

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 809**

21 Número de solicitud: 201150021

51 Int. Cl.:

**A61K 8/98** (2006.01)

**A61K 35/56** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A01K 67/033** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.01.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.03.2013**

71 Solicitantes:

**INDUSTRIAL FARMACÉUTICA CANTABRIA, S.A.  
(100.0%)  
C/ Arequipa, 1 - 5ª planta  
28043 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**DOMÍNGUEZ VALDÉS-HEVIA, Marta;  
BRIEVA DELGADO, Aurora;  
GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Salvador;  
REYES MARTÍN, Eduardo;  
CARBALLEIRA MORADO, José;  
QUINTANA GONZÁLEZ, Ernesto;  
PIVEL RANIERI, Juan Pablo;  
GUERRERO GÓMEZ-PAMO, Antonio;  
JUARRANZ DE LA FUENTE, Ángeles;  
ESPADA REGALADO, Jesús y  
SANZ RODRÍGUEZ, Francisco**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro**

54 Título: **PRODUCTO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DERMATOLÓGICAS,  
COSMÉTICAS O COSMECÉUTICAS DESTINADAS AL TRATAMIENTO DE LA PIEL.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un producto obtenido a partir de huevas de un gasterópodo para preparar composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmecéuticas destinadas al tratamiento de la piel, presentando dicho producto capacidad para activar y movilizar las células madre de la piel, así como para evitar la pérdida de las mismas que ocurre como consecuencia del envejecimiento cronológico y prematuro. La presente invención también se refiere al procedimiento seguido para la obtención de dicho producto.

ES 2 398 809 A1

**DESCRIPCIÓN****PRODUCTO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DERMATOLÓGICAS, COSMÉTICAS O COSMECÉUTICAS DESTINADAS AL TRATAMIENTO DE LA PIEL**

5 La presente invención se refiere a un producto obtenido a partir de huevas de gasterópodos para preparar composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmecéuticas capaces de activar y movilizar las células madre de la piel, así como de evitar la pérdida de las mismas que ocurre como consecuencia del envejecimiento cronológico y/o prematuro de la piel.

**Antecedentes de la invención**

10 La piel es el mayor órgano del cuerpo humano, o animal. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. La piel presenta tres capas: la epidermis, que es la capa más superficial, la dermis, que es la capa intermedia, y la hipodermis o tejido  
15 subcutáneo que es la capa más profunda de la piel.

La piel, al ser el órgano más externo, está sometida a un importante deterioro y agresión que da lugar al envejecimiento cutáneo prematuro. Entre los factores externos que actúan sobre la misma están el exceso de radiación solar, la contaminación atmosférica, el uso abusivo de tensioactivos, el humo del tabaco, etc. Pero la piel  
20 también puede sufrir envejecimiento prematuro como consecuencia de factores internos o endógenos como son los debidos a una alimentación no equilibrada en vitaminas, a factores iatrogénicos como la radioterapia, la ingesta de fármacos como anti-inflamatorios no esteroideos, inmunosupresores, etc, o a la presencia en el organismo de toxinas muy reactivas como las que ingieren los drogadictos, alcohólicos,  
25 etc. Y también se produce un envejecimiento natural como consecuencia por ejemplo de la producción de radicales libres en la mitocondria, alteraciones en el ADN, etc.

El deterioro de la piel se presenta en forma de arrugas, manchas, laxitud, neoplasmas benignos, etc.

Han sido muchas las composiciones cosméticas o farmacéuticas divulgadas para el  
30 tratamiento de la piel, su cuidado y limpieza, compuestas por ingredientes muy diferentes, entre los que se encuentran extractos de plantas y extractos de animales. En este sentido, uno de los ingredientes usados para la elaboración de cosméticos para el tratamiento de la piel, han sido las secreciones de gasterópodos o lo que comúnmente denominamos baba de caracol. Así, por ejemplo, el documento  
35 DE1813154 divulga una composición para el tratamiento de la piel que contiene una

grasa y uno o más agentes activos que contiene la secreción de lubricante deslizante excretada de un caracol, particularmente de *Helix pomatia*. La patente FR2595247 describe que los extractos de mucosas o jugos digestivos de un gasterópodo son útiles en cosméticos en concentraciones entre 0,1-10% debido a su acción hidratante en la superficie de la epidermis. La patente US5538740 divulga un ingrediente activo para composiciones cosméticas o terapéuticas obtenida a partir de la secreción de un gasterópodo vivo centrifugado, pudiendo aplicarse dichas composiciones al tratamiento de la piel.

