



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 057**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 8/44 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731208 .0**

96 Fecha de presentación : **27.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2018149**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2009**

54

Título: **Principio activo cosmético compuesto por ferulato de arginina y por un extracto de microalga.**

30

Prioridad: **27.03.2006 FR 06 02628**

73

Titular/es: **BIOTECHMARINE SOCIETE PAR
ACTIONS SIMPLIFIEE
Zi de Quemper-Guezennec
22260 Pontrieux, FR**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

72

Inventor/es: **Mekideche, Nicole**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

74

Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 366 057 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

[0001] La invención se refiere a un principio cosmético activo original compuesto por un extracto de microalgas y de ferulato de arginina, sus usos para activar el proteosoma y la producción de tioredoxina, una composición cosmética que lo contiene y el uso de esta composición cosmética para luchar contra el envejecimiento cutáneo.

5 **[0002]** El declive progresivo e irreversible de las diferentes funciones fisiológicas del organismo, denominado envejecimiento, es un proceso complejo bajo el control de diversos factores genéticos, pero también ligado a las influencias del medio externo.

10 **[0003]** Clínicamente, los signos del envejecimiento se traducen en la aparición de arrugas y patas de gallo, en un relajamiento de los tejidos cutáneos y subcutáneos, en una pérdida de la elasticidad cutánea, en una atonía de la textura de la piel y en el amarillamiento de la piel, que se vuelve más apagada y sin brillo.

15 **[0004]** Algunos de estos signos están ligados más en particular al envejecimiento intrínseco o fisiológico, es decir al envejecimiento ligado a la edad, mientras que otros son más específicos del envejecimiento extrínseco, es decir del envejecimiento provocado de una manera general por el medioambiente (contaminación de diversa índole: gases de tubos de escape, humo de cigarrillos, humos de fábricas, productos químicos...); se trata más en particular del fotoenvejecimiento causado por la exposición al sol, a la luz o a cualquier otro tipo de radiación.

20 Los cambios de la piel derivados del envejecimiento intrínseco o fisiológico son la consecuencia de una senescencia genéticamente programada en la que intervienen algunos factores endógenos. Con el paso de los años, la piel pierde su elasticidad ya que la dermis produce cada vez menos fibras de colágeno y de elastina. De ahí el debilitamiento progresivo del tejido conjuntivo y el relajamiento de la piel. La capacidad de renovación de la epidermis también tiende a disminuir, esta se vuelve más seca y más fina ya que su metabolismo se altera. Uno de los factores endógenos del envejecimiento es la disminución de la producción hormonal que implica la disminución progresiva de las funciones tisulares, celulares y orgánicas. Las hormonas como la hormona del crecimiento (HGH), la testosterona, la DHEA y la melatonina se producen en grandes cantidades hasta los 20 años de edad y favorecen la renovación celular.

25 **[0005]** Por el contrario, el envejecimiento extrínseco implica unos cambios histopatológicos, como la excesiva acumulación de material elástico en la dermis superior y la degeneración de las fibras de colágeno.

30 **[0006]** Uno de los mecanismos del envejecimiento es la sobreproducción de radicales libres que tienen como blancos los diferentes componentes de la célula: proteínas, lípidos, azúcares y el ADN. Algunas influencias externas los llevan a entrar en reacción ya que buscan de forma constante otras moléculas con las que poder unirse. Estos atacan entonces las fibras de colágeno, las membranas celulares y la capa de grasa de la piel. Alteran el patrimonio genético de las células, de tal forma que la calidad de las nuevas células de la piel se reduce.

35 **[0007]** El cuerpo se protege contra sus agresores mediante sistemas enzimáticos que se oponen a estas reacciones de oxidación (antioxidantes). Pero a partir de los veinte años de edad, los mecanismos de defensa naturales se debilitan de forma progresiva, de tal forma que la piel ya no puede defenderse sola.

La acumulación de proteínas dañadas constituye una de las características del envejecimiento celular.

40 La acumulación de proteínas dañadas con la edad plantea, por lo tanto, el problema de la eficacia de los sistemas proteolíticos que se encargan de la eliminación de estas proteínas y en particular la del sistema proteosómico, implicado no solo en la eliminación de las proteínas alteradas, en particular oxidadas, sino también en la renovación continua de las proteínas intracelulares.

45 Ya en 1956, Harman, en « Free radical theory of aging », proponía que los daños de los diferentes componentes celulares, provocados por las especies reactivas del oxígeno, representan un factor importante en el proceso de envejecimiento. El envejecimiento celular dependería, por lo tanto, de la producción de especies reactivas del oxígeno, de las defensas antioxidantes y de la eficacia de los sistemas responsables de la eliminación de los componentes celulares dañados.

Las proteínas dañadas pueden o bien repararse, o bien degradarse, según el tipo de alteración (véase la figura 1).

50 Los únicos mecanismos de reparación conocidos son el sistema tioredoxina (T)-tioredoxina reductasa (TR) capaz de reducir los puentes disulfuro y el péptido metionina sulfóxido reductasa que permite reducir la metionina sulfóxido (producto de la oxidación de la metionina).

Se ha demostrado, en el pasado, que la tioredoxina protege frente a los daños de la piel producidos por las radiaciones UVB. En unas condiciones normales, la TR reduce la tioredoxina oxidada en presencia de NADPH. La tioredoxina reducida sirve de donador de electrón a la tioredoxina peroxidasa que, en consecuencia, reduce el H₂O₂ a H₂O. La TR es un potente antioxidante frente a los daños de los radicales libres.

[0008] Se ha demostrado la presencia en la piel humana de TR integrada en la membrana y en el citosol.

55 Se ha demostrado que, en los fibroblastos de la piel humana irradiados por las radiaciones UVA, la tioredoxina impide la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, el agotamiento del contenido en ATP celular y la pérdida de la viabilidad celular debidos a la radiación (Didier y otros, Free radical Biology and Medicine, vol. 31, nº 5, pp. 585-598, 2001).

También se ha demostrado que bajo unas condiciones de estrés oxidativo provocado por las radiaciones UVA, la tioredoxina impide el deterioro del ADN inducido por las radiaciones UVA (Didier y otros, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 30, nº 5, pp. 537-546, 2001). La tioredoxina también es, por lo tanto, importante para el mantenimiento de la integridad del genoma.

5 **[0009]** La eliminación de los demás tipos de daños se realiza por medio de la degradación intracelular de las proteínas que depende del proteosoma.

El sistema proteosómico está formado por un complejo catalítico, el proteosoma 20S, y por varios compuestos reguladores que influyen en su actividad y su especificidad. El proteosoma en las células de los mamíferos se localiza al mismo tiempo en el citosol y en el núcleo. El proteosoma 20S está compuesto por 14 subunidades diferentes codificadas por unos genes o bien de tipo α , o bien de tipo β , y ordenadas en un apilamiento cilíndrico de

10 4 anillos de 7 subunidades. Existen diferentes subunidades proteosómicas (20S, 19S, 26S y PA28, por ejemplo) que funcionan solas o asociándose entre sí de acuerdo con el metabolismo celular. De hecho, pueden tratarse o bien de subunidades de proteosomas, o bien de proteosomas como tales, cuya clase depende del metabolismo celular.

Este complejo proteolítico, denominado proteosoma, escinde de forma preferente las proteínas al nivel del extremo carboxilo-terminal de los residuos básicos, hidrófobos y ácidos. Estas actividades peptidasa se realizan mediante 3

15 subunidades β diferentes y están localizadas en el interior de la estructura. La asociación del regulador 19S con el proteosoma 20S forma el proteosoma 26S que garantiza la degradación de las proteínas ubiquitinizadas.

Con la edad, se asiste a una acumulación de proteínas dañadas, fenómeno que parece deberse a una posible reducción de la eficiencia del sistema proteosómico.

