar ciertos problemas cutáneos y de otro tipo que aparecen cuando el paciente tiene una deficiencia de esa vitamina o mineral. La vitamina A, por ejemplo, contribuye al tratamiento de acné y a facilitar la cicatrización de heridas; la vitamina C (ácido ascórbico) contribuye a la prevención de los hematomas cutáneos y a la cicatrización de heridas; la vitamina E es un antioxidante; y el cobre contribuye al tratamiento de defectos del tejido elástico. [Neldner, K. H., Amer. Acad. Derm. Annl. Mtg., Wash D. C., 6 diciembre 1993]. También se cree que el uso tópico de vitamina C protege de los daños solares, reduce la degradación de tejidos conjuntivos y posiblemente promueve la síntesis de colágeno. [Dial, W., Medical World News, pág. 12, marzo 1991]. La vitamina E se usa tópicamente como agente antiinflamatorio, para potenciar la hidratación de la piel, para proteger a las células de los rayos UV y para retrasar el envejecimiento prematuro de la piel.

Las preparaciones basadas en catequinas, incluyendo proantocoles y proantocianidinas, son antioxidantes de origen natural potentes. Estos compuestos se encuentran en flores, hojas de plantas y semillas de uva, por ejemplo. [Lubell, A., Cosmetic Dermatol. 9(7): 58 y 60 (julio 1996)]. La importancia potencial de la nutrición en el proceso de envejecimiento ha sido un tópico de interés durante muchas décadas y ha incluido no sólo el efecto de la dieta sobre la senescencia y muerte celular, sino también el papel que desempeñan los nutrientes en el retraso de la disminución de la inmunocompetencia, integridad esquelética, equilibrio hormonal y otras funciones corporales asociadas con frecuencia con organismos en envejecimiento. Varios nutrientes, incluyendo vitaminas y minerales esenciales, se han relacionado beneficiosamente con estos trastornos.

El envejecimiento se asocia con cambios en las características físicas y una disminución de muchas funciones fisiológicas en seres humanos. Aunque el fenómeno del envejecimiento es bien conocido, la naturaleza básica del envejecimiento no se entiende bien. Entre varias teorías del envejecimiento, la teoría del envejecimiento de los radicales libres, propuesta por primera vez en 1956 por Harman (J. Gerontol. 1956, 11, 198-300) ha recibido una atención creciente en las últimas décadas. La teoría postula que la reacción de radicales libres es un proceso común único que podría ser responsable del envejecimiento y estar íntimamente implicado en muchos trastornos asociados con la edad. El concepto moderno de esta teoría está respaldado por los datos acumulados en los últimos años, que elucidan el cambio dependiente del tiempo en el equilibrio de antioxidantes/prooxidantes a favor del estrés oxidativo que puede conducir a una desregulación de la función celular y del envejecimiento.

Un mecanismo de defensa antioxidante intrínseco complejo presente en la mayoría de organismos aerobios

secuestra radicales libres y reduce el estrés oxidativo. Los radicales libres y el estrés oxidativo conducirán a citotoxicidad y contribuirán al proceso de envejecimiento. Se ha determinado una fuerte correlación positiva entre la esperanza de vida máxima y la capacidad antioxidante potencial en varios mecanismos de defensa oxidativos (Cutler, R.G., 1991, Am. J. Clin. Nutr., 53, 373S-379S). Además, se ha elucidado una correlación positiva entre las concentraciones tisulares de antioxidantes específicos y la esperanza de vida intrínseca en mamíferos.

Se proporciona actividad antioxidante por sustancias de origen natural que incluyen vitamina C, vitamina E, glutatión, beta-caroteno e histadina. Además, enzimas intracelulares tales como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa y catalasa también proporcionan protección frente a radicales de oxígeno activado. Los diferentes patrones clínicos del fotoenvejecimiento son bien conocidos y se han descrito bien en la bibliografía. Los cambios cutáneos relacionados con la edad principales incluyen sequedad, formación de arrugas, laxitud y desarrollo de diversas neoplasias benignas. El resultado final tanto del envejecimiento intrínseco como de la exposición crónica a luz ultravioleta y otras amenazas exógenas potenciales es una piel que está arrugada, amarillenta, laxa, seca y cuarteada. Además, se desarrollan lesiones precancerosas, así como cancerosas, como consecuencia de una radiación solar repetida.

Las vitaminas antioxidantes E y C y el β -caroteno han recibido una atención considerable por su papel potencial en la prevención de enfermedades degenerativas tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Se sabe que la vitamina C actúa como antioxidante y secuestrante de radicales libres que reacciona directamente con el superóxido, radicales hidroxilo y oxígeno singlete producidos durante el metabolismo celular normal. El oxígeno es necesario para la vida. El oxígeno también viene en varias formas de radicales que se han implicado tanto en las fases iniciales como post-iniciales del proceso carcinogénico, así como en procesos invasivos y metastásicos.

Aparte de sus propiedades antioxidantes, no hay una explicación universal única aceptada y demostrada para las propiedades de lucha contra el cáncer de la vitamina C. Es probable que estén implicadas una diversidad de rutas, que incluyen (1) fortalecimiento del sistema inmune mediante una producción de linfocitos aumentada; (2) rescate de las células del daño por radicales libres; (3) inhibición de hialuronidasa, manteniendo la sustancia fundamental alrededor del tumor intacta y evitando la metástasis; (4) destrucción de virus oncogénicos a través de su aumento de las actividades fagocíticas; (5) corrección de una deficiencia de ascorbato observada comúnmente en pacientes con cáncer; (6) estimulación de la formación de colágeno y su estabilización necesaria para "encapsular" tumores; y (7) neutralización de toxinas carcinogénicas.

Como nutriente clave necesario para una respuesta inmune potente y un antioxidante liposoluble importante, se ha demostrado de sobra el papel preventivo de la vitamina E en el cáncer. Con el cáncer en remisión, el uso de vitamina E como agente nutricional preventivo para prevenir un estrés oxidativo adicional es una piedra angular de cualquier protocolo nutricional de remisión del cáncer.

El documento US 5.648.377 describe formulaciones y combinaciones de antioxidantes lipófilos e hidrófilos y el uso de los mismos en los campos terapéutico, alimentario, dietético y cosmético. Estas formulaciones se basan en el uso de carotenoides, procarotenoides y derivados de los mismos con polifenoles de estructuras catéquicas. Estas formulaciones pueden usarse en la prevención de afecciones fisiopatológicas relacionadas al menos parcialmente con una sobreproducción de radicales libres, particularmente envejecimiento, aterosclerosis y cáncer. Por consiguiente, se observó sorprendentemente que la combinación de antioxidante hidrófilo con uno lipófilo ejerce una acción antioxidante mucho mayor que la de la suma de los compuestos individuales ensayados a concentraciones equivalentes. Los antioxidantes descritos específicamente o fuentes de los mismos son un oligómero de procianidol extraído de *Vitis vinifera*, licopeno, vitamina E y procianidina A2.

El documento US 5.156.852 describe una composición para secuestrar radicales libres y otros oxidantes asociados con enfermedades oculares, que comprende vitaminas E y C, acetato de cinc, cobre, selenio, manganeso y al menos uno de L-cisteína, piridoxina y riboflavina. Las vitaminas C y E sirven como antioxidantes, mientras que el acetato de cinc, cobre, selenio y manganeso sirven como cofactores para metaloenzimas con oxidantes secuestrantes. Los tres compuestos restantes tienden a aumentar la concentración de glutatión.

Los antioxidantes son elementos importantes en la defensa del cuerpo frente al estrés oxidativo y se sabe que tienen una propiedad anti-envejecimiento general, así como una función protectora frente a enfermedades específicas. A este respecto son antioxidantes importantes, por ejemplo, vitamina E, vitamina C y carotenos, que en combinación ofrecen una protección celular sinérgica (Boehm, F., Edge, R., McGarvey, D J, FEBS Lett. 436, 387-389, 1998). Además, otros antioxidantes sin funciones vitamínicas de origen alimentario, tales como flavonoides, polifenoles o licopenos, tienen funciones antioxidantes muy importantes.

Se sabe en general que ciertas vitaminas y minerales, antioxidantes y extractos vegetales tienen efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, se conocen desde hace muchos años varios aspectos beneficiosos de los antioxidantes. Los antioxidantes son productos químicos que reaccionan con radicales libres, tales como radicales hidroxilo, para proteger a ciertos sistemas biológicos. Se ha sugerido que la eliminación de radicales libres del cuerpo

aumenta la longevidad humana; en concreto, se sugiere que la presencia de antioxidantes incluyendo carotenoides, vitamina E y ácido úrico tiene una correlación positiva con la resistencia a la autooxidación espontánea de tejidos y a los daños oxidativos en el ADN en mamíferos (Cutler, R., Am. J. Clin. Nutr. 53: 373S-9S (1991)). También se sabe que los antioxidantes limitan la destrucción del tejido cerebral cicatrizante por radicales libres, como se muestra por el método para resucitación cerebral usando vitaminas tales como A, E y C y selenio (documento US 5.149.321).