Por otra parte, el documento CA2611645 describe el uso de un producto de "baba de caracol" *Helix aspersa* para estimular la proliferación de células madre *in vitro*.

Una célula madre es una célula que tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada. Además, es capaz de producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad.

La mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. En particular, la epidermis está en constante renovación y consiste en un epitelio estratificado escamoso asociado a folículos pilosos y glándulas sebáceas. Estas estructuras especializadas se mantienen por autorrenovación de células madre epidérmicas y diferenciación de su progenie. Las células madre de la piel son cruciales en la cicatrización de heridas y en la regeneración de la piel y cabello. Sin embargo, la capacidad de las células madre puede verse mermada por problemas genéticos, influencias del entorno y por el proceso de envejecimiento. Por lo tanto, la protección de las células madre es extremadamente importante.

A pesar de ser conocida la utilidad de la secreción de caracol para la preparación de cosméticos para la piel, no ha sido hasta ahora divulgado un producto que derive de huevas de caracol para la preparación de composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmeceúticas y que demuestre su actuación sobre las células madre de la piel activándolas y movilizándolas, evitando su pérdida y, por tanto, consiguiendo así la prevención y la corrección del envejecimiento de la piel.

En este sentido, la presente invención divulga un producto obtenido de huevas de gasterópodo para la preparación de composiciones cosméticas o cosmeceúticas que han demostrado tener efectos muy beneficiosos sobre la piel, evitando y corrigiendo así el envejecimiento de la misma actuando directamente sobre las células madre epiteliales.

**Descripción de la invención**

El objeto de la presente invención consiste en un producto elaborado a partir de  
huevas de gasterópodos de la familia Helicidae y que se utiliza para la preparación de  
composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmecéuticas para la piel. Dicho  
5 producto tiene la capacidad de actuar sobre las células madre activándolas y  
movilizándolas, evitando su pérdida como consecuencia de un envejecimiento de la  
piel debido tanto a factores endógenos como exógenos estresantes.

El producto está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas procedentes de  
huevas de caracol, siendo las moléculas orgánicas polisacáridos, proteínas,  
10 glucoproteínas, péptidos, y aminoácidos, y las proteínas y glucoproteínas presentan un  
patrón electroforético característico, similar al mostrado en la figura 1, y siendo las  
inorgánicas cationes y aniones como fosfato, calcio, sodio, magnesio, hierro, zinc,  
cobre y selenio, en sus formas iónicas más estables.

El producto derivado de huevas de caracol es utilizado para la preparación de  
15 composiciones dermocosméticas en forma de serum, soluciones, inyectables  
(monodosis), gel (Hydragel), gelcrem o/w, gelcrem w/o , crema o/w, crema w/o, crema  
w/s, crema o/w/o, mascarillas de preparación extemporánea, parches y en general  
todas las formas dermocosméticas (cosmecéuticas) de utilización en la formulación de  
productos dermatológicos, cosméticos o cosmecéuticos. Dicho producto, aplicado en  
20 forma de composición dermocosmética facilita el rescate de células madres de la piel  
destinadas a desaparecer por senescencia o agresión endógena o exógena y  
promueve la activación de dichas células tal y como se demuestra en el ejemplo 2 de la  
presente memoria. Esta activación se caracteriza por una inducción temprana de la  
replicación del ADN durante la división celular.

25 Asimismo, dicho producto, aplicado en forma de composición dermocosmética,  
promueve la movilización de células madre de la piel que se traduce en el paso de la  
zona base del folículo piloso al epitelio interfolicular y su distribución en el mismo. El  
folículo piloso es la parte de la piel donde se concentran las células madre.

Las huevas a partir de los cuales se prepara el producto objeto de la presente  
30 invención se obtuvieron de gasterópodos criados en invernaderos protegidos del  
exceso de luz, de la lluvia directa y de las agresiones de animales e insectos. La  
climatología y la protección del invernadero permitieron que el caracol se encontrase  
en condiciones óptimas de temperatura y de humedad. Los gasterópodos fueron  
alimentados con piensos, agua y plantas verdes, rábanos y hortalizas y realizaron sus  
35 ciclos naturales de hibernación y reproducción.