En particular, se ha demostrado, por una parte, un aumento ligado a la edad del contenido en carbonilo de las proteínas en las biopsias de epidermis, así como en los queratinocitos en cultivo y, por otra parte, una modificación mediante unos aductos derivados de los carbohidratos y de los lípidos de las proteínas portadoras de grupos carbonilos. El aumento de la cantidad de proteínas oxidadas con la edad vendría acompañado de una disminución

25 de la actividad del proteosoma debido a la disminución de la cantidad de proteosoma (Petropoulos y otros, *J. Gerontol. a Biol. Sci.*, 2000, 55A, B220-7). Dos estudios recientes, uno acerca del envejecimiento postmitótico de células musculares del esqueleto de ratas y el otro acerca de los fibroplastos humanos, en el que se ha estudiado la expresión de 6.000 genes mediante microarrays, han demostrado una variación de la expresión de menos de un 1 % de los genes a lo largo del envejecimiento celular, entre los que se encuentran los genes del sistema proteosómico cuya expresión se reducía

30 (Lee y otros, *Science* 1999; 285 ; 1.390-3 y Ly y otros, *Science* 2000; 287; 2.486-92). También se ha demostrado una disminución de la expresión de las transcripciones para las 3 subunidades analizadas del proteosoma (X, N3 y C2) dentro de las células de donantes de edad avanzada mientras que las células en cultivo de cuatro centenarios conservan un nivel de expresión y de actividad del proteosoma próximo al de los donantes jóvenes (Chondrogianni y otros, *Exp. Gerontol.*, 2000; 35; 721-8).

35 **[0010]** El conjunto de estos resultados indica de forma clara que se produce una disminución de la actividad del proteosoma con la edad.

Otra categoría de proteínas « modificadas » también está implicada en el mecanismo de envejecimiento. Se trata de proteínas denominadas « glicadas ». La glicación es una modificación post-traducciona de las proteínas que se inicia mediante la condensación de azúcares reductores con unos grupos de tipo « amino » por medio de la reacción de Maillard. De los productos que se obtienen se dice de forma habitual que son productos terminales de glicación (PTG). Los dos principales productos de glicación, la carboximetilisina (CML) y la pentosidina se acumulan a lo largo del envejecimiento y de forma acelerada en algunas patologías como la diabetes.

40 **[0011]** Se conoce la toxicidad de los productos glicados. Se puede citar a título de ejemplo sus efectos perjudiciales, como la alteración de actividades enzimáticas, la reticulación de las proteínas y la formación de agregados, la alteración de la superficie entre endotelio y membrana basal, la reducción de la susceptibilidad a la proteólisis, el no-reconocimiento de las señales moleculares y de la endocitosis, y la modificación de la inmunogenicidad.

[0012] La glicación de las proteínas favorece su oxidabilidad, las proteínas glicadas pudiendo reaccionar con el oxígeno para formar unos radicales libres oxigenados cuyos dañinos efectos se han indicado con anterioridad.

50 **[0013]** Estas proteínas glicadas no pueden ni destruirse ni liberarse de la célula en la que se acumulan y se muestran resistentes a la degradación por el proteosoma. La glicación tiene unas consecuencias en todo el organismo y desempeña en particular un papel importante en el origen de algunas enfermedades provocando lesiones celulares, tisulares, y un envejecimiento acelerado de los tejidos.

[0014] Es, por lo tanto, necesario desarrollar unos principios activos para evitar una glicación de las proteínas y su acumulación en el sistema celular.

55 De una forma general, resulta de un interés especialmente importante tener acceso a unas preparaciones de uso tópico que permitirían retrasar el envejecimiento cutáneo, en particular mediante la mejora de la actividad del

proteosoma y mediante la reducción del número de proteínas glicadas.

La solicitud de patente FR 2 822 701 describe la utilización de un extracto de alga *Phaeodactylum* (microalga) como agente cosmético que favorece la actividad del proteosoma y para la fabricación de una composición cosmética que protege la piel contra los nocivos efectos de la exposición a las radiaciones UV o para prevenir y/o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo.

La solicitud de patente EP 0 629 397 A1 describe una composición cosmética antirradicales libres y antiinflamatoria que comprende un extracto hidroglicólico de algas *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina* (ARL) y un extracto de café verde.

[0015] La solicitud de patente FR 2 792 832 describe unas composiciones cosméticas que contienen proteínas de choque térmico aisladas de microalgas *Chlorella* para combatir el envejecimiento celular de la piel.

[0016] También se conocen unas composiciones cosméticas que contienen ácido ferúlico como agente fotoprotector (JP-A-04266807, C. V. Mosby, J. of the Am. Academy of Dermatology 2005; 52(3); p. 160).

[0017] Teniendo en cuenta lo anterior, la solicitante ha desarrollado un principio activo que es el resultado de una combinación sinérgica de componentes que responden a un triple objetivo. El primer objetivo responde a la necesidad de mejorar la actividad del proteosoma con el fin de favorecer la eliminación de proteínas que dependen de este. El segundo responde al de estimular de manera sinérgica la producción de tioredoxina. Por último, el tercer objetivo responde a la necesidad de reducir de forma sensible la producción de proteínas glicadas y, en consecuencia, su acumulación en las células.

La solicitante ha descubierto de forma sorprendente un nuevo principio activo cosmético compuesto por ferulato de arginina y por un extracto de microalga, el cual activa el proteosoma y la producción de tioredoxina, evitando al mismo tiempo la glicación de las proteínas.

Unas nuevas preparaciones cosméticas de uso tópico que comprenden este principio activo también forman parte de la invención y se pueden utilizar para ralentizar el envejecimiento cutáneo.

[0018] El objeto principal de la presente invención es un principio activo cosmético compuesto por ferulato de arginina y por un extracto de microalga.

Se entiende por « microalga » un alga microscópica unicelular o pluricelular indiferenciada, por oposición a una « macroalga » cuyo ciclo de vida consta de unas fases diferenciadas.

[0019] Por « extracto de microalga » se entiende cualquier extracto celular procedente de una microalga y susceptible de utilizarse en el principio activo cosmético de la invención. Un extracto de este tipo puede ser, por ejemplo, un extracto intracelular, de las membranas o lipídico.

La planta de microalga se pone en cultivo en un medio de cultivo clásico que contiene unos oligoelementos, como, por ejemplo, el manganeso, el cobre, el silicio, el boro, el azufre, proteínas hidrolizadas, todo con un pH que se encuentra entre 7 y 8, y a una temperatura que favorece su crecimiento, habitualmente comprendida entre 25 y 30 °C. Cuando el crecimiento es óptimo, es decir, cuando el número de células no va a crecer más en el medio de cultivo, se recupera el medio de cultivo y se centrifuga. En caso necesario, a continuación se hace que este cultivo centrifugado experimente un estrés oxidativo mediante la adición de entre 1 y 5 ml de agua oxigenada por litro de medio (H₂O₂) o mediante el ozono, que se genera por medio de un generador de ozono mediante la reacción del aire con las radiaciones UV. A continuación la biomasa que se obtiene de este modo se centrifuga de nuevo y se recupera el residuo.

El ferulato de arginina es una molécula de síntesis derivada de la arginina. Su procedimiento de fabricación se detalla en el ejemplo 1.

[0020] La solicitante ha encontrado, por lo tanto, de forma sorprendente que se puede, mediante una combinación de compuestos de este tipo, mejorar la actividad del proteosoma con el fin de favorecer la eliminación de proteínas que dependen de este, estimulando al mismo tiempo de manera sinérgica la producción de tioredoxina. Esta mejora es mucho mayor que con el extracto de microalga solo.