Además de su actividad antioxidante, se sabe bien que las vitaminas A, C y E tienen otros efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, se sabe que la vitamina E ayuda a mantener unos niveles de azúcar en sangre apropiados. Como otro ejemplo, se sabe que la vitamina C desempeña un papel integral en la integridad de los tejidos conectivos y estructurales en el cuerpo. Se sabe que la vitamina A desempeña un papel en la buena visión, así como en el crecimiento y el desarrollo. Por lo tanto, un suministro adecuado de estas vitaminas es esencial en el mantenimiento de una salud óptima. El uso de vitaminas A, E, C y selenio se ha propuesto como medio para inhibir o prevenir la reticulación del colágeno en la piel humana cuando se usa en combinación con ciertos péptidos activos (documento WO 90/06102).

El documento US 5.648.377 se refiere a la combinación de licopeno con un extracto de *Vitis vinifera* (extracto de semilla de uva) que demuestra una acción antioxidante sinérgica. El documento US 6.627.231 muestra el sorprendente descubrimiento de que la administración de la combinación de extracto de semilla de uva, licopeno, vitamina C, vitamina E y β -caroteno aumenta significativamente, de una forma sinérgica, la protección celular. De acuerdo con esta descripción, la protección celular con las sustancias mencionadas es estadísticamente superior a la combinación de extracto de semilla de uva y licopeno o vitamina E y licopeno.

El documento WO 01/78674 describe composiciones útiles en el tratamiento del envejecimiento de la piel en forma de, entre otras, cápsulas y comprimidos. Estas composiciones incluyen los principios activos licopeno, extracto de semilla de uva, vitamina C y vitamina E.

El documento WO 99/48386 describe un complemento alimenticio que incluye picnogenol, licopeno, vitamina C y vitamina E.

El documento US 5.895.652 se refiere a un programa de complementación oral para maximizar las rutas bioquímicas intrínsecas del cuerpo, para limitar de este modo los daños de otro modo causados por deficiencias durante el proceso de envejecimiento normal. Los componentes individuales de este complemento se proporcionan en una lista muy larga, que abarca varias páginas, e incluyen licopeno, vitamina C, vitamina E y extracto de semilla de uva.

El documento WO 98/33494 describe composiciones terapéuticas y nutrientes útiles contra trastornos vasculares y capilares, y también combina diferentes antioxidantes o componentes que tienen efecto antioxidante, incluyendo licopeno, extracto de semilla de uva, vitamina C, vitamina E y polifenoles del té.

El documento WO 01/51088 describe composiciones para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares e incluye licopeno, vitamina E, vitamina C y extracto de semilla de uva.

El documento WO 02/071874 describe una composición destinada a prevenir o restaurar déficits funcionales relacionados con la edad en mamíferos y comprende vitamina C, vitamina E, licopeno, extracto seco de manzanilla, extracto de semilla de uva y catequinas del té.

Por lo tanto, la técnica anterior muestra la acción combinada de al menos vitamina C, vitamina E, licopeno y extracto de semilla de uva, para reducir el daño oxidativo a las células y, de este modo, prevenir diversos síntomas asociados con el envejecimiento.

El documento US 2004 023894 describe composiciones orales que comprenden una fuente de δ -tocol (que comprende vitamina E) y polifenoles incluyendo té verde y té blanco.

El papel principal de los antioxidantes es proteger a las células de la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) u otros radicales libres. Las ROS son intermedios altamente activos que llevan un electrón desapareado e interaccionan fácilmente con otras moléculas en tejidos humanos, dando como resultado una reacción oxidativa. Las ROS se producen como un subproducto normal de la respiración mitocondrial y son esenciales para la función celular normal. Sin embargo, las ROS también pueden ser el resultado del estrés oxidativo inducido por factores exógenos, y se ha asociado con varios procesos patológicos. Normalmente, los antioxidantes que se encuentran en el cuerpo secuestran estas ROS no esenciales y las transforman en compuestos estables por transferencia de electrones. Esta acción de antioxidantes previene los daños oxidativos por ROS a los componentes celulares. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo es excesivo, los antioxidantes del cuerpo pueden agotarse, dando como resultado daño celular. Puede inducirse un estrés oxidativo excesivo por algunos agentes antineoplásicos (que generan ROS), así como por el propio cáncer. Debido a esto, se han realizado investigaciones para determinar los efectos de antioxidantes sobre células cancerosas y sobre las acciones de agentes antineoplásicos.

Durante periodos de estrés oxidativo, el exceso de ROS da como resultado una mayor producción de peroxidasa lipídica. La peroxidasa lipídica afecta posteriormente al ciclo celular prolongando la fase G1 o haciendo que las células entren en la fase G0.

En células en proliferación, el ciclo celular consiste en cuatro fases. Gap 1 (G1) es el intervalo entre la mitosis y la replicación del ADN que está caracterizada por el crecimiento celular. La transición que se produce en el punto de restricción (R) en G1 remite a la célula al ciclo proliferativo. La replicación del ADN se produce durante la fase de síntesis (S), que viene seguida de una segunda fase gap (G2) durante la que se produce el crecimiento y la preparación para la división celular. La mitosis y la producción de dos células hijas se producen en la fase M.

El paso por las cuatro fases del ciclo celular está regulado por una familia de ciclinas que actúan como subunidades reguladoras para quinasas dependientes de ciclina (cdk). La actividad de los diversos complejos de ciclina/cdk que regulan la progresión a través de las fases G1-S-G2 del ciclo celular está controlada por la síntesis de las ciclinas apropiadas durante una fase específica del ciclo celular. El complejo de ciclina/cdk se activa después por la fosforilación y desfosforilación secuencial de los restos clave del complejo, localizados principalmente en las unidades de cdk.

El complejo de ciclina/cdk de G1 temprano es cdk2, cdk4 o cdk6 unida a una isoforma de ciclina D. Hay varias proteínas que pueden inhibir el ciclo celular en G1. Si se ha producido daño en el ADN, la p53 se acumula en la célula e induce la inhibición mediada por p21 de ciclina D/cdk. La Mdm2, al facilitar la exportación nuclear/inactivación de p53, se convierte en parte de un bucle de retroalimentación inhibitorio que inactiva la detención en G1 mediada por p21. De forma similar, la activación de receptores de TGF- β induce la inhibición de ciclina/cdk por p15, mientras que el AMP cíclico inhibe el complejo de ciclina D/cdk mediante p27. Si el complejo de ciclina D/cdk se inhibe, la proteína de retinoblastoma (Rb) está en un estado de baja fosforilación y está estrechamente unida al factor de transcripción E2F, inhibiendo su actividad.

El paso por el punto de restricción y la transición a fase S se desencadenan por la activación del complejo de ciclina D/cdk que fosforila a Rb. La Rb fosforilada se disocia de E2F, que entonces está libre para iniciar la replicación del ADN. La ciclina E/cdk2 se acumula durante la fase G tardía y desencadena el paso hacia la fase S. Se replica todo el genoma durante la fase S. La síntesis y acumulación de ciclina B/cdc2 también comienza durante la fase S, pero el complejo está fosforilado en Thr¹⁴-Tyr¹⁵ y es inactivo. La ciclina A/cdk2 se acumula durante la fase S y su activación desencadena la transición a G2, una fase caracterizada por la acumulación de ciclina B/cdc2, la inhibición de la replicación del ADN, el crecimiento celular y la síntesis de nuevas proteínas.

En resumen, cada célula está equipada con un mecanismo muy sofisticado para reparar los daños en el ADN antes de la nueva síntesis de ADN (en la fase S) y de la división celular durante la mitosis (fase M). Como reacción a los daños en el ADN ciertos reguladores del ciclo celular tales como p16 y p53 se aumentan, lo que da como resultado la inhibición de la progresión del ciclo celular por inhibición de quinasas dependientes de ciclina específicas (cdk 4 y cdk2). Esto permite a la célula reparar los daños en el ADN antes de que comience la nueva síntesis de ADN en el denominado punto de control G1/S, evitando que las células pasen de la fase G1 a la fase S (figura 1). La p53 se aumenta en la piel después de daños inducidos por UV, como se demostró en biopsias de piel, y la recuperación hasta los niveles básicos es una medida del estado de reparación de la piel. La p16 está elevada en la fase de senescencia celular.

En trabajos anteriores (Emri et al, J Invest Dermatol 115: 435-440, 2000) se encontró un aumento dependiente de la dosis de fibroblastos en G2/M 4 días después de la irradiación con UV.

La liberación de células detenidas en G1 hacia la fase S depende del grado de daño en el ADN. Puesto que el grado de daño en el ADN está directamente relacionado con el nivel oxidativo de las células, se esperaría que la reducción más eficaz del nivel oxidativo diera origen a su vez a la liberación más rápida de células detenidas en G1 hacia la fase S. A juzgar por la técnica anterior esto implicaría la acción combinada de al menos vitamina C, vitamina E, licopeno y extracto de semilla de uva.

Abid-Essefi et al (TOXICOLOGY, 192 (2-3): 237-248, 5 NOV 2003) describen que la vitamina E puede actuar manteniendo una detención del ciclo celular prolongada, tiempo durante el cual tiene lugar la reparación del ADN.