Los gasterópodos de la familia Helicidae utilizados para la preparación del producto en cuestión son seleccionados entre cualquiera del grupo que comprende *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix lucorum*, *Helix lutescens*, *Helix hortensis*, *Helix aperta*, *Helix pisana*, *Otala punctata*, *Iberus gualtieranus alonensis*, *Helix nemoralis*, *Helix fruticola*,  
 5 *Helix strigella*, *Helix fruticum*, *Helix bidens*, *Helix arbostorum*, *Helix rotundata*, *Helix aculeata*, *Helix pulchella*, *Helix personata*, *Helix holoserica*, *Helix alonensis* y *Helix candidissima*.

El procedimiento para la obtención del producto derivado de huevos de caracol objeto de la presente invención se describe a continuación. En el período reproductivo, los  
 10 caracoles depositan sus huevos en unos recipientes de barro tipo maceta que contienen tierra tamizada en cribas con poros de 2 mm. Una vez realizada la puesta de huevos de caracol, la fase de recogida se realiza a una temperatura aproximada de 18-24°C y un 60-100% de humedad. En esta fase de recogida, el contenido de las macetas se deposita en unas cribas de 3 mm donde se procede a la limpieza y  
 15 eliminación de la tierra. Las huevos se aclaran con agua destilada a muy poca presión, de forma que durante los aclarados toda la tierra pasa a través de la criba, dejando las huevos perfectamente limpias.

Las huevos se sumergen en suero fisiológico y se conservan refrigeradas entre 2 y 8°C. Posteriormente, se filtra el suero fisiológico por malla de diámetro menor a 3 mm,  
 20 de manera que sólo queden las huevos de caracol enteras. Se procede al lavado de las huevos con agua purificada y seguidamente se suspenden, a una concentración entre 40% y 70% (p/p) en agua purificada, o en suero fisiológico, o en algún componente o combinación de componentes de la formulación dermocosmética definitiva; se lisan y homogenizan mediante triturador, molino coloidal u homogenizador  
 25 en línea; se filtra por malla de acero de 1 mm y el líquido (producto objeto de la presente invención) así obtenido se emplea en la fabricación de las preparaciones dermocosméticas adecuadas.

La concentración final del producto derivado de huevos de caracol en la composición dermocosmética definitiva puede variar entre un 0,1% y un 70% (p/p).

### 30 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Densitometría o perfil densitométrico (a) y foto (b) de la electroforesis en gel de poliacrilamida, (SDS-PAGE) del producto derivado de huevos de caracol, obtenido según se describe en el ejemplo 1. En dicha densitometría (a) los ejes son:

Abcisas (eje X): distancia desde el origen de electroforesis en unidades arbitrarias (UA)

35 Ordenadas (eje Y): intensidad de absorción en unidades arbitrarias (UA).

**Figura 2:** Marcaje de las regiones del folículo piloso en fase telogén mediante incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Marcaje a las 24 h de inyectar BrdU

(Fig. 2a), después de inyecciones de seriadas durante 5 días (Fig. 2b) y transcurridos 70 días desde la última inyección (Fig. 2c)

**Figura 3:** Representación de la cuantificación de potenciales células madre epidérmicas (LRCs) (media+/-error estándar) en la región prominente del folículo piloso sobre una muestra de cuarenta pelos correspondientes a cinco o más animales en cada caso cuantificado inmediatamente después de los tratamientos con y sin producto derivado de las huevas de gasterópodo y a los 10 días.

### **Ejemplos**

Ejemplo 1: *Preparación del producto y de una composición tópica conteniéndolo como activo*

Durante la reproducción, los caracoles depositan sus huevas en unos tiestos que contienen tierra tamizada en cribas con poros de 2 mm. Una vez realizada la puesta de huevas de caracol, la fase de recogida se realiza a una temperatura aproximada de 21 °C y con aproximadamente un 80 % de humedad. En esta fase de recogida, el contenido de los tiestos se deposita en unas cribas de 3 mm donde se procede a la limpieza y eliminación de la tierra. Las huevas se aclaran con agua destilada a muy poca presión, de forma que durante los aclarados toda la tierra pasa a través de la criba, dejando las huevas perfectamente limpias.

Las huevas se sumergen en suero fisiológico y se conservan refrigeradas entre 2 y 8°C. Posteriormente, se filtra el suero fisiológico por malla de diámetro menor a 3 mm, de manera que sólo queden las huevas de caracol enteras. Se procede al lavado de las huevas con agua purificada y seguidamente se suspenden, a una concentración del 70% (p/p) en agua purificada; se lisan y homogenizan mediante triturador Silverson; se filtra por malla de acero de 1 mm y el líquido así obtenido (producto de la presente invención) se emplea en la fabricación de una crema, utilizándolo a una concentración del 70%.