Además, el principio activo cosmético de la invención permite reducir sensiblemente la producción de proteínas glicadas y, en consecuencia, su acumulación en las células. Por otra parte, la disminución de las proteínas glicadas engendra también una mejora de la actividad del proteosoma que conduce a una eliminación significativamente más elevada de las proteínas dañadas.

La solicitante ha observado que se puede obtener una disminución del 50 % de las proteínas glicadas mediante el tratamiento de células con entre un 0,005 % y un 0,02 % de ferulato de arginina. Este contenido constituye el necesario para inhibir el 50 % de la formación de proteínas glicadas en las células.

[0021] Se muestra, en efecto, que el principio activo presenta en particular la ventaja de asociar el extracto de alga y el ferulato de arginina que, cuando se pone en contacto con la piel, se disocia en arginina y en ácido ferúlico gracias a los sistemas enzimáticos de la piel.

La L-arginina, ácido aminado básico, tiene un efecto regenerador sobre las células de la piel, evitando la glicación de las proteínas, pero presenta, no obstante, el inconveniente de ser inestable en contacto con el oxígeno del aire, por

ejemplo, y se degrada en productos citotóxicos. El ácido ferúlico es, por su parte, un agente antioxidante capaz de absorber las radiaciones UV. La solicitante ha demostrado, por lo tanto, que el compuesto ferulato de arginina (o compuesto ácido ferúlico/arginina) aumenta la estabilidad de la arginina formada y mejora, por esta razón, la actividad de esta arginina. Un compuesto ferulato de arginina de este tipo conduce, por lo tanto, en particular a una biodisponibilidad tisular incrementada de la arginina, en concreto al aplicarse directamente sobre la piel.

[0022] La mejora de la actividad del proteosoma mediante el principio activo de la invención, con respecto a la que se obtiene solo con el extracto de microalga, se observa en la disminución de la tasa de proteínas oxidadas no hidrolizadas presentes en las células, como las células de la piel humana o animal, por ejemplo de tipo queratinocitos, fibroplastos o melanocitos. Esta disminución se sitúa de forma habitual en el intervalo de valores comprendido entre el 10 y el 25 %.

[0023] Por otra parte, la presencia de ferulato de arginina, en asociación con el extracto de microalga, de preferencia enriquecido en fitoalexinas (véase a continuación), conduce a una producción incrementada de tiorredoxina en las células, con respecto al extracto de microalga solo.

De este modo, a título de ejemplo, la utilización de cantidades crecientes de ferulato de arginina comprendidas entre un 0,005 % y un 0,1 % en peso del producto en el que está contenido, de preferencia entre un 0,005 % y un 0,05 %, en concreto entre un 0,005 % y un 0,02 %, el extracto de microalga estando comprendido entre un 0,995 % y un 0,90 %, de preferencia entre un 0,995 % y un 0,95 %, en concreto entre un 0,995 % y un 0,98 %, ha permitido demostrar que se puede obtener un incremento de alrededor de entre un 4 y un 20 %, de preferencia entre un 4 y un 10 %, en concreto entre un 4 y un 8 %, de la producción de tiorredoxina con respecto al extracto de microalga solo contenido en el mismo producto de acuerdo con los valores en peso ya citados. Esto constituye una ventaja decisiva de la invención. Por ejemplo, se entiende por « producto en el que está contenido » una composición cosmética tal y como la que se define a continuación.

[0024] En un modo de realización particular de la invención el extracto de microalga del principio activo de acuerdo con la invención se enriquece con fitoalexinas, por ejemplo colocando a las microalgas en una situación de estrés, de preferencia una situación de estrés oxidativo mediante H₂O₂ o mediante el ozono, tal y como se ha indicado con anterioridad.

Las fitoalexinas son unos compuestos denominados « de defensa » que sintetizan los vegetales y, en concreto las microalgas, cuando estas se encuentran en unas condiciones de estrés y, de preferencia, en unas condiciones de estrés oxidativo. Estas fitoalexinas pueden ser de diferente clase: antibiótica, enzimática, fenólica. En el presente caso, se trata de sistemas enzimáticos, como, por ejemplo, la ferredoxina-NADP⁺ óxidoreductasa (FNR), la superóxido dismutasa (SOD) y las glutatión peroxidadas.

En un modo de realización preferente de la invención el extracto de microalga del principio activo de acuerdo con la invención procede de una microalga de la clase de las clorofíceas. Se trata de algas verdes que se encuentran en los lagos y estanques que contienen una gran cantidad de clorofila. De manera particularmente preferente, la microalga utilizada pertenece al género *Scenedesmus*, que es un alga de agua dulce y del género *tetracystis*.

El principio activo de acuerdo con la invención presenta de preferencia un coeficiente en peso de ferulato de arginina:extracto de microalgas comprendido entre 1:1 y 1:199, de preferencia entre 1:19 y 1:99, de forma muy preferente entre 1:30 y 1:50, y, de manera particularmente preferente, de 1:19.

Otro objeto de la invención se refiere a la utilización *in vitro* o *ex vivo* de un principio activo de acuerdo con la invención para activar el proteosoma de células, como algunas células de la piel humana o animal, por ejemplo de tipo queratinocitos, fibroblastos o melanocitos. Esta activación se traduce en una degradación incrementada de las proteínas oxidadas en presencia del principio activo de acuerdo con la invención.

Un objeto suplementario de la invención se refiere a la utilización *in vitro* o *ex vivo* de un principio activo de acuerdo con la invención para estimular la producción de tiorredoxina.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un principio activo de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición cosmética de uso tópico.

De forma ventajosa, el principio activo está presente en unas cantidades comprendidas entre un 0,1 % y un 2%, de preferencia entre un 0,5 % y un 2 %, en concreto entre un 1 % y un 2 % en peso con respecto al peso total de la composición cosmética.

A título de ejemplo, este tipo de composiciones cosméticas de uso tópico son soluciones o dispersiones de tipo loción, emulsiones de aceite en agua (Ac/Ag) o de agua en aceite (Ag/Ac), cremas o geles. Estas pueden ser de forma más específica unas composiciones o unas lociones para el cuidado del rostro, del cuerpo y de las manos, cremas de día, protectores solares, leches desmaquillantes, cremas antiarrugas y composiciones para el baño. Además del principio activo de la invención, todas estas composiciones comprenden de forma ventajosa unos ingredientes activos clásicos y unos excipientes convencionales utilizados en las composiciones cosméticas destinadas a la piel. Se pueden citar el linoleato de tocoferol, los emolientes, los perfumes, los conservantes, los colorantes, los agentes emulsionantes, los agentes de textura y, en caso necesario, los filtros solares.

[0025] Un objeto suplementario de la presente invención se refiere a una composición cosmética de uso tópico que comprende el principio activo de acuerdo con la invención en un medio fisiológicamente aceptable, esta composición cosmética pudiendo corresponder, por ejemplo, a una crema, loción, gel o mascarilla, o a otras de las citadas en el párrafo anterior, y la utilización de una composición de este tipo para luchar contra el envejecimiento cutáneo.

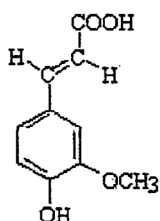
5 Un ejemplo de composición cosmética contiene un 1 % de principio activo cosmético de la invención, un 2 % de glicerina, un 0,80 % de Carbomer, un 2,00 % de sorbitán estearato, un 2,00 % de polisorbato 60, un 8,00 % de octildodenacanol, un 0,80 % de Trisamino® y siendo el resto agua desmineralizada. Los porcentajes se expresan en peso con respecto al peso total de la composición.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

10 **Ejemplo 1: Procedimiento de fabricación del ferulato de arginina**

[0026] El ferulato de arginina se fabrica mediante la mezcla de arginina ($\text{HN} = \text{C}(\text{NH}_2) - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$) y de ácido ferúlico (= ácido 3-metoxi 4-hidroxicinámico).