Galli et al (ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 423 (1): 97-102 1 MAR 2004) describen que la vitamina E ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de ciclina D1 paralelo al retraso en el crecimiento celular.

Gysin et al (FASEB JOURNAL, 16 (12), OCT 2002) describen que la vitamina E inhibe la progresión del ciclo celular por reducción de los niveles de ciclina D1 y ciclina E.

Panaro et al (British Journal of Cancer (1999) 80, 1905-1911) mostraron que el ciclo celular se bloqueaba por diversos antioxidantes, incluyendo vitamina C y numerosos flavonoides.

Por lo tanto, la técnica anterior sugiere que la administración de antioxidantes da como resultado una extensión del

bloqueo del ciclo celular.

La radiación UV (UVB y UVA) ha demostrado causar diversos tipos de daños en la piel. La radiación UVB (longitudes de onda de 280-315 nm) induce de forma continua daños (ADN) en la capa superior de la piel, la epidermis. La radiación UVA (315-400 nm) llega más profundamente en la capa inferior de la piel, la dermis, pero afortunadamente este tipo de radiación es mucho menos dañina que la radiación UVB de alta energía.

Los daños en el ADN son probablemente los daños más graves que pueden causarse por la radiación UV, puesto que afectan directamente al potencial genético de una célula. Los daños en el ADN inducidos por UVB conducen a la inducción de reguladores del ciclo celular con posterior detención del ciclo celular, tiempo durante el cual puede tener lugar la reparación del ADN. La irradiación UVA de células puede causar daños en el ADN por mecanismos indirectos, incluyendo la formación de radicales de oxígeno. Hasta la fecha no se ha aclarado totalmente cómo los daños inducidos por UVA afectan al control del ciclo celular y si la prevención de daños oxidativos influirá positivamente en la progresión del ciclo celular.

Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que la acción combinada de vitamina C y vitamina E, preferentemente junto con extracto de té blanco, da origen a una liberación rápida de células de la detención en G1.

Esto demuestra que el nivel oxidativo de las células y los daños en el ADN asociados no pueden correlacionarse directamente con el tiempo necesario para que las células se regeneren y entren en la fase S. Un régimen eficaz para tratar los signos cutáneos de envejecimiento dependerá sin duda alguna de la capacidad de las células para continuar creciendo después de que haya tenido lugar el daño oxidativo.

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a una composición administrada por vía oral que comprende vitamina E, vitamina C y extracto de té blanco, para tratar de forma preventiva o curativa a individuos que padecen signos cutáneos de envejecimiento. En particular, los signos de envejecimiento se reducen cuando la composición actúa sobre los fibroblastos.

De acuerdo con la presente invención, se consiguen los beneficios potenciales de un complemento nutracéutico oral que contiene vitamina C, E y extracto de té blanco, junto con diferentes extractos vegetales, glicosaminas y minerales, para revertir ciertas características clínicas del envejecimiento cutáneo (por ejemplo arrugas). Por definición, los nutracéuticos son sustancias que tienen beneficios para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades.

El papel de varios minerales en la protección celular frente a factores tanto intrínsecos como extrínsecos se ha documentado previamente. El selenio, silicio, cobre, cinc y manganeso son los minerales que pueden incluirse en formulaciones de acuerdo con la presente invención. El cinc actúa como cofactor con la superóxido dismutasa (SOD), que a su vez actúa en concierto con la cobre SOD, la manganeso SOD mitocondrial, la glutatión peroxidasa y la catalasa, como antioxidantes celulares esenciales. El manganeso, un metal de transición, se une a fibras de colágeno e inhibe la enzima elastasa, que degrada tanto el colágeno como el tejido elástico. El manganeso también desempeña un papel clave en la síntesis de colágeno y glicoproteínas, y actúa como cofactor para catalizar la conversión de la glucosamina en ácido hialurónico. Además, se ha demostrado que el manganeso protege a los fibroblastos cutáneos humanos cultivados frente a la lesión oxidativa por UVA y peróxido de hidrógeno.

La composición puede comprender ingredientes adicionales que se sabe que inhiben el proceso de envejecimiento. En particular, extractos vegetales tales como extracto de té blanco, extracto de semilla de uva, extracto de tomate con alto contenido en licopeno, extracto de soja, aceite de borraja, aceite de linaza, extracto seco de manzanilla y aceite de coco fraccionado especial son adecuados en relación con la presente invención. Además, pueden incluirse en la composición ingredientes tales como los contenidos en extractos de diversos tejidos, incluyendo cartílago.

Las composiciones de la invención pueden formularse de cualquier forma que sea apropiada. Preferentemente, las composiciones de la invención se formulan para administración oral. Para administración oral, las composiciones de la invención pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada, particularmente en forma de una solución a tomar por vía oral, de un comprimido, de una cápsula, de un alimento nutricional o de un complemento nutricional. Dichas composiciones comprenden además al menos un excipiente apropiado y/o coadyuvante apropiado para administración oral.

Realizaciones preferidas

Se ha descubierto ahora una formulación para la reducción de las arrugas y la mejora de otras afecciones cutáneas, tales como un aumento de la elasticidad cutánea y de la suavidad de la piel. Además, la prevención o tratamiento de una piel que no está sana, tal como una piel envejecida o una piel sobreexpuesta a la luz solar, puede lograrse ventajosamente mediante la administración de la composición de la presente invención a un ser humano que necesite tratamiento. La composición incluye la combinación de varios componentes diferentes que interaccionan

proporcionando las mejoras deseadas a la piel.

La composición farmacéutica ventajosa de la presente invención previene y mejora las afecciones cutáneas usando vitamina E y vitamina C en cantidades suficientes para que las células cutáneas escapen a la detención en G1. Los ingredientes ventajosos adicionales de las composiciones pueden comprender antioxidantes de origen natural extraídos de, por ejemplo, semillas de uva y tomate, un extracto que comprende glicosaminoglicanos, un componente de metal de transición en una cantidad eficaz para unirse a colágeno y fibras elásticas y engrosar la piel, y un componente basado en catequina presente en una cantidad suficiente para inhibir la presencia de enzima anti-colágeno en la piel.

Una dermis más gruesa reduce de forma deseable la formación de arrugas y líneas que aparecen cuando se adelgazan áreas de la piel. Además del efecto sorprendente del desbloqueo del ciclo celular, los antioxidantes, tales como vitamina C, inhiben la colagenasa y elastasa, enzimas que degradan el colágeno y los tejidos elásticos. Estos antioxidantes contribuyen a la prevención de arrugas adicionales y facilitan la cicatrización de tejidos cutáneos. Por último, se incluyen componentes de metales de transición para unirse a fibras de colágeno e inhibir la elastasa, una enzima que también degrada el colágeno y el tejido elástico.

La composición incluye un antioxidante primario, que típicamente es una fuente de vitamina C y preferentemente es ácido ascórbico, o una sal farmacéuticamente aceptable o éster del mismo, y más preferentemente es palmitato de ascorbilo, dipalmitato L-ascorbato, L-ascorbato-2-sulfato sódico, o una sal ascórbica, tal como sodio, potasio o ascorbato cálcico, o mezclas de los mismos. Cuando se usan formulaciones orales de la composición, se prefiere que se use una forma no ácida de vitamina C para reducir la irrigación del estómago que puede producirse cuando se usa una forma ácida.

La expresión "extracto que comprende glicosaminas" pretende incluir cartílago, componentes que pueden extraerse a partir del mismo, y derivados del mismo, incluyendo formas sintéticas de compuestos que pueden extraerse a partir de cartílago y derivados preparados sintéticamente. Dichos compuestos también pueden encontrarse en otros tejidos que contienen tejido conjuntivo, por ejemplo, piel, y pueden extraerse a partir de los mismos. El cartílago puede seleccionarse del grupo que consiste en cartílago animal marino, cartílago de pescado, cartílago de molusco y cartílago de mamífero terrestre. Los animales marinos pueden seleccionarse del grupo que consiste en una ballena, un delfín y una foca; los peces pueden seleccionarse del grupo que consiste en tiburón, salmón, atún, bacalao y otros peces conocidos; los moluscos pueden ser un calamar; y los animales terrestres pueden seleccionarse del grupo que consiste en un bovino, porcino, pollo, pato y pavo.

El cartílago o extractos del mismo se seleccionan preferentemente de cartílago bovino, cartílago porcino, cartílago de tiburón, cartílago de calamar, cartílago de pollo y cartílago de salmón. Puede usarse el propio cartílago. Típicamente, puede usarse en forma de cartílago triturado seco, por ejemplo, liofilizado. Los extractos útiles de los tipos mencionados anteriormente de cartílago u otro tejido que contiene los componentes apropiados pueden prepararse típicamente por hidrólisis proteolítica enzimática parcial de tejido cocido, seguida de filtración y secado del hidrolizado, por ejemplo, por secado por pulverización o liofilización. El extracto de cartílago comprende típicamente uno o más compuestos que pueden extraerse de cartílago, y preferentemente comprende glicosaminoglicanos, opcionalmente unidos a un péptido.