Ejemplo 2: *Evaluación de la actividad del producto derivado de huevas de caracol en la dinámica de las células madre de la piel*

Como las células madre en la epidermis adulta se dividen de forma poco frecuente, se identifican con células que retienen una marca específica de ADN (DNA label-retaining cells, LRC). Las células que se encuentran dividiéndose en un modelo animal (ratón) pueden marcarse mediante pulsos repetidos de bromodeoxyuridina (BrdU) o <sup>3</sup>H-timidina tritiada. La marca irá perdiéndose tras las sucesivas divisiones, sin embargo, los queratinocitos que se dividen muy eventualmente (slow-cycling keratinocytes) retiene la marca durante largos periodos de tiempo (LRCs) (Bickenbach JR,

McCutecheon J, Mackenzie IC. Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet.* 19(3):325-333, 1986; Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 5 61(7):1329-1337, 1990). Las LRCs se localizan preferentemente en el area del *bulge* o región prominente del folículo piloso de la epidermis murina (Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 116(6):769-778, 2004). Las células madre del bulge son bipotentes ya que pueden originar tanto queratinocitos del folículo como una población de células con alta capacidad de división denominadas *transit-amplifying cells* (TA). Las TAs migran a la epidermis interfollicular y muestran un progresivamente un menor potencial de diferenciación, finalmente se dividen originando los queratinocitos comprometidos a la diferenciación terminal. Ocasionalmente, las TAs han sido consideradas como células madre ya que 10 tiene un elevado potencial proliferativo. Sin embargo, muchos autores indican que sólo las células del bulge deben ser denominadas células madre, mientras que las de la epidermis interfollicular serían las TA.

La eficacia del producto derivado de huevas de caracol, obtenido según se indica en el ejemplo 1, se evaluó aplicándolo en forma de composición cosmética (crema) sobre la piel de ratones neonatos C57BL/6.

20 Se analizó el efecto del producto en cuestión sobre la proliferación y migración de las células madre epidérmicas, para lo que se utilizaron 30 ratones neonatos C57BL/6 distribuidos en tres grupos, estableciendo un mínimo de 5 animales por grupo:

- Grupo **C**: Control (animales sin tratar)
- Grupo **M1**: Animales tratados con Muestra 1 (composición cosmética que 25 contiene el producto derivado de las huevas de caracol)
- Grupo **M2**: Animales tratados con Muestra 2 (composición cosmética con el mismo vehículo que la muestra 1 y que no contiene el producto derivado de las huevas de caracol)

Los experimentos se realizaron conforme a las normativas que regulan la 30 manipulación y cuidado de los animales de laboratorio (Real Decreto 1201/2005).

El método utilizado en este estudio para identificar y cuantificar células madre epidérmicas se basa en la baja frecuencia de proliferación de esta tipo celular con respecto a las restantes poblaciones celulares del tejido (Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM. Manipulation of stem cell

proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development*. 130(21):5241-5255, 2003).

Las células en división pueden marcarse mediante inyecciones de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ timidina) o 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), análogos de la timidina, de tal forma que los nucleótidos marcados son incorporados en el proceso de replicación del ADN. Después de un corto período de tiempo (unas 24 h) desde la administración de una única dosis del análogo a un animal adulto, la marca se detecta en las células con mayor tasa de proliferación (Fig 2a). Se identifican las células con mayor tasa de división en el estrato basal de la epidermis interfolicular (EIF), glándula sebácea (GS), infundíbulo (Inf) y especialmente en el bulbo piloso (BP), mientras que las células quiescentes de la región prominente o "bulge" (RP) permanecen sin marcar (Fig 2a). Si las inyecciones de marcaje son seriadas y lo suficientemente numerosas, las células con baja tasa de proliferación (potenciales células madre adultas) pueden incorporar también la marca a la cromatina por procesos ajenos a la replicación, implicados en reparación y mantenimiento de la doble hebra de ADN (Fig. 2b). Varios meses después de la última de las inyecciones seriadas, la marca se diluye en la mayoría de los células como consecuencia de las sucesivas rondas de replicación del ADN, mientras que aquellas células cuya tasa de proliferación es mínima permanecen marcadas durante al menos 10 semanas, por lo que se denominan células que retienen la marca ("label retaining cells", LRCs). En la epidermis adulta en reposo, que contiene mayoritariamente folículos pilosos en fase telogén o de reposo, la localización predominante de las LRCs es la denominada región prominente ("bulge") del folículo piloso (Fig 2c).