15



20

25

Ácido ferúlico

[0027] La mezcla íntima de los dos polvos tiene lugar en un mezclador de polvo (Lödige) a 20 giros/minuto durante alrededor de 48 horas.

Ejemplo 2: Cultivo celular

30 **[0028]** Se obtienen unos primocultivos a partir de una biopsia de piel humana seguida por una digestión enzimática de las membranas de las células con el fin de conservar el medio intracelular dentro de un medio de cultivo de KGM (medio de cultivo completo, sin suero, cuya concentración final en calcio es de 0,05 mM) suplementado con EFG (« Epidermal Growth Factor »).

35 Se han estudiado las células después de diferentes pasos (P2, P4, P6 y P8) y tras la irradiación con radiaciones UVB con el objetivo de evaluar la influencia del principio activo de la invención sobre las células senescentes. En el marco de la invención, el término « paso » tiene el significado clásico en el campo de los cultivos celulares. El paso P1 representa el tiempo necesario para que las células del primocultivo alcancen la confluencia. Tras esto, se realiza un trasplante del medio de cultivo P1 que se ha puesto en cultivo, en el medio que se ha definido con anterioridad, durante el tiempo necesario para alcanzar la confluencia definiendo el paso P2, y así sucesivamente, lo que permite definir los pasos P4, P6 y P8.

40 Los ensayos se han realizado con los queratinocitos de un donante de 15 años, que sirve de modelo de referencia para una actividad proteosómica óptima, y los de un donante de 62 años, cuyo sistema proteosómico funciona de manera menos eficaz que en el caso del donante de 15 años. Las células del donante de 15 años se han irradiado con el fin de medir el poder proteosómico y compararlas con las del donante de 62 años. En efecto, una irradiación con radiaciones UVB engendra un deterioro del funcionamiento del sistema proteosómico.

45 **[0029]** Estos queratinocitos se cultivan en el medio KGM suplementado con EGF, que se ha definido con anterioridad, en presencia del principio activo, marcado como « producto B », que está compuesto por:

- un 99,5 % de un extracto de microalga del género *Scenedesmus* habiendo experimentado un estrés oxidativo con H_2O_2 o mediante el ozono, tal y como se ha indicado con anterioridad; y
- 50 - un 0,5 % de ferulato de arginina.

[0030] Estos queratinocitos también se cultivan en presencia del principio activo compuesto por un único producto A que representa un extracto de microalga pura del género *Secenedesmus* habiendo experimentado un estrés oxidativo como el que se ha explicado con anterioridad.

[0031] Los mismos experimentos se realizan en ausencia de producto A o B (muestra denominada « de control »).

55 Se han realizado tres cultivos de queratinocitos en el medio KGM suplementado con EGF:

- Condiciones fisiológicas normales: células en cultivo de un donante con una edad de 15 años.
- Condiciones de senescencia fisiológica celular: células en cultivo de un donante con una edad de 62 años.

- Condiciones de senescencia fotoinducida: células en cultivo de un donante de 15 años de edad irradiadas con radiaciones UVB a razón de entre 100 y 150 mJ/cm² de medio de cultivo. La fuente de las radiaciones UVB se obtiene por medio de la lámpara UV (Biosun, Viber Lourmat - Francia), siendo la longitud de onda de radiación de alrededor de 315 nm.

5 **Ejemplo 3: Medición de la viabilidad celular**

[0032] Las células que se obtienen en las condiciones del ejemplo 2 se estudian en los pasos P2, P4, P6 y P8. Los diferentes pasos permiten constatar el envejecimiento celular del donante, así como el envejecimiento debido a las condiciones de cultivo tras los diferentes pasos celulares. En efecto, tras la toma de muestras de las células de la epidermis, se observa una diferencia en la viabilidad celular desde el momento de la puesta en cultivo (muestra « de control »). Esta diferencia se acentúa después de los diferentes pasos celulares.

10 Las consecuencias de la senescencia celular se han estudiado midiendo la viabilidad celular que se ha evaluado mediante el ensayo de reducción con azul de formazán (MMT). La sal de tetrazolio (MTT) tiene la propiedad de reducirse en cristales azules de formazán mediante el succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células. Esta enzima, que desempeña un papel importante dentro del ciclo de Krebs, cataliza la deshidrogenación del succinato en fumarato.

15 La actividad de esta enzima, una flavoproteína muy estrechamente ligada a la membrana interna mitocondrial, se mide mediante la reducción del MTT. La absorbancia (o densidad óptica) directamente ligada a la actividad de los succinatos deshidrogenasa, ligada a su vez a la viabilidad celular, se mide mediante dosificación espectrofotométrica a 595 nm por medio de un dispositivo clásico, como un espectrofotómetro provisto de un sistema informático de tratamiento de datos. Cuanto más elevado es el valor de la absorbancia, más viables son las células.

20 Se estudian las tres condiciones de cultivo del ejemplo 2.

[0033] Se han retomado los mismos experimentos solo con el producto A, que representa un extracto de microalga pura del género *Scenedesmus* que ha experimentado un estrés oxidativo como el que se ha definido con anterioridad.

25 **Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años)**

[0034]

30

	Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
Viabilidad sin producto A (%)	100	97	93	79	69
Viabilidad con un 1 % de producto A (%)	100	95	94	81	74

35

40

	Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
Viabilidad sin producto B (%)	100	95	91	79	63
Viabilidad con un 1 % de producto B (%)	100	95	94	83	75

45

50

55

Resultados en condiciones de senescencia fisiológica (donante de 62 años)

[0035]

5		Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
	Viabilidad sin producto A (%)	100	84	66	48	41
10	Viabilidad con un 1 % de producto A (%)	100	87	70	51	47

15		Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
	Viabilidad sin producto B (%)	100	88	69	56	51
20	Viabilidad con un 1 % de producto B (%)	100	93	77	71	61

Resultados en condiciones de senescencia fotoinducida (donante de 15 años + radiaciones UVB 100 mJ/cm² de cultivo)

[0036]

25		Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
	Viabilidad sin producto A (%)	100	74	62	48	33
30	Viabilidad con un 1 % de producto A (%)	100	81	68	57	45

35		Muestra de control (% V)	P2 (% V)	P4 (% V)	P6 (% V)	P8 (% V)
	Viabilidad sin producto B (%)	100	86	78	59	48
40	Viabilidad con un 1 % de producto B (%)	100	93	81	66	54

% V: % de viabilidad.

45 % en producto A y B: contenido en producto A o B por 100 g de medio de cultivo.

[0037] Los resultados muestran que a lo largo de los diferentes pasos la viabilidad celular se reduce, y esto de forma más rápida en el caso del donante de 62 años que en del donante de 15 años.

50 Por otra parte, la disminución de la viabilidad celular consecutiva a la irradiación con las radiaciones UVB de células procedentes de un donante de 15 años es comparable a la disminución fisiológica en el caso del donante de 62 años.

La viabilidad de las células tratadas con el producto B es significativamente más elevada que la de las células tratadas con el producto A, y esto con independencia de las condiciones de envejecimiento:

- 55
- se trate de un envejecimiento celular que se produce a lo largo del cultivo (donante de 15 años);
 - se trate de un envejecimiento celular que depende del estado inicial de las células y que continúa a lo largo del cultivo (donante de 62 años);

- se trate de un envejecimiento celular fotoinducido.

Ejemplo 4: Purificación de las tres subunidades del proteosoma, respectivamente 20S, 26S y PA28

[0038] En el marco de este ejemplo, los proteosomas 20S, 26S y PA28 representan unas subunidades.