El extracto de cartílago comprende preferentemente sulfato de condroitina, sulfato de queratán, ácido hialurónico o sulfato de dermatán o mezclas de los mismos. El término extracto de cartílago pretende incluir compuestos que pueden obtenerse de cartílago, pero los compuestos pueden obtenerse en realidad de otras fuentes.

El término extracto de cartílago puede referirse a compuestos que pueden extraerse de cartílago o derivados de los mismos. Como se indica, el extracto de cartílago puede venir de otras fuentes naturales pero puede ser de una fuente sintética, es decir, preparado de forma sintética o semisintética.

El extracto de cartílago comprende preferentemente glicosaminoglicanos seleccionados del grupo que consiste en un éster de condroitina, un éster de queratán, ácido hialurónico o un éster del mismo, un éster de dermatán, heparina y un éster de heparán. Estos pueden unirse a una proteína o péptido o como formas epiméricas o poliméricas de éster de condroitina, un éster de queratán, ácido hialurónico o un éster del mismo, un éster de dermatán, heparina, un éster de heparán, preferentemente sulfato de condroitina, sulfato de queratán, ácido hialurónico o un éster del mismo, un sulfato de dermatán, una heparina o un sulfato de heparán. Los glicosaminoglicanos pueden seleccionarse del grupo que consiste en sulfato de condroitina y sulfato de queratán, cada uno de los cuales puede unirse opcionalmente a un péptido. Más preferentemente, la composición de la presente invención comprende un extracto de cartílago al 5% que comprende sulfato de condroitina, opcionalmente unido a un péptido.

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende menos del 1% peso/peso de colágeno, preferentemente menos del 0,5%, particularmente preferentemente menos del 0,1% de proteína de colágeno. En la forma típica en que se prepara el extracto de colágeno, no comprende colágeno en ninguna cantidad apreciable. El extracto se prepara preferentemente por hidrólisis proteolítica enzimática, digiriendo de este

modo las proteínas de colágeno en péptidos. El colágeno, o una fuente del mismo, preferentemente no se añade adicionalmente a la composición de la presente invención. En una realización más preferida, la composición está esencialmente libre de colágeno.

5 Las composiciones de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos para aumentar la densidad dérmica. Preferentemente, se usan dos o más aminoácidos en combinación. Son aceptables las formas L o D de aminoácidos. Los aminoácidos más preferidos son lisina y prolina y se usan ventajosamente en combinación. También puede usarse cisteína, metionina u otros aminoácidos si se desea. Los aminoácidos pueden incluirse en una forma soluble tal como el clorhidrato, es decir, y clorhidrato de L-lisina. Los aminoácidos están presentes en una cantidad de aproximadamente el 2 al 25% en peso cada uno, preferentemente de aproximadamente el 4 al 20% en peso cada uno, y más preferentemente de aproximadamente el 6 al 15% en peso cada uno. Una dosis unitaria para cada aminoácido es típicamente de aproximadamente 35 mg a 200 mg cada uno, preferentemente de aproximadamente 50 mg a 150 mg cada uno, y más preferentemente de aproximadamente 70 mg a 120 mg en la composición farmacéutica. Las formas útiles adicionales de aminoácidos incluyen lo siguiente: una fuente de cisteína, preferentemente N-acetil cisteína, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1 al 10% en peso, preferentemente de aproximadamente el 2 al 8% en peso y, más preferentemente, de aproximadamente el 3 al 6% en peso de la composición. Puede estar presente una fuente de metionina, preferentemente L-selenometionina, en una cantidad de aproximadamente el 0,5 al 5% en peso, preferentemente del 0,2 al 3% en peso y, más preferentemente, del 0,3 al 1% en peso de la composición, en el que el componente de selenio está entre aproximadamente el 0,1 y el 3% en peso de la fuente de metionina.

Se incluyen uno o más compuestos de metales de transición en una cantidad eficaz para unirse a colágeno y tejido elástico para recomponer la piel. Ciertos compuestos metales de transición inhiben la enzima elastasa para inhibir la degradación de tejido elástico y colágeno. Los metales de transición preferidos incluyen cinc, manganeso y cobre.

Puede añadirse un componente de cinc para contribuir a la unión de colágeno y fibras elásticas, contribuyendo ambos a la prevención de las arrugas y a la recomposición de la piel arrugada. Se sabe que el cinc es también un cofactor importante para toda una multitud de metaloenzimas, no menos importante la superóxido dismutasa, que secuestra al potente oxidante superóxido.

El componente de cinc puede ser cualquier compuesto de cinc o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferentemente gluconato de cinc, en el que el cinc está típicamente presente en aproximadamente el 1 al 30% en peso de la composición. El componente de cinc está presente en aproximadamente el 1 al 10% en peso, más preferentemente de aproximadamente el 2 al 7% en peso y, más preferentemente, de aproximadamente el 3 al 5% en peso de la composición.

Los antioxidantes de las composiciones de la presente invención pueden ser de fuentes naturales o sintéticas. En una realización típica, la fuente natural se selecciona del grupo que consiste en corteza de pino, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtilus*, *Silybum marianum*.

En una realización adecuada, el uno o más antioxidantes naturales pueden extraerse de semilla de uva de *Vitis vinifera*.

La fuente natural de uno o más antioxidantes típicamente contiene hasta el 25% p/p de catequina, epicatequina y ácido gálico; hasta el 90% p/p de dímero, trímero y/o tetramero de epicatequina, y/o galatos de la misma, y hasta el 10% p/p de pentámero, 5-hexámero y/o heptámero de epicatequina y/o galatos de la misma.

El uno o más antioxidantes naturales pueden seleccionarse del grupo que consiste en polifenoles y ésteres de los mismos; ácido ascórbico (vitamina C) y ésteres de los mismos; y sales farmacéuticas aceptables de los mismos. Los polifenoles son típicamente catequinas, leucoantocianidinas y flavanonas; flavaninas, isoflavonas y antocianidinas, flavonoles, flavonolignanos y oligómeros de los mismos.

Dichos polifenoles, flavolignanos o flavonoides son antioxidantes que se producen de forma natural en muchas plantas. En la presente invención se extraen isoflavonas de soja, se extraen flavonas de borraja, tomillo o perejil, se extraen catequinas del té (preferentemente té blanco) y se extraen proantocianidinas de uvas (preferentemente semillas de uva).

En una realización preferida, los antioxidantes naturales son una catequina seleccionada del grupo que consiste en proantocianina A2 y procianidol oligomérico (OPC), más preferentemente un procianidol oligomérico. Los flavonolignanos son típicamente silimarina o uno de los componentes de la misma, tales como silibina, silidianina, silicristina e isosilibina.

Como se indica, un antioxidante natural particularmente preferido es un extracto de semilla de uva, es decir, semillas de *Vitis vinifera*, obteniéndose típicamente dicho extracto por extracción de semillas de uva usando disolventes orgánicos tales como acetona y/o acetato de etilo o similares, evaporando los disolventes, redisolviendo el residuo

en agua y filtrando y secando el filtrado, por ejemplo, por secado por pulverización o liofilización. En una realización particularmente preferida, un extracto de este tipo contiene típicamente hasta el 25% p/p de catequina, epicatequina y ácido gálico; hasta el 90% p/p de dímero, trímero y/o tetramero de epicatequina y/o galatos de la misma; y hasta el 10% p/p de pentámero, hexámero y/o heptámero de epicatequina, y/o galatos de la misma.

Además los antioxidantes son típicamente carotenoides, procarotenoides, 5-tocoferoles, fitoesteroides y ubiquinonas. Los carotenoides son antioxidantes lipófilos particularmente interesantes y pueden seleccionarse del grupo que consiste en α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, licopeno, zeaxantina, criptoxantina, luteína y xantófilo.

Una composición de la presente invención comprende típicamente menos del 25% en peso de beta-caroteno, preferentemente menos del 10% de beta-caroteno, particularmente menos del 0,1% en peso de beta-caroteno. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que puede conseguir los efectos beneficiosos que se describen a continuación con muy poco o esencialmente nada de beta-caroteno.

El extracto de tomate, comprende licopeno. Preferentemente, el extracto de tomate comprende de aproximadamente el 5 al 12% en peso, típicamente de aproximadamente el 10% en peso de licopeno, peso/peso. El extracto de tomate puede ser de un solo o de una mezcla de tomates.

En una realización típica, la variedad de tomate que se usa para preparar el extracto de tomate es *Lycopersicum esculentum*.

En una realización preferida de la presente invención, la composición comprende del 0,1 al 5% en peso de licopeno peso/peso, preferentemente del 0,2 al 4% en peso de licopeno, tal como del 0,3 al 2% en peso de licopeno, más preferentemente del 0,3 al 1% en peso de licopeno, particularmente del 0,3 al 0,8% en peso, tal como del 0,3 al 0,6% en peso de licopeno.

En una definición alternativa de la composición de la presente invención, la composición comprende un extracto vegetal y un extracto de cartilago, en el que el extracto vegetal comprende extracto de semilla de uva y licopeno en una proporción de peso/peso de aproximadamente 5:1 a 15:1, preferentemente de aproximadamente 10:1.