Los ratones de 10 días de edad recibieron una vez al día, durante cuatro días consecutivos, una inyección de 5-bromo-2'-deoxiuridina (6,25 mg/ml, 50 mg/kg de peso corporal) en tampón fosfato PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM), con el fin de marcar las células que se encontraban en fase de replicación del ADN. Aproximadamente 50 días después del marcaje con BrdU, se procedió a la aplicación tópica de las Muestras 1 y 2 en su forma de crema sobre la piel de la cola de los ratones, dos veces al día durante 11 días consecutivos. Posteriormente, estos animales y sus correspondientes controles fueron sacrificados en cámara de  $\text{CO}_2$  en dos series diferentes para cada grupo (cinco ratones por grupo y serie): inmediatamente después del tratamiento, o diez días después. Una vez sacrificados los animales, la piel de la cola se procesó para la separación de la epidermis y preparación de montajes *in toto*. El método utilizado para separar la



epidermis de la dermis de las pieles de los ratones se basó en el descrito por Braun y colaboradores (Braun et al., Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development*. 130 (21), 5241-5255, 2003). Una vez separada la cola del cuerpo, se realizó una incisión con bisturí en la zona ventral, escindiéndose manualmente la piel en una única pieza, que se incubó en 10 ml de EDTA 5 mM en PBS durante 4 h a 37°C. A continuación, la epidermis se separó cuidadosamente en una lámina intacta de la que pendían los folículos pilosos (FPs) y se fijó en formaldehído (3,7% en PBS a 4°C) durante 48 h para la preparación de los montajes *in toto*. Finalmente, las láminas de epidermis abundantemente lavadas con tampón fosfato PBS, se almacenaron en PBS con 0,2% de azida sódica a 4°C. Para preparar los montajes *in toto* se seccionaron piezas de epidermis de unos 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup>.

Para identificar y cuantificar las LRCs en los montajes *in toto* de las piezas de epidermis, se localizaron la células BrdU-positivas mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos adecuados. Las muestras se evaluaron en un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP2-AOBS. Las imágenes se adquirieron utilizando el software LCS Suite versión 2.61 (Leica) y fueron procesadas con el programa Photoshop CS2 versión 9.0.2 (Adobe). La cuantificación del número de LRCs se llevó a cabo sobre las imágenes adquiridas, considerando un tamaño muestral de 30 folículos por ratón y un mínimo de 5 ratones por grupo. Los resultados se expresaran como valores medios  $\pm$  desviación estándar y el análisis estadístico de las diferencias entre grupos se llevó a cabo utilizando el test t de Student para muestras independientes, con ayuda del programa SPSS (versión 15.0).

Los resultados (Fig. 3) obtenidos muestran diferencias muy significativas en el número y distribución de LRCs, potenciales células madre epidérmicas, en los ratones tratados con la muestra 1 (grupo M1) con respecto a los ratones tratados con la muestra 2 (grupo M2) y los ratones control sin tratar (grupo C). Como se describe en la Metodología, la cuantificación de LRCs por grupo se llevó a cabo en dos series, inmediatamente después del tratamiento, o diez días después, con objeto de evaluar el potencial efecto inmediato de cada muestra sobre las células madre epidérmicas, y su evolución con el paso del tiempo.

La cuantificación de LRCs inmediatamente después de los tratamientos mostró un incremento significativo de LRCs en la zona prominente ("bulge") del folículo piloso en los ratones del grupo M1, en comparación con los ratones de los grupos M2 y C (Fig. 3a). Sin embargo, la cuantificación de LRCs 10 días después de los tratamientos

mostró una significativa reducción en la región prominente y un incremento en el epitelio interfolicular en los ratones del grupo M1 con respecto a los otros dos grupos (Fig. 3b).