[0039] Unos extractos de células cultivadas en el medio definido con anterioridad de acuerdo con el ejemplo 2, en las dos condiciones fisiológicas, las cuales corresponden a unas células fisiológicas normales (donante de 15 años) y a unas células normales senescentes (donante de 62 años) se centrifugan a 10.000 g durante 16 horas a 4 °C.

El residuo se disuelve en un tampón Tris-HCl (25 mM, pH 7,5), a continuación se deposita en una columna CNBr Sefarosa (en la que se injerta un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad del proteosoma humano que hay que purificar) previamente equilibrado con el tampón Tris-HCl (25 mM, pH 7,5). La columna se lava seguidamente con el mismo tampón y a continuación se eluye la subunidad del proteosoma mediante Tris-HCl conteniendo NaCl 2M (pH 8) y se dializa durante 16 horas a 4 °C (o se deposita en una columna de filtración sobre gel (PD10 Sephadex)).

Una muestra de la subunidad de proteosoma purificado se mezcla con tampón de carga desnaturador (SDS 0,1 %) y a continuación se incuba a 100 °C durante 5 minutos. Las proteínas que contiene el eluido se separan mediante electroforesis en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 12 %. La migración se realiza a temperatura ambiente con una tensión constante de 80 V durante 30 minutos, después a 120 V durante 2 horas.

Ejemplo 5: Medición de la actividad del proteosoma mediante medición de la actividad de las tres subunidades del proteosoma (20S, 26S, PA28) en las tres condiciones de cultivo del ejemplo 2

[0040] Las actividades peptidásicas del proteosoma se han medido mediante la utilización de un sustrato formado por unos péptidos sintéticos cuyos extremos N-terminales están bloqueados y cuyos extremos C-terminales están unidos mediante un enlace isopeptídico a un radical fluorescente: la 7-amido-4-metil-cumarina (MCA). Estos radicales no fluorescentes, cuando están unidos a los péptidos, se vuelven fluorescentes en estado libre tras la separación proteolítica. La mezcla, que contiene o bien 50 µg de homogeneizado bruto de proteínas totales, que representa el residuo del ejemplo 4, o bien 3 µg de proteosoma purificado (en Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) se incuba a 37 °C con el sustrato peptídico en un volumen final de 200 µl durante 30 minutos.

La reacción se para mediante la adición de 300 µl de un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, o de etanol. Tras la adición de 2 ml de agua destilada, la fluorescencia se mide por medio de un lector de microplacas a la venta en comercios, con unas longitudes de ondas de excitación y de emisión entre 350 y 440 nm para las MCA. Las actividades del proteosoma se determinan como la diferencia entre la actividad total, es decir la medida al comienzo del experimento, antes de la adición del sustrato, y la actividad restante del extracto bruto, es decir, después de haber hecho reaccionar al sustrato y tras la purificación.

Las actividades se expresan en ng de proteosoma/min/mg de proteínas totales presentes en el extracto celular.

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años, paso P2)

[0041]

	Proteosoma 20S (nmoles/min/mg)	Proteosoma 26S (nmoles/min/mg)	Complejo proteosoma PA28 (nmoles/min/mg)
Sustrato	10,5 ± 0,5	74,2 ± 2,5	345,0 ± 25,2
Sustrato + 0,1 % de producto B	9,1 ± 0,4	75,8 ± 5,1	361,2 ± 21,7
Sustrato + 0,5 % de producto B	12,0 ± 1,8	83,2 ± 7,8	362,5 ± 10,2
Sustrato + 1 % de producto B	11,8 ± 1,2	87,2 ± 10,2	370,5 ± 24,3

Resultados en condiciones de senescencia fisiológica (donante de 62 años)

[0042]

	Proteosoma 20S (nmoles/min/mg)	Proteosoma 26S (nmoles/min/mg)	Complejo proteosoma PA28 (nmoles/min/mg)
Sustrato	7,3 ± 0,7	52,7 ± 4,0	180,2 ± 18,1
Sustrato + 0,1 % de producto B	8,4 ± 0,3	63,0 ± 4,2	198,0 ± 10,5
Sustrato + 0,5 % de producto B	9,6 ± 1,4	69,4 ± 5,6	228,6 ± 13,1
Sustrato + 1 % de producto B	12,0 ± 1,1	76,2 ± 2,3	264,2 ± 18,4

Resultados en condiciones de senescencia fotoinducida (donante de 15 años, radiaciones UVB 100 mJ/cm²)

[0043]

	Proteosoma 20S (nmoles/min/mg)	Proteosoma 26S (nmoles/min/mg)	Complejo proteosoma PA28 (nmoles/min/mg)
Sustrato	6,2 ± 0,4	54,8 ± 7,2	195,7 ± 21,2
Sustrato + 0,1 % de producto B	8,5 ± 1,1	63,7 ± 2,4	227,1 ± 17,4
Sustrato + 0,5 % de producto B	11,4 ± 1,7	70,2 ± 3,5	244,3 ± 13,6
Sustrato + 1 % de producto B	12,1 ± 1,4	81,2 ± 8,2	269,3 ± 11,8

[0044] Los resultados muestran una actividad superior de las tres subunidades del proteosoma en las condiciones fisiológicas normales con respecto a las condiciones de senescencia fisiológica y fotoinducida.

El tratamiento de las células con el producto B implica un restablecimiento de la actividad de las tres subunidades del proteosoma en las condiciones de senescencia. La actividad se restaura para alcanzar de forma global el nivel de la que se ha medido en unas condiciones fisiológicas no senescentes.

[0045] Los resultados se presentan en particular en las figuras 2, 3 y 4, las cuales representan:

Figura 2: donante de 15 años de edad.

Figura 3: donante de 62 años de edad.

Figura 4: donante de 15 años de edad + condiciones de senescencia fotoinducida (radiaciones UVB).

Estas tres figuras representan la medición de la fluorescencia de una muestra en función de las fracciones de purificación recolectadas.

Ejemplo 6: Medición de la actividad del proteosoma mediante dosificación de la cantidad de proteínas oxidadas no hidrolizadas en las tres condiciones de cultivo del ejemplo 2

[0046] La detección de las proteínas oxidadas se ha realizado utilizando el kit Oxyblot® (Oxydised Protection Detection Kit, Chemicon International). Los extractos citosólicos de queratinocitas, es decir, los extractos intracelulares que se obtienen tras la digestión enzimática, definidos de acuerdo con el ejemplo 2, en presencia del producto B, se tratan durante 15 minutos con 2,4-dinitrofenilhidrazina, a continuación se separan mediante electroforesis sobre un gel de acrilamida al 12 % (SDS-PAGE) a razón de 10 µg de proteínas depositadas por pocillo. Los geles se transfieren a continuación sobre una membrana de nitrocelulosa (Nitrocelulosa Hybond). Las hidrazonas formadas se inmunodetectan por medio de anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el radical 2,4-dinitrofenilo (Sigma, Ref. D-9656). Con el fin de detectar las proteínas ubiquitinizadas o modificadas por el aducto 4-hidroxi-2-nonenal, se depositan 20 µg de proteínas sobre un gel de poli-acrilamida al 12 % y los Western blots correspondientes se revelan utilizando unos anticuerpos policlonales dirigidos contra la ubiquitina. La detección de unos complejos antígenos-anticuerpos se realiza con unos anticuerpos secundarios de conejo acoplados a la peroxidasa.

Se han realizado los mismos experimentos con el producto A que se ha definido con anterioridad.