Una composición adecuada adicional de acuerdo con la invención comprende varios de los ingredientes siguientes: 10-200 mg, preferentemente 20-100 mg, más preferentemente 30-80 mg, aún más preferentemente 35-65 mg y, más preferentemente, 45-55 mg de extracto de cartilago; 10-200 mg, preferentemente 20-100 mg, más preferentemente 30-80 mg, aún más preferentemente 35-65 mg y, más preferentemente, 45-55 mg de extractos vegetales; 1-50 mg, preferentemente 3-40 mg, más preferentemente 5-30 mg, aún más preferentemente 8-25 mg y, más preferentemente, 10-20 mg de vitamina C; 0,1-30 mg, preferentemente 0,5-20 mg, más preferentemente 1-15 mg, aún más preferentemente 2-10 mg y, más preferentemente, 3-7 mg de vitamina E; 1-50 mg, preferentemente 3-40 mg, más preferentemente 5-30 mg, aún más preferentemente 8-25 mg y, más preferentemente, 10-20 mg de extracto de té blanco; y 1-40 mg, preferentemente 2-30 mg, más preferentemente 3-20 mg, aún más preferentemente 5-15 mg y, más preferentemente, 7-12 mg de gluconato de cinc, en la que los extractos vegetales comprenden un procianidol oligomérico y licopeno y el extracto de cartilago comprende glicosaminoglicanos.

Una dosis unitaria para administración puede estar entre 50 y 2000 mg, preferentemente entre 100 y 1500 mg, más preferentemente entre 150 y 900 mg, aún más preferentemente entre 200 y 700 mg y, más preferentemente, entre 250 y 600 mg.

Aunque puede emplearse cualquier vía de administración adecuada para proporcionar al paciente una dosificación eficaz de la composición de acuerdo con la presente invención, se prefiere la administración oral. Las vías adecuadas incluyen, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, intravenosa, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular y pueden emplearse formas de administración similares. Las formas de dosificación adecuadas incluyen comprimidos, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, parches, supositorios y similares, aunque se prefieren formas de dosificación oral. Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos de la presente invención incluyen los ingredientes activos descritos anteriormente, y también pueden contener vehículos, excipientes y similares farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal preparada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo ácidos orgánicos o inorgánicos. Son ejemplos de dichos ácidos inorgánicos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico y fosfórico. Pueden seleccionarse ácidos orgánicos apropiados, por ejemplo, de las clases alifática, aromática, carboxilica y sulfónica de ácidos orgánicos, siendo ejemplos de los mismos fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucurónico, maleico, furoico, glutámico, benzoico, antranílico, salicílico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, pantoténico, bencenosulfónico, esteárico, sulfanílico, algénico y galacturónico. Los ejemplos de dichas bases inorgánicas para formación potencial de sales con los compuestos sulfato o fosfato de la invención incluyen sales metálicas preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Pueden seleccionarse bases orgánicas apropiadas, por ejemplo, de N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina,

meglumina (N-metilglucamina) y procaína.

Las composiciones para usar en la presente invención incluyen composiciones tales como suspensiones, soluciones y elixires; aerosoles; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares, en el caso de preparaciones sólidas orales (tales como polvos, cápsulas y comprimidos), prefiriéndose las preparaciones sólidas orales sobre las preparaciones líquidas orales. Las preparaciones sólidas orales más preferidas son comprimidos.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales.

Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Pueden prepararse comprimidos obtenidos por compresión mediante compresión en una máquina adecuada del ingrediente activo en una forma fluida tal como polvos o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Experimento 1: Efecto de una composición antioxidante sobre el ciclo celular

En una serie de experimentos, se investigaron los efectos de los UV sobre la distribución del ciclo celular en fibroblastos cutáneos cultivados mediante análisis de FACS. Se descubrió que tanto los UVB (1 kJ/m^2) como los UVA (250 kJ/m^2) causan inhibición del ciclo celular. También para los UVA se encontró un aumento de células en G1 un día después de la irradiación. Se investigaron los efectos de los tratamientos antioxidantes sobre el ciclo celular de fibroblastos cutáneos.

Materiales y métodos

Cultivo celular e irradiación (para información adicional se hace referencia a Leeuw SM, Smit NP, Van Veldhoven M, Pennings EM, Pavel S, Simons JW, Schothorst AA: Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. J. Photochem. Photobiol. B 2001, 61: 106-113):

Se cultivaron fibroblastos de piel humana a 37°C con dióxido de carbono al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero fetal de ternera al 2,5% (Hyclone, Logan, Utah) y penicilina 100 UI/l y estreptomycin 100 $\mu\text{g/l}$. Para subcultivar, las células se despegaron con una solución de tripsina al 0,25%/EDTA (Gibco) y se dividieron 1:5 y se mantuvieron en medio de control en placas de Petri Greiner de 90 mm. Después de tres días, las células se incubaron con los diferentes medios: control; y vitamina E y C (7 y 10 μM) más té blanco (5 $\mu\text{g/ml}$). Tres días después el medio se retiró y las células se lavaron con 4 ml de PBS y se irradiaron en las placas con las tapas puestas en 5 ml de solución salina equilibrada de Hank. Se usó una lámpara Sella Sunlight fuente de UV tipo 2.001 (Sella, Gevelsberg, Alemania) para la irradiación con una dosis de 250 kJ/m^2 de UVA. Una lámina azul UVASUN y un filtro de película azul UVASUN eliminaron por filtración las longitudes de onda por debajo de 320 nm [2]. Las dosis se controlaron con un radiómetro de investigación IL700A usando un detector WBS320#801 (Internacional Inc. Light, Newburyport, MA, Estados Unidos).

Distribución del ciclo celular por análisis de FACS:

Después del tratamiento con UVA las células se mantuvieron durante una noche en medio de control. Una hora antes de la recogida se añadió BrdU 100 μM (5-bromo-2-desoxiuridina, Sigma, B5002) para su incorporación en el ADN. Las células se recogieron por tratamiento con tripsina y se fijaron en etanol al 70% después del lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Después de la eliminación del exceso de etanol las células se incubaron durante 35 minutos en 0,9 ml de pepsina al 0,1% en HCl 2M. Se añadió Tris 1 M (2,1 ml) y las células se lavaron 2 veces con (PBS-Tween al 0,5%). A continuación, las células se incubaron con 100 μl de anticuerpos de ratón αBrdU (DAKO, Bu20A) diluidos 1:50 en PBS-Tween con suero de ternera recién nacida al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las células dos veces se incubaron durante 1 h a 4°C en la oscuridad con 100 μl de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón-FITC (Pharmingen, nº 553443) 1:100 en PBS-Tween-NBCS. Después de lavar dos veces se añadieron 400 μl de yoduro de propidio 20 $\mu\text{g/ml}$, ribonucleasa al 0,1% (RNasa, Sigma) en PBS y las células se analizaron mediante análisis de FACS usando un FACS-Calibur 1 (Beckton Dickinson). Se midió el marcaje con FITC de BrdU en FL-1 y PI en FL-3 y se registraron 10000 acontecimientos y se analizaron mediante el programa informático Cell Quest (Beckton Dickinson).

Resultados:

La Figura 1 muestra la distribución de células en fase G1 y G2 un día después de la irradiación con UVA (oscuras) en comparación con cultivos de fibroblastos con irradiación simulada (grises).

Los resultados demuestran de forma concluyente diferencias en el porcentaje de células encontradas en fase G1 y G2 en las células tratadas con vitamina C + vitamina E + té blanco en comparación con células de control. La irradiación con UVA causaba un aumento de las células presentes en fase G1 en células de control (detención en G1). El porcentaje de células en fase G1 en las células tratadas con vitamina C + vitamina E + té blanco era considerablemente inferior, indicando que menos células se detenían en fase G1 en comparación con cultivos de control. Por consiguiente, el número en células presentes en fase G2 en las células tratadas con vitamina C + vitamina E + té blanco era superior en comparación con las células de control.

Equivalentes de piel reconstruida

Experimento 2: Efecto de la composición sobre el desarrollo y la estructura de la matriz extracelular dérmica y epidermis usando un equivalente de piel cultivado *in vitro*.

Los experimentos tenían como objetivo examinar el efecto de composiciones específicas de acuerdo con la presente invención (en lo sucesivo denominadas Composición elevada y Composición reducida, o en general Composición) usando equivalentes de piel reconstruida (SE) 3-D *in vitro*.

SE preparados con células de donantes de 19 ó 49 años se trataron con menores y mayores concentraciones de composición (Composición elevada y Composición reducida) o se dejaron sin tratar y se cultivaron durante 35, 42 ó 60 días. En lo sucesivo, los cultivos se examinaron para determinar la estructura y organización de la capa dérmica y epidérmica. Además, la síntesis de componentes principales de la matrices extracelular (ECM) tales como fibrilina, elastina y colágeno de tipo I se determinó usando Q RT-PCR e inmunofluorescencia.