Estos resultados son compatibles con una activación de las células madre epidérmicas residentes en el folículo piloso inducida por la muestra 1. Esta activación implicaría una inducción temprana de la replicación de LRCs (incremento de número en la región prominente a tiempo 0) y una posterior movilización y distribución en el epitelio interfolicular de las mismas (disminución del número de LRCs en la región prominente a los diez días). Por su parte, los grupos C y M2 incrementan ligeramente el número de LRCs residentes en la región prominente con el paso del tiempo. Es decir, se observan más LRCs en ambos grupos a los diez días de finalizado el tratamiento en comparación con la cuantificación realizada en cada grupo en el día 0. Esta observación pone de manifiesto que ambos grupos se comportan con la normalidad fisiológica esperada a los 50 días de desarrollo, que implica una paulatina movilización de sus LRCs como consecuencia del inicio del tercer ciclo normal del pelo. Esta movilización fisiológica no es, en absoluto, comparable con la potentísima activación inducida por la muestra 1 e indica que ni el grupo C ni el M2 se comportan de forma anormal, como sucede con el grupo M1.

Ejemplo 3: Descripción química del producto derivado de huevas de caracol

El producto obtenido a partir de huevas de caracol tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 se analizó físico-química y biológicamente, determinando su contenido en proteínas totales (según el método descrito en: Lowry, O.H., H.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall J.Biol. Chem. 193, 265-275. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." (1951)), azúcares totales (según el método descrito en: Dubois, A., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances" Anal. Chem. 28, 350-356 (1956)), análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (U.K. Laemmli "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4", Nature 227, 680-5 (1970)), contenido en aminoácidos (según el método descrito en: A. Novotny, "Basic Exercises in Immunochemistry", Springer-Verlag Berlín 1979, pp 169-171), contenido en metales (realizado por el Laboratorio Interprofesional Lechero de Cantabria (homologado con el no. EC-1988/05 para análisis físico-químicos y microbiológicos para productos de Consumo, Cosméticos e Higiene), actividad antioxidante (según el método descrito en: Benzie, I F, JJ Strain " Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of

biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration." Methods in enzymology, 299, pp 15-27, 1999) y actividad superóxido dismutasa (según el método descrito en: JM McCord, I Fridowich "Superoxide Dismutase. An enzymic function for Erythrocyte (Hemocuprein)" J. Biol. Chem. 244, 6049-6055 (1969)). Los resultados se representan en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

**Tabla1:** Análisis producto derivado de huevas de caracol

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración ó Actividad</b>
Proteínas totales	243 mg/g
Azúcares totales	284 mg /g
Actividad antioxidante FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential)	0,50 % pesoTrolox equivalente / peso
Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)	0,2 (% Peso SOD/Peso prot)
Contenido en aminoácidos	0,8 mg/ml

Por lo que se ha demostrado que el extracto de huevas de caracol presenta contenido en proteínas y azúcares, así como actividad superóxido dismutasa. Además se ha comprobado que tiene actividad antioxidante y actividad proliferativa de fibroblastos.

**Tabla 2:** Determinación de metales sobre muestra del producto derivado de huevas de caracol.

<b>Metal</b>	<b>Concentración</b>
<b>Fósforo</b>	725mg/L
<b>Calcio</b>	567 mg/L
<b>Sodio</b>	1445mg/L
<b>Magnesio</b>	54 mg/L
<b>Hierro</b>	4 mg/L
<b>Zinc</b>	41 mg/L
<b>Cobre</b>	<0,02 mg/L
<b>Selenio</b>	0,304 µg/L

Según lo anterior, se puede concluir que el producto elaborado a partir de huevas de caracol contiene tanto moléculas orgánicas como inorgánicas, siendo las moléculas orgánicas polisacáridos, proteínas, glucoproteínas, péptidos, y aminoácidos (Tabla 1). Las sustancias inorgánicas son cationes y aniones derivados de fósforo (fosfatos), calcio, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y selenio, en sus formas iónicas más estables (Tabla 2).