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años)

[0047]

	Cantidad (unidad/mm ²)	Cantidad en presencia de un 1 % de producto A (unidad/mm ²)
Muestra de control (P1)	22 ± 1,1	15 ± 2,0
P2	26 ± 1,4	21 ± 1,4
P4	37 ± 2,8	29 ± 3,2
P6	51 ± 4,1	41 ± 4,2
P8	64 ± 4,0	55 ± 6,0

	Cantidad (unidad/mm ²)	Cantidad en presencia de un 1 % de producto B (unidad/mm ²)
Muestra de control (P1)	18 ± 2,0	12 ± 0,6
P2	21 ± 1,5	17 ± 1,2
P4	31 ± 4,2	27 ± 1,7
P6	45 ± 3,4	36 ± 2,4
P8	57 ± 4,0	45 ± 3,2

Resultados en condiciones de senescencia fisiológica (donante de 62 años)

[0048]

	Cantidad (unidad/mm ²)	Cantidad en presencia de un 1 % de producto A (unidad/mm ²)
Muestra de control (P1)	100 ± 7,6	90 ± 10,2
P2	131 ± 15,2	113 ± 7,8
P4	183 ± 13,7	151 ± 10,0
P6	251 ± 21,1	205 ± 13,7
P8	375 ± 12,3	321 ± 15,2

	Cantidad (unidad/mm ²)	Cantidad en presencia de un 1 % de producto B (unidad/mm ²)
Muestra de control (P1)	90 ± 10,7	79 ± 4,2
P2	123 ± 11,2	95 ± 10,2
P4	170 ± 9,7	134 ± 8,4
P6	233 ± 14,6	187 ± 11,1
P8	349 ± 21,2	285 ± 13,2

mm²: mm² de medio de cultivo.

[0049] Los resultados muestran que el producto B implica una clara disminución de la cantidad de proteínas oxidadas tanto en el caso del donante de 15 años que en el caso del donante de 62 años. El efecto es más marcado en el caso de los experimentos que se realizan con el producto B. Se puede estimar en alrededor de entre un 12 % y un 15 % la reducción de la cantidad de estas proteínas con respecto al caso en el que solo se utiliza el producto A.

Ejemplo 7: Medición de la actividad de la tiorredoxina reductasa (TrxR)

[0050] La actividad de la TrxR en los extractos celulares de células cultivadas de acuerdo con el ejemplo 2, tratadas o no tratadas (muestra de control) con el producto B, se determina mediante la medición de la concentración en TrxR por el método Biuret tras la reacción con tiorredoxina (Trx) y mediante comparación con la actividad conocida de una TrxR purificada.

Un volumen correspondiente a 50 µg de proteínas de cada extracto celular se incubaba con una mezcla HEPES, 80 mM, pH 7,5, 0,9 mg/ml de NADPH, EDTA 6 mM, 2 mg/ml de insulina y 10 µM de Trx de *E. coli*, a 37 °C durante 20 minutos en un volumen final de 120 µl. La reacción se para con la adición de 500 µl de DTNB (ácido ditiobis-nitrobenzoico) (0,4 mg/ml) en clorhidrato de guanidina 6 M/Tris-Cl 0,2 M (pH 8,0). Una muestra de control que contiene todo salvo la Trx se incubaba y se trata de la misma forma que el resto de las muestras.

Se mide la absorbancia a 412 nm y el valor de la muestra de control se resta del valor de la absorbancia correspondiente de la muestra.

Se prepara una curva estándar utilizando la TrxR purificada de timo de ternera, con una actividad específica definida. Los valores de absorbancia de las muestras se comparan con la curva estándar y se deduce la actividad.

Los mismos experimentos se realizan con el producto A. Las actividades se expresan en ng de TrxR/mg de proteínas totales presentes en el extracto celular.

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años)**[0051]**

5

10

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
0,5 % de producto A	218,3 ± 8,2	+ 5
1 % de producto A	228,0 ± 10,1	+ 10
2 % de producto A	235,4 ± 9,2	+ 13

15

20

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
0,5 % de producto B	220,2 ± 8,3	+ 6
1 % de producto B	238,0 ± 10,1	+ 14
2 % de producto B	251,0 ± 9,8	+ 21

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años) en presencia de acroleína, un inhibidor de la tiorredoxina reductasa**[0052]**

25

30

35

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
Acroleína (25 µM)	130,8 ± 11,4	- 37
Acroleína (25 µM) + 0,5 % de producto B	139,0 ± 12,5	+ 6
Acroleína (25 µM) + 1 % de producto B	149,2 ± 10,1	+ 14
Acroleína (25 µM) + 2 % de producto B	160,4 ± 13,8	+ 23

40

45

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
Acroleína (25 µM)	130,8 ± 11,4	- 37
Acroleína (25 µM) + 0,5 % de producto A	141,0 ± 15,2	+ 8
Acroleína (25 µM) + 1 % de producto A	145,6 ± 10,0	+ 11
Acroleína (25 µM) + 2 % de producto A	155,8 ± 13,8	+ 19

Acroleína (25 µM): concentración de acroleína en el medio de cultivo.

50

55

Resultados en condiciones de senescencia fisiológica (donante de 62 años)**[0053]**

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	132,0 ± 8,1	
0,5 % de producto A	144,8 ± 10,1	+ 9
1 % de producto A	160,6 ± 11,0	+ 21
2 % de producto A	170,3 ± 9,7	+ 28

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	132,0 ± 8,1	
0,5 % de producto B	148,8 ± 10,2	+ 13
1 % de producto B	159,4 ± 9,3	+ 21
2 % de producto B	176,6 ± 11,0	+ 34

[0054] Se observa que la presencia del producto B en los extractos celulares tal y como se han definido con anterioridad aumenta la actividad de la tioredoxina reductasa (TrxR) con respecto a una muestra de control que no lo contiene. Por otra parte, la actividad de la TrxR aumenta de forma proporcional a la cantidad de producto B que se añade.

[0055] Esta actividad con el producto B es mayor que cuando estos extractos celulares se tratan solo con el producto A.

Resultados en condiciones de senescencia fotoinducida (donante de 15 años, radiaciones UVB 100 mJ/cm² de cultivo)**[0056]**

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
Radiaciones UVB	246,3 ± 22,3	+ 18
Radiaciones UVB + 0,5 % de producto A	241,0 ± 12,0	+ 16
Radiaciones UVB + 1 % de producto A	259,0 ± 16,2	+ 24
Radiaciones UVB + 2 % de producto A	270,4 ± 13,7	+ 30

	Actividad (ng de TrxR/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	208,2 ± 5,8	
Radiaciones UVB	246,3 ± 22,3	+ 18
Radiaciones UVB + 0,5 % de producto B	251,8 ± 11,2	+ 21
Radiaciones UVB + 1 % de producto B	267,2 ± 9,7	+ 28
Radiaciones UVB + 2 % de producto B	278,5 ± 11,4	+ 34

Aquí se extraen las mismas conclusiones que se han desarrollado en el apartado anterior.

Ejemplo 8: Medición de la tasa de tiorredoxina

[0058] La tasa de tiorredoxina en los extractos celulares de células cultivadas de acuerdo con el ejemplo 2, tratadas o no tratadas (muestra de control) con el producto B o con el producto A solo, se mide mediante la técnica ELISA.

Unas placas de 96 pocillos se incuban con 100 µl por pocillo del anticuerpo monoclonal anti-Trx clon 2G11 (5 µg/ml; BD Pharmingen) en tampón carbonato, pH 9,6 durante 16 horas a 4 °C. Las placas se lavan con PBS que contiene un 0,5 % de Tween 20 (PBS-T) y se bloquean con 200 µl de PBS que contiene un 3 % de BSA (PBS-BSA) durante 1 hora. Los pocillos se lavan 4 veces con PBS-T y se incuban con 100 µl de muestra o de Trx estándar diluidas de forma seriada en PBS-TB que contiene DTT (ditiotreitól) 1 mM, durante 2 horas a 4 °C. Las placas se cubren con una hoja de aluminio. Los pocillos se lavan 4 veces con PBS-T y a continuación se incuban con 100 µl de IgG biotinilada de cabra anti-Trx humana (IMCO Co), 75 ng/ml, durante 1 hora a temperatura ambiente en la plataforma de un agitador.