Materiales y Métodos:**Cultivos celulares**

Se aislaron cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos a partir de piel humana obtenida de restos quirúrgicos de cirugía plástica. Se cultivaron fibroblastos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM con Glutamax-1, Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia) complementado con suero de ternera al 10% (HyClone, Logan, Utah, Estados Unidos), gentamicina 20 µg/ml (Panpharma, Fougères, Francia), penicilina 100 UI/ml (Sarbach, Suresnes, Francia) y anfotericina B 1 µg/ml (Bristol Myers Squibb, Puteaux, Francia). Para los SE, se cultivaron queratinocitos en una mezcla 3:1 de DMEM y F12 de Ham (Life Technologies), respectivamente, complementados con suero de ternera al 10% (FCS) (HyClone), factor de crecimiento epidérmico 10 µg/ml (EGF) (Austral Biologic, San Ramón, California, Estados Unidos), insulina 0,12 UI/ml (Lilly, Saint-Cloud, Francia), hidrocortisona 0,4 µg/ml (Upjohn, St Quentin en Yvelines, Francia), triyodo-L-tironina 5 µg/ml (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), adenina 24,3 µg/ml (Sigma) y antibióticos. Para preparar monocapas de queratinocitos, las células se cultivaron en medio K-SFM definido (Life Technologies) complementado durante 5 días después de la confluencia con CaCl₂ 12 mM.

Equivalente de piel y equivalente dérmico

Usando técnicas de laboratorio de la técnica común, se prepararon equivalentes de piel reconstruida (SE) 3-D *in vitro* en el laboratorio. Los SE tanto morfológica como bioquímicamente se parecen mucho a piel humana nativa con dermis, epidermis y estrato córneo totalmente desarrollados (Saintigny G, Bonnard M, Damour O, Collombel C. Acta. Derm. Venereol, 1993, 73: 175-180; Sahuc F, Nakazawa K, Bethod F, Collombel C, Damour O. Wound Rep Reg, 1996, 4:93-102).

Los equivalentes de piel (SE) se prepararon como se describe (Duplan-Perrat et al, 2000). En resumen, se prepararon equivalentes dérmicos (DE) añadiendo una suspensión de 2×10^5 fibroblastos/cm² en la parte superior de la esponja porosa de colágeno-glicosaminoglicanos-quitosán Mimedisk® (Coletica, Lyon). Todos los equivalentes se cultivaron durante 21 días en medio de fibroblastos que contenía ácido ascórbico 2-fosfato 1 mM (Sigma). Los equivalentes dérmicos (DE) se nutrieron diariamente. Se sembraron queratinocitos sobre el equivalente dérmico el día 14, a una densidad de 250.000 células/cm². Después de 7 días de cultivo sumergido en el medio de queratinocitos, los SE se elevaron hasta la superficie de contacto aire-líquido y se cultivaron en un medio de queratinocitos simplificado que contenía DMEM complementado con suero de ternera al 10%, EGF 10 ng/ml, insulina 0,12 UI/ml, hidrocortisona 0,4 µg/ml y antibióticos. El medio se complementó con ácido L-ascórbico 50 µg/ml y se cambió cada día. Los SE se cultivaron en total 35, 42 ó 60 días.

Complementación con Composición

Se añadió composición ensayada en dos concentraciones (para determinar la relación de dosis-respuesta) al medio de cultivo en una fase temprana de desarrollo de SE (desde el primer cambio de medio). Desde el primer cambio de medio después de la siembra de fibroblastos en Mimedisk®, se añadió Composición al medio de cultivo hasta el final del experimento. En paralelo, se prepararon equivalentes de piel de control conteniendo el medio solamente el disolvente de los compuestos de la Composición activa, tetrahidrofurano (THF).

La Composición se añadió en dos concentraciones:

	Composición con concentración elevada	Composición con concentración reducida
Ascorbato sódico (vitamina C)	25 µM = 5,0 µg/ml	12,5 µM
Acetato de tocoferol (vitamina E)	17,5 µM = 7,5 µg/ml	8,8 µM
Extracto de té blanco (WT)	5 µg/ml	2,5 µg/ml
Extracto de semilla de uva (GE)	5 µg/ml	2,5 µg/ml
Extracto de tomate (TE)	10 µg/ml	5 µg/ml
Extracto de soja (SOY)	10 µg/ml	5 µg/ml
Extracto de cartílago	70 µg/ml	35 µg/ml
Gluconato de cinc	1 µM	0,5 µM

Análisis de muestra

Después de 35, 42 ó 60 días de cultivo, se recogieron los SE y se sometieron a análisis. Se fijaron tres muestras de cada condición de SE en formalina y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco µm con hematoxilina-floxina-safrán y se examinaron bajo microscopio óptico para evaluar la estructura dérmica y epidérmica. Se incluyeron tres muestras adicionales en Tissue-tek para mediciones de la inmunofluorescencia y se congelaron tres a -80°C para RT-PCR cuantitativa.

Inmunohistología e inmunofluorescencia. Se embebieron muestras de equivalentes de piel en OCT Tissue-tek (Miles, Immunotech, Marseille, Francia). Se obtuvieron secciones congeladas de seis micrómetros con el criotomo Frigocut 2800 (Reichert-Jung, París, Francia), se secaron al aire, se bloquearon en solución salina tamponada con fosfato que contenía albúmina sérica bovina al 1% (p/vol). Los anticuerpos usados para este estudio se enumeran en la tabla siguiente.

Anticuerpos usados en equivalentes de piel

ANTÍGENO PRIMARIO	HOSPEDADOR	DILUCIÓN	FUENTE
ELASTINA	CONEJO	1:100	NOVOTEC (LYON, FRANCIA)
FIBRILINA	RATÓN	1:50	NEOMARKERS (UNION CITY, CA)
FILAGRINA	RATÓN	1:100	BIOMEDICAL TECHNOLOGIES INC. (SOUGHTON, MA)
QUERATINA 10	RATÓN	1:50	NOVOCASTRA (NEWCASTLE, REINO UNIDO)
K167	RATÓN	1:100	NOVOCASTRA (NEWCASTLE, REINO UNIDO)
COLÁGENO TIPO I	CONEJO	1:1000	NOVOTEC (LYON, FRANCIA)

Los anticuerpos de colágeno tipo I específicos para colágeno humano no presentan reactividad cruzada con colágenos bovinos que se usaron para preparar el sustrato dérmico (Noblesse et al, J Invest Dermatol., 2004; 122(3): 621-30).

Los anticuerpos secundarios, de cabra anti-IgG de conejo (dilución 1:50, Sanofi Diagnostic Pasteur, Francia) o de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1:50, Cedarlane, Canadá) marcados con FITC, se mezclaron con azul de Evans al

0,1% para reducir la tinción inespecífica de la red de esponja (Kieny y Mauger, 1984). Para los controles, se omitió el anticuerpo primario. Se procesaron múltiples secciones de cada espécimen para asegurar muestras representativas.

RT-PCR cuantitativa

Para realizar un seguimiento de la producción de ARNm para elastina, fibrilina 1 y colágeno tipo I el día 42 y 60 se usó RT-PCR cuantitativa. Se extrajo el ARN total de los equivalentes de piel usando el "Sistema de Aislamiento de ARN total SV 96" de Promega. Para cada muestra, se obtuvieron 100 µl de ARN total purificado, se cuantificó a 260 nm con un espectrofotómetro (spectramax 190; Molecular Devices) y se mantuvo congelado a -80°C hasta su uso.

Para la RT-PCR cuantitativa, se diseñaron cebadores específicos para cada gen. Se realizó la RT-PCR cuantitativa de una etapa con los cebadores específicos usando el kit de "RT-PCR SYBR Green QuantiTect" (Qiagen). La mezcla de reacción contenía: el tampón SYBR Green 1X; los dos cebadores específicos a 0,5 µM; 1 µl de mezcla enzimática; 50 ng de ARN de muestra total; cantidad suficiente para 50 µl con agua sin ARNasa. La reacción se procesó en el termociclador OPTICON® (MJ Research). Después del procesamiento, las muestras se procesaron en un gel de agarosa al 2% para asegurarse de que los productos de PCR fueran puros.

Resultados:

Efecto de la Composición sobre un equivalente de piel reconstruida a partir de fibroblastos dérmicos de donante de 19 años de edad

Independientemente de la concentración, la Combinación retrasaba la senescencia epidérmica. La Figura 2 muestra el efecto de la Composición con concentración elevada y reducida sobre un equivalente de piel reconstruida a partir de fibroblastos dérmicos de un donante de 19 años de edad. Tinción con hematoxilina-floxina-safrán. 25x aumentos.

A los 42 días de cultivo, la epidermis en las muestras de control mostraba una estructura típica con varias capas de células epidérmicas viables y estrato córneo (Figura 2, Control, 42 días). Con un tiempo de cultivo prolongado (Control, 60 días), la epidermis se volvía bastante fina, completamente diferenciada y mostraba algunas características típicas del deterioro de SE mantenidos en cultivo durante un tiempo prolongado (senescencia epidérmica). El tratamiento con Combinación dio como resultado un retraso de la senescencia según se demuestra por formación de epidermis gruesa, pluriestratificada y en renovación (Figura 2, Composiciones elevada y reducida, 60 días). Los efectos sobre la dermis no eran evidentes.