## REIVINDICACIONES

- 1.- Producto para la preparación de composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmeceúticas destinadas al tratamiento de la piel por su capacidad de activar y  
5 movilizar las células madre de la piel, así como de evitar la pérdida de las mismas que ocurre como consecuencia del envejecimiento cronológico y prematuro, que comprende moléculas orgánicas e inorgánicas derivadas de huevas de gasterópodos de la familia Helicidae, donde las moléculas orgánicas son  
10 polisacáridos, proteínas, péptidos, y aminoácidos y las moléculas inorgánicas son cationes y aniones derivados de fósforo, calcio, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y selenio en sus formas iónicas más estables y donde dicho producto es obtenido mediante un procedimiento que incluye las siguientes etapas:
- a) criar gasterópodos en un invernadero permitiendo sus ciclos naturales de hibernación y reproducción y permitiendo que los gasterópodos depositen sus  
15 huevas en tiestos rellenos de tierra cribada por malla de 2 mm,
  - b) recolectar manualmente las huevas a una temperatura aproximada de 18-24°C y a un 60-100% de humedad, eliminado su contenido en tierra por cribado sobre malla de 3 mm,
  - c) lavar las huevas con agua destilada, sumergirlas en suero fisiológico y  
20 conservarlos refrigerados entre 2 y 8 °C
  - d) eliminar el suero fisiológico por filtración por malla de 3 mm y lavar las huevas con agua purificada,
  - e) suspender las huevas en agua purificada, o en suero fisiológico, o en algún  
25 componente o combinación de componentes de la formulación cosmética definitiva a una concentración entre 40 y 70% en peso,
  - f) homogeneizar las huevas suspendidas procedentes de la etapa anterior mediante triturador, molino coloidal u homogenizador en línea y filtrar por malla de acero de 1 mm, obteniendo así un filtrado líquido que es el producto.
- 2.- Producto de acuerdo con las reivindicaciones 1 caracterizado porque los  
30 gasterópodos son seleccionados del grupo *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix lucarum*, *Helix lutescens*, *Helix hortensis*, *Helix aperta*, *Helix pisana*, *Otala punctata*, *Iberus gualtieranus alonensis*, *Helix nemoralis*, *Helix fruticola*, *Helix strigella*, *Helix fruticum*, *Helix bidens*, *Helix arbostorum*, *Helix rotundata*, *Helix aculeata*, *Helix pulchella*, *Helix personata*, *Helix holoserica*, *Helix alonensis* y *Helix candidissima*.
- 35 3.- Uso del producto descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para

la preparación de composiciones dermatológicas, cosméticas o cosmeceúticas en forma de serum, soluciones, inyectables (monodosis), gel (Hydragel), gelcrem o/w , gelcrem w/o , crema o/w, crema w/o, crema w/s, crema o/w/o, mascarillas de preparación extemporánea, parches y en general todas la formas dermocosméticas (cosmeceúticas) de utilización en la formulación de productos cosmeticos aplicables a la prevención y corrección de los signos propios del envejecimiento cutáneo producido por factores estresantes endógenos y exógenos.

5

4.- Composición dermatológica cosmética o cosmeceútica preparada a partir del producto de la reivindicación 1 caracterizada por presentar una concentración entre el 0,1% y el 70% (p/p) de dicho producto.

10

5.-Procedimiento para preparar el producto de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

a) Criar gasterópodos en un invernadero permitiendo sus ciclos naturales de hibernación y reproducción y permitiendo que los gasterópodos depositen sus

15

huevas en tiestos rellenos de tierra cribada por malla de 2 mm,  
b) Recolectar manualmente las huevas a una temperatura aproximada de 18-24°C y a un 60-100% de humedad, eliminado su contenido en tierra por cribado sobre malla de 3 mm,

c) Lavar las huevas con agua destilada, sumergirlas en suero fisiológico y conservarlos refrigerados entre 2 y 8 °C,

20

d) Eliminar el suero fisiológico por filtración por malla de 3 mm y lavar las huevas con agua purificada,

e) Suspender las huevas en agua purificada, o en suero fisiológico, o en algún componente o combinación de componentes de la formulación cosmética definitiva a una concentración entre 40 y 70% en peso,

25

f) Homogeneizar las huevas suspendidas procedentes de la etapa anterior mediante triturador, molino coloidal u homogenizador en línea y filtrar por malla de acero de 1 mm, obteniendo así filtrado líquido (producto) que se emplea en la preparación de composiciones cosméticas destinadas al tratamiento de la piel.