Los pocillos seguidamente se lavan 4 veces con PBS-T y se incuban con 100 µl de estreptavidina conjugada con la fosfatasa alcalina (AX02-0402X; 1 : 4.000) (Amersham Biosciences) en PBS-BSA-T (0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20) en la plataforma de un agitador.

Las placas se lavan 4 veces en PBS-T y se incuban con fosfato p-nitrofenílico (Sigma Chem Co) en dietanolamina, pH 9,0, que contiene MgCl₂ 0,5 mM, y un 0,02 % de NaN₃ durante 40 minutos.

La absorbancia se mide a 405 nm.

La Trx humana recombinante (IMCO Co) se utiliza como estándar en el intervalo 100-0,41 ng/ml.

Las tasas se expresan en ng de Trx/mg de proteínas totales presentes en el extracto celular.

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años)**[0059]**

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	87,6 ± 7,6	
0,5 % de producto A	90,0 ± 4,2	+ 3
1 % de producto A	94,0 ± 4,7	+ 7
2 % de producto A	98,8 ± 10,2	+ 13

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	87,6 ± 7,6	
0,5 % de producto B	88,4 ± 2,7	+ 1
1 % de producto B	95,7 ± 7,6	+ 9
2 % de producto B	99,8 ± 5,3	+ 14

Resultados en condiciones fisiológicas normales (donante de 15 años) en presencia de N-acetil-cisteína (NAC), un inhibidor de la tiorredoxina**[0060]**

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%
Muestra de control	87,6 ± 7,6	
NAC (10 mM)	59,8 ± 8,1	- 32
NAC (10 mM) + 0,5 % de producto A	60,2 ± 2,8	+ 1
NAC (10 mM) + 1 % de producto A	61,4 ± 3,3	+ 3
NAC (10 mM) + 2 % de producto A	63,1 ± 6,0	+ 6

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%	
5	Muestra de control	87,6 ± 7,6	
	NAC (10 mM)	59,8 ± 8,1	- 32
	NAC (10 mM) + 0,5 % de producto B	60,4 ± 5,4	+ 1
10	NAC (10 mM) + 1 % de producto B	61,0 ± 3,1	+ 2
	NAC (10 mM) + 2 % de producto B	65,4 ± 9,2	+ 9

Resultados en condiciones de senescencia fisiológica (donante de 62 años)

15 [0061]

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%	
20	Muestra de control	61,6 ± 4,2	
	0,5 % de producto A	65,9 ± 6,0	+ 7
	1 % de producto A	68,9 ± 2,6	+ 12
	2 % de producto A	74,5 ± 4,2	+ 21

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%	
25	Muestra de control	61,6 ± 4,2	
	0,5 % de producto B	66,9 ± 5,8	+ 9
	1 % de producto B	70,4 ± 8,3	+ 14
30	2 % de producto B	77,3 ± 10,0	+ 25

Resultados en condiciones de senescencia fotoinducida (donante de 15 años, radiaciones UVB 100 mJ/cm² de cultivo)

[0062]

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%	
35	Muestra de control	87,6 ± 7,6	
	Radiaciones UVB	93,4 ± 9,4	+ 7
40	Radiaciones UVB + 0,5 % de producto A	95,8 ± 9,0	+ 9
	Radiaciones UVB + 1 % de producto A	100,7 ± 12,4	+ 15
	Radiaciones UVB + 2 % de producto A	109,1 ± 13,3	+ 25

	Tasa (ng de Trx/mg de proteínas totales)	%	
45	Muestra de control	87,6 ± 7,6	
	Radiaciones UVB	93,4 ± 9,4	+ 7
50	Radiaciones UVB + 0,5 % de producto B	94,8 ± 7,7	+ 8
	Radiaciones UVB + 1 % de producto B	106,5 ± 10,0	+ 22
55	Radiaciones UVB + 2 % de producto B	114,1 ± 13,0	+ 30

[0063] En presencia del producto B, se observa un mayor aumento de la tasa de tioredoxina que la que se obtiene solo con el producto A.

[0064] Ejemplo 9: Medición de las actividades enzimáticas de las fitoalexinas que producen las células cultivadas en las condiciones de estrés de acuerdo con el ejemplo 2

5 La actividad de la ferredoxina-NADP+ óxidoreductasa (FNR) se determina mediante un método colorimétrico basado en la reducción del citocromo c.

La reducción del citocromo c, medido en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 550 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

10 Una unidad de FNR reduce 1 milimol de citocromo c por minuto con un pH 7,5, a 25 °C en presencia de ferredoxina y de NADPH.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se evalúa por su capacidad para inhibir un flujo de aniones superóxidos generados por el sistema xantina-xantina oxidasa. Los radicales superóxidos que produce este sistema reducen el nitroazul de tetrazolio (NBT) en azul de formazán estable a 560 nm. Una unidad enzimática de SOD corresponde a la cantidad de extracto vegetal susceptible de inducir una inhibición del 50 % de la reducción del NTB.

15 La glutatión reductasa regenera el glutatión reducido en glutatión que vuelve a estar disponible para la célula.

Resultados:

[0065]

20

Fitoalexina	Actividad en unidades/ml de producto, aproximadamente:
SOD	20
CuZn SOD	3,5
Glutatión reductasa	0,5
FNR	2,5

25

30

35

40

45

50

55

REIVINDICACIONES

1. Principio activo cosmético compuesto por ferulato de arginina y por un extracto de microalga.

2. Principio activo de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicho extracto de microalga del principio activo está enriquecido con fitoalexinas.

5 3. Principio activo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que se caracteriza porque dicha microalga pertenece a la clase de las clorofíceas.

4. Principio activo de acuerdo con la reivindicación 3, que se caracteriza porque dicha microalga pertenece al género *Scenedesmus*.

10 5. Principio activo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza porque el coeficiente en peso entre el ferulato de arginina:extracto de microalgas va de 1:1 y 1:199, de preferencia de 1:19 a 1:99.

6. Principio activo de acuerdo con la reivindicación 5, que se caracteriza porque el coeficiente en peso del ferulato de arginina: extracto de microalgas es de 1:19.

15 7. Utilización *in vitro* o *ex vivo* de un principio activo cosmético de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6 para activar el proteosoma de las células.

8. Utilización *in vitro* o *ex vivo* de un principio activo cosmético de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6 para estimular la producción de tiorredoxina.

9. Utilización de un principio activo cosmético de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de una composición cosmética de uso tópico.

20 10. Composición cosmética de uso tópico que comprende un principio activo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio fisiológicamente aceptable.

11. Uso de una composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 10 para luchar contra el envejecimiento cutáneo.