Efecto de la Composición sobre un equivalente de piel reconstruida a partir de fibroblastos dérmicos de donante de 49 años de edad

La Figura 3 muestra el efecto de la Composición con concentración elevada y reducida sobre un equivalente de piel reconstruida a partir de fibroblastos dérmicos de donantes de 49 años de edad. Tinción con hematoxilina-floxina-safrán. 40x aumentos.

La combinación retrasaba la senescencia epidérmica, estimulaba la formación de una estructura dérmica densa y retrasaba la senescencia dérmica en SE de donantes de 49 años de edad. La Combinación con una concentración reducida mostraba efectos superiores (Figura 3).

Hay diferencias evidentes entre SE de control preparados con fibroblastos de donantes de 19 años de edad y 49 años de edad. Las muestras de control de donantes de 49 años de edad mostraban un deterioro más rápido de las estructuras tanto epidérmica como dérmica durante el tiempo de cultivo que las muestras de control de células de 19 años de edad (compárese el Control a día 42 y 60 en las Figuras 2 y 3). Tanto a día 42 como 60, las muestras de control de SE de células de 49 años de edad tenían un aspecto incluso más deteriorado y diferenciado, mostrando un resto de epidermis cornificada en comparación con los controles respectivos de SE de 19 años de edad. Este efecto se reducía por tratamiento con Combinación. La Combinación con menor concentración daba resultados más positivos en comparación con la Combinación con mayor concentración. El SE resultante estaba bien desarrollado con dermis densa y gruesa, y epidermis bien estratificada. Compárese el Control y la Combinación con menor concentración a día 60 en la Figura 3.

Los resultados demostraban de forma concluyente que el tratamiento de equivalentes de piel con Combinación tenía un efecto positivo sobre la estructura, calidad y mantenimiento tanto de la epidermis como de la dermis. La combinación retrasaba la senescencia epidérmica estimulando el crecimiento de queratinocitos epidérmicos, lo que conducía a una epidermis gruesa, bien estructurada y en renovación, independientemente de la edad del donante de las células. También había un efecto marcado sobre la formación de una estructura dérmica densa y una senescencia retardada de la dermis en SE de donantes de 49 años de edad.

Por lo tanto, el tratamiento con Composición, es decir, el tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente invención, tenía un efecto muy positivo sobre la epidermis: reducía la senescencia epidérmica y estimulaba el crecimiento de queratinocitos y la renovación independientemente de la edad de las células aun cuando el efecto

era más pronunciado en SE de células viejas. En comparación con las muestras no tratadas que mostraban una disminución del espesor epidérmico y que no mostraban renovación celular después de 42 días en cultivo, el tratamiento con Composición daba como resultado el mantenimiento de una epidermis gruesa en renovación. En la dermis, la Composición estimulaba la producción y deposición de componentes de la ECM (matriz extracelular).

Inmunohistoquímica y RT-PCR Cuantitativa

Para el SE preparado con fibroblastos tratados con Composición (concentración reducida así como elevada) de los donantes de 49 años de edad, mostraba un aumento significativo de la síntesis de ARNm de colágeno tipo I, fibrilina y elastina después de 60 días de cultivo. Dichos efectos no se observaron para fibroblastos de donantes de 19 años de edad. Este efecto se confirmó por tinción inmunohistoquímica de proteínas de colágeno tipo I, elastina y fibrilina. Además, el número de células que expresaban el marcador de proliferación Ki67 después de 60 días era 4 veces superior en fibroblastos tratados con Composición respecto al control; esto es aplicable a fibroblastos de donantes tanto de 19 años como de 49 años de edad.

Experimento 3: Experimentos *in vivo*

Comprimidos:

Se prepararon comprimidos de acuerdo con las listas de ingredientes siguientes por procedimientos convencionales:

COMPRIMIDO I	
	• Ascorbato sódico
• Ascorbato sódico	• Acetato de d- α -tocoferilo
• Acetato de d- α -tocoferilo	• Extracto de té blanco
• Extracto de té blanco	• Extracto de soja
• Extracto de soja	• Extracto de cartílago
• Extracto de cartílago	• Extracto de manzanilla
• Extracto de semilla de uva	• Extracto de semilla de uva
• Extracto de tomate	• Extracto de tomate
• Gluconato de cinc	• Gluconato de cinc
• Excipientes farmacéuticamente aceptables	• Excipientes farmacéuticamente aceptables

COMPRIMIDO II

Ensayo del producto:

Los comprimidos (COMPRIMIDO I por la mañana y COMPRIMIDO II por la tarde) se administraron para ensayar a 50 sujetos femeninos para determinar los efectos sobre la densidad dérmica, la firmeza y la presencia de líneas finas y arrugas de la piel. El ensayo se completó después de 6 meses. Los sujetos de ensayo que no estaban en el grupo de control, que consumían comprimidos de placebo, consumían dos (2) comprimidos del material de ensayo del Comprimido 1 y dos (2) comprimidos del material de ensayo del Comprimido 2 diariamente con las comidas. Un total de 38 sujetos completaron el estudio con comprimidos activos y 43 con comprimidos de placebo.

Eran aplicables los siguientes criterios de inclusión: (i) 45-65 años (uno a cinco años post-menopausia —el 70% de los sujetos no usaban HRT y el 30% de los sujetos usaban HRT mínimo 3 meses antes del comienzo del estudio), (ii) Tipos de piel I-III (Fitzpatrick; incorporados Fitzpatrick II-III y Glogau II-III), (iii) Signos de envejecimiento de moderados a avanzados (Glogau II-III), (iv) Daños causados por la luz solar en el dorso de las manos.

Clasificación clínica de los resultados:

El investigador examinó a los sujetos en localizaciones específicas en la parte derecha o izquierda de la cara, el dorso de la mano izquierda o derecha y en el escote (pecho) para los parámetros de envejecimiento cutáneo siguientes:

- Cara:
 - Arrugas (frente)
 - Arrugas finas (área periocular)
 - Espereza/Sequedad táctil
 - Arrugas finas (área perioral/líneas de los labios)
 - Hiperpigmentación con manchas
 - Laxitud (evaluada por elevación vertical de la piel con los dedos)
 - Formación de huecos (caída visual de la piel alrededor del área de la boca)

- Ojeras
- Telangiectasia
- Aspecto facial global

5 • Mano:

- Piel ajada
- Adelgazamiento
- Hiperpigmentación con manchas

10

• Escote:

- Piel ajada
- Hiperpigmentación con manchas
- Aspecto global

15

Los resultados de la clasificación clínica se registraron usando la escala siguiente:

- 20
- 0 < 3 Ligero
 - 3 < 6 Moderado
 - 6 < 9 Grave

Se realizó una comparación entre el comprimido activo y el placebo. Los parámetros indicados con un asterisco indican cuándo el comprimido activo se comportaba significativamente mejor que el placebo ($p < 0,05$). Una disminución en el valor (unidades arbitrarias) indica una mejora.

25

Clasificación clínica de los resultados

Cambios en la clasificación clínica desde el nivel basal hasta el mes 6	Comprimido activo (n = 38)	Placebo (n = 43)
Cara, arrugas de la frente	-0,387*	-0,167
Cara, arrugas periorcarias	-0,761*	0,477
Cara, arrugas periorales	-0,626*	-0,298
Cara, pigmentación con manchas	-0,718*	-0,33
Cara, laxitud táctil	-0,961*	-0,551
Cara, formación de huecos visual	-0,618*	-0,302
Cara, ojeras	-0,447*	-0,179
Cara, global	-0,813*	-0,377
Manos, piel ajada	-0,908*	-0,519
Escote, aspecto global	-0,421*	-0,67

30 Densidad cutánea con ultrasonido:

Se han usado ultrasonidos durante más de 20 años en la medicina clínica y práctica. Es un medio fiable, no invasivo de medir la densidad dérmica. Las ondas de ultrasonidos se reflejan por los elementos estructurales de la piel, que se muestran como manchas coloreadas en la imagen de ultrasonido. Cuantas más manchas coloreadas, más densa es la estructura de la piel.

35

Se usó una unidad de ultrasonido DUBplus (Taberna, Pro Medicium, AG) para tomar una imagen de exploración B del área de las patas de gallo izquierda o derecha (seleccionada por el examinador). La unidad de ultrasonido DUBplus que tenía un transductor de 20 MHz convencional se usó con una distancia focal de 12 mm y una resolución de 40 dB. Un ajuste de ganancia de 28 db producía la mejor visualización global del espesor total de la piel en los sitios ensayados. Las mediciones se tomaron con la sonda orientada perpendicular al eje del cuerpo en el área de la patas de gallo. Como alternativa, la medición puede realizarse próxima al área glabellar de la frente. Valores de densidad aumentados sugieren un engrosamiento del tejido epidérmico y dérmico y pueden usarse como un indicio de una estructura dérmica mejorada. Se descubrió una mejora significativa ($p < 0,05$) en la densidad dérmica después de 6 meses en el grupo complementado con comprimido activo 5 en comparación con el grupo de placebo.