25

30

35

40

45

50

Fig. 1

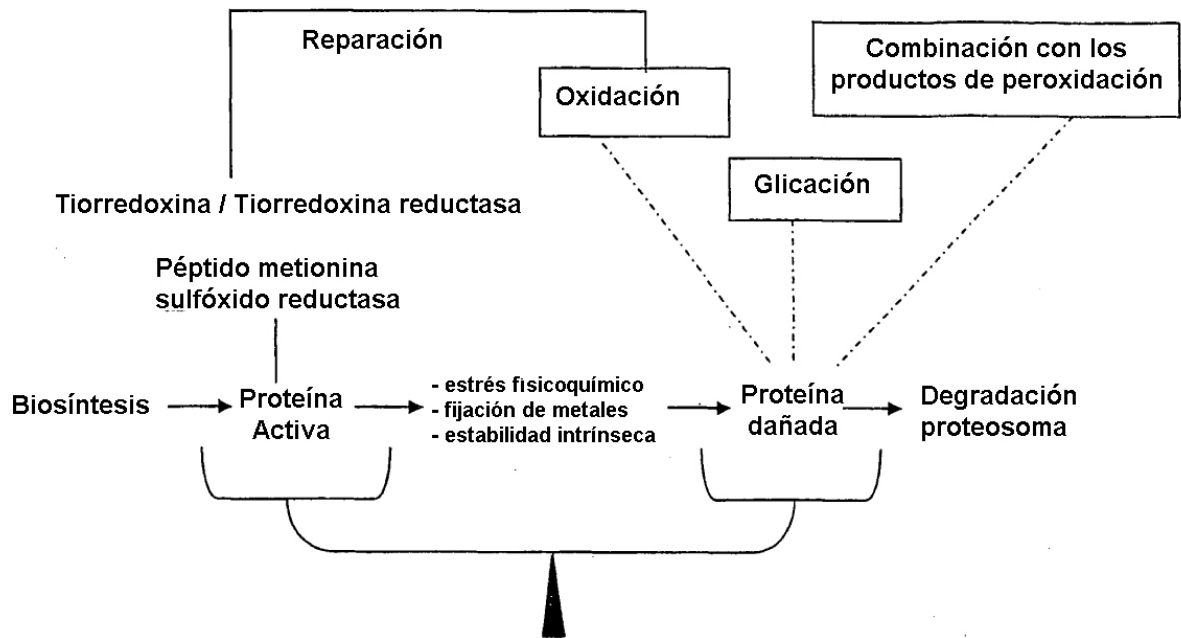


Fig. 2

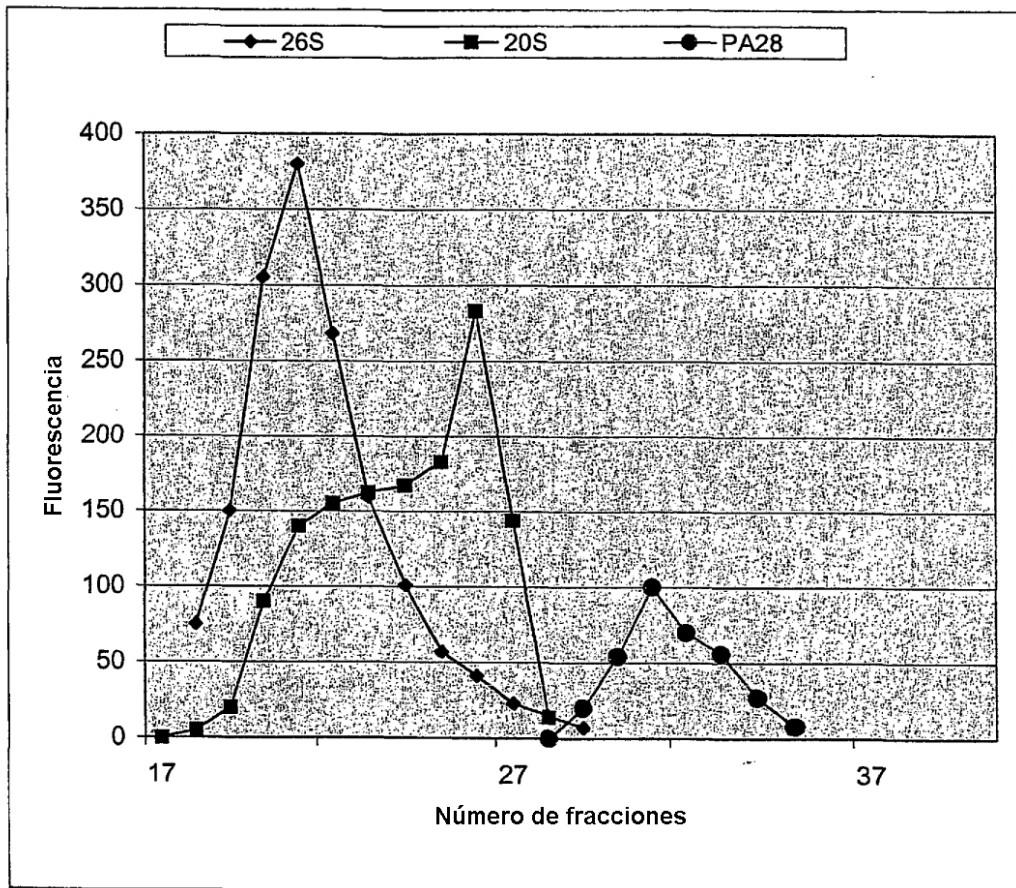


Fig. 3

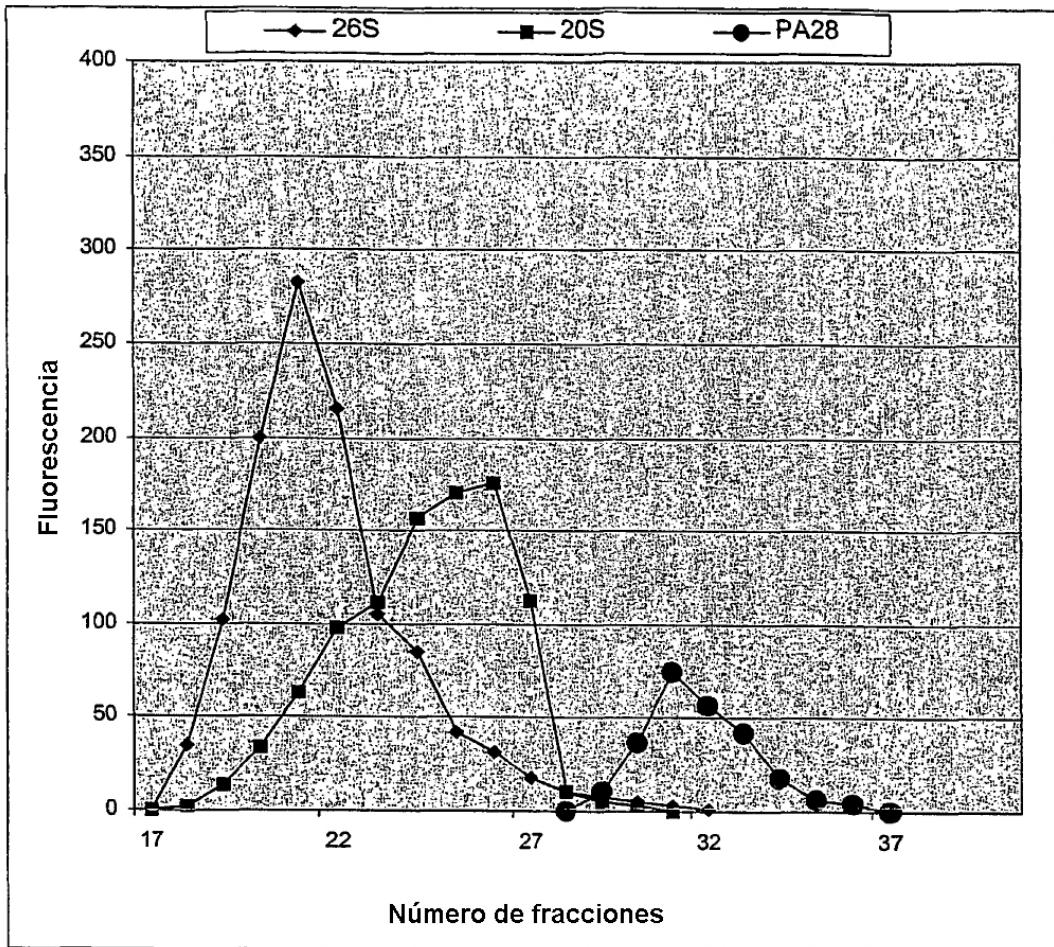


Fig. 4