40

45

Visión de conjunto de los resultados:

Significación estadística después de 6 meses (p < 0,05)	<u>Clasificación Clínica, Comprimidos Activos en Cara frente a placebo</u> Arrugas de la frente p = 0,01 Arrugas periorcarias p = 0,046 Arrugas periorales p = 0,01 Pigmentación con manchas p = 0,002 Laxitud (táctil) p = 0,007 Formación de huecos (visual) p = 0,008 Ojeras p = 0,01 Aspecto global p = 0,0001	<u>Densidad cutánea, exploración por ultrasonido de comprimidos activos frente a placebo</u> Densidad cutánea, p = 0,0001
Significación estadística después de 6 meses	<u>Clasificación clínica, comprimidos activos en la cara frente a placebo</u> <u>Clasificación clínica, comprimidos activos en el cuerpo frente a placebo</u> Escote global p = 0,0003 Piel ajada en las manos p = 0,004	<u>Densidad cutánea, exploración por ultrasonido de comprimidos activos frente a placebo</u>

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición administrada por vía oral para la prevención y tratamiento de afecciones cutáneas en un mamífero, que comprende vitamina E, vitamina C y extracto de té blanco.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además:
 - 10 • Antioxidantes de origen natural extraídos de semilla de uva, tomate, soja y/o manzanilla;
 - un extracto que comprende glicosaminoglicanos;
 - al menos un componente de metal de transición.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que el extracto que comprende glicosaminoglicanos es extracto de cartílago.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el extracto de cartílago comprende sulfato de condroitina, sulfato de queratán, ácido hialurónico, o sulfato de dermatán o mezclas de los mismos.
- 20 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el componente de metal de transición es cinc.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el cinc está en forma de gluconato de cinc.
- 25 7. La composición de la reivindicación 6, que comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. Uso de una composición que comprende:
 - 30 • vitamina E
 - vitamina C
 - extracto de té blanco
- para la preparación de una formulación administrada por vía oral adecuada para tratar de forma preventiva o curativa a individuos que padecen signos cutáneos de envejecimiento.
- 35 9. Uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la composición comprende además extracto de cartílago.
10. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la composición comprende además ingredientes seleccionados independientemente del grupo que consiste en extracto de semilla de uva, gluconato de cinc y extracto de tomate.
- 40 11. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que la composición comprende un jarabe, comprimido, cápsula o alimento o complemento nutricional.
- 45 12. Una composición que comprende:
 - del 0,1 al 60% en peso de vitamina E
 - del 0,2 al 90% en peso de vitamina C
 - del 0,2 al 90% en peso de extracto de té blanco
 - 50 basándose en el peso total de la composición.
13. La composición de la reivindicación 12, que comprende además del 5 al 95% en peso de antioxidantes de origen natural extraídos de semilla de uva, tomate y/o manzanilla, basándose en el peso total de la composición.
- 55 14. La composición de la reivindicación 12 ó 13, que comprende además del 5 al 95% en peso de extracto de soja basándose en el peso total de la composición.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que la vitamina E constituye del 0,5 al 20% en peso del peso total de la composición.
- 60 16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que la vitamina C constituye del 1 al 30% en peso del peso total de la composición.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en la que la vitamina E constituye del 1 al 10% en peso del peso total de la composición.
- 65

18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en la que la vitamina C constituye del 1 al 15% en peso del peso total de la composición.

5 19. Una composición farmacéutica que puede obtenerse mediante la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.

20. Un comprimido que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 19, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 21. Una formulación de comprimido que comprende:

- Vitamina C,
- Vitamina E,
- Extracto de té blanco,
- 15 • Extracto de soja,
- Extracto de cartílago,
- Extracto de semilla de uva,
- Extracto de tomate,
- Gluconato de cinc y
- 20 • Excipientes farmacéuticamente aceptables.

22. La formulación de comprimido de la reivindicación 21, que comprende además extracto de manzanilla.

FIGURA 1

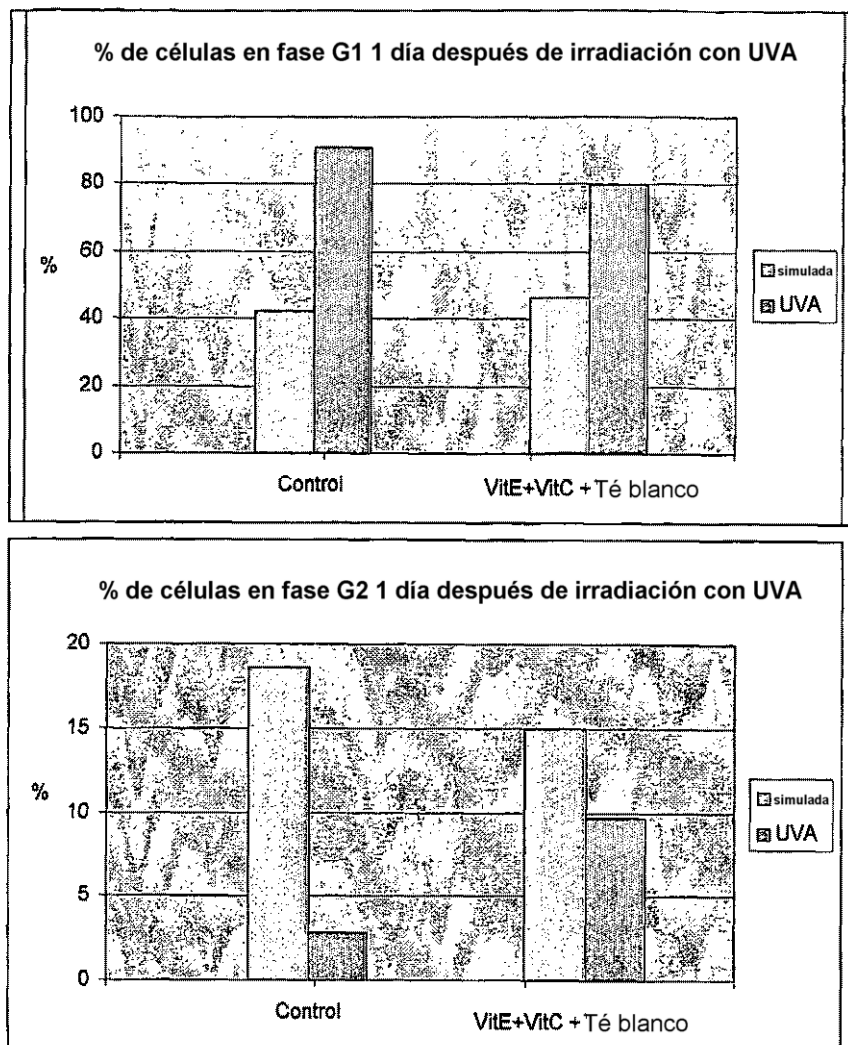


FIGURA 2

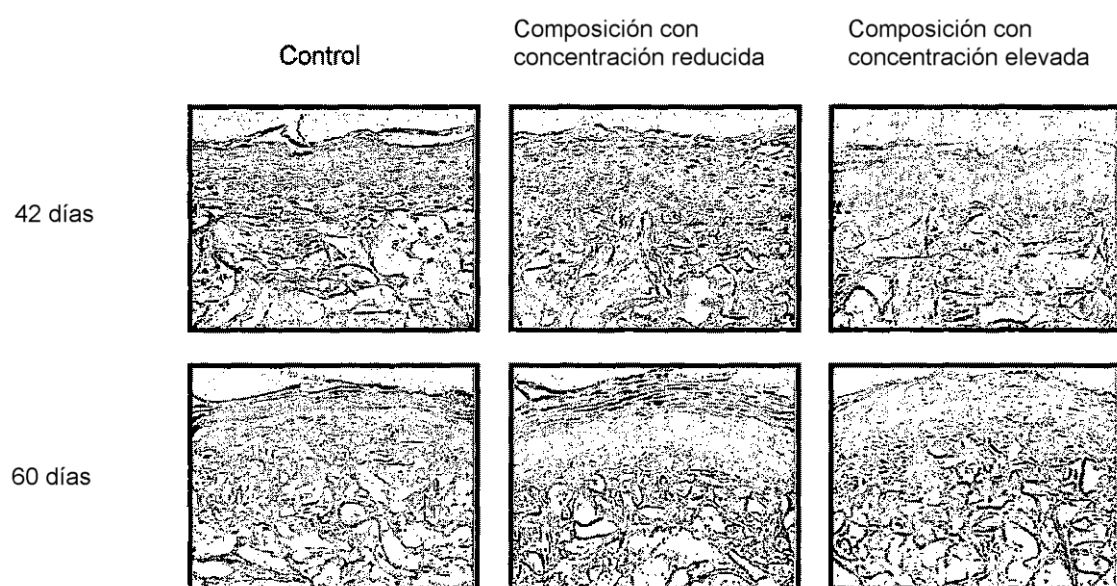


FIGURA 3