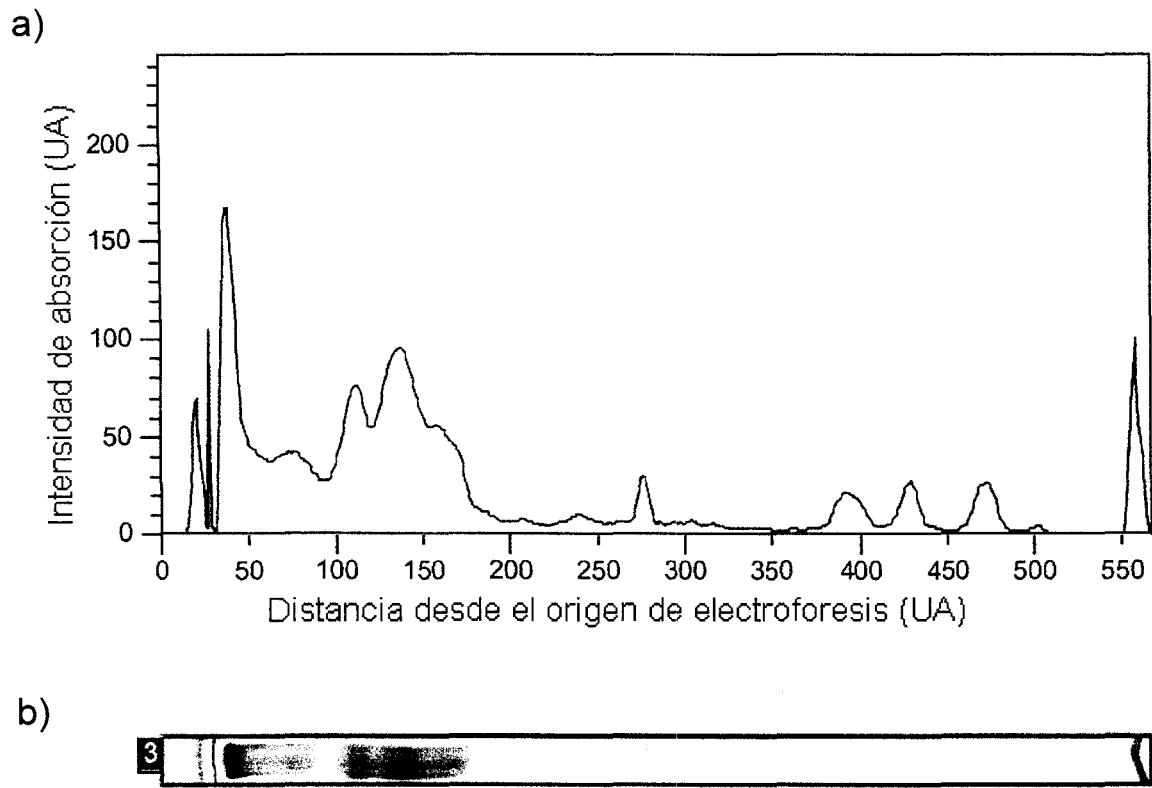


FIGURA 1

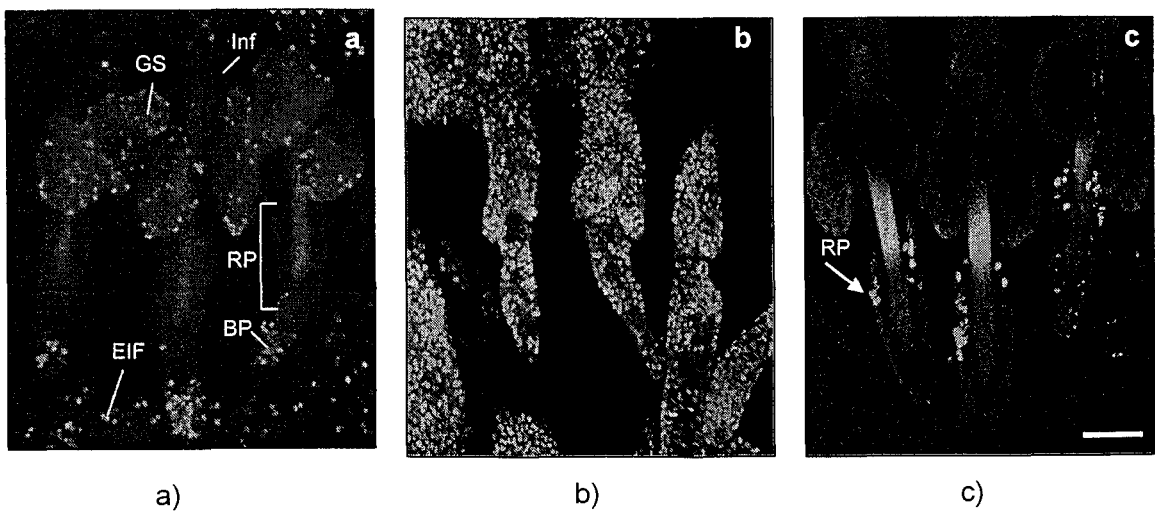


FIGURA 2

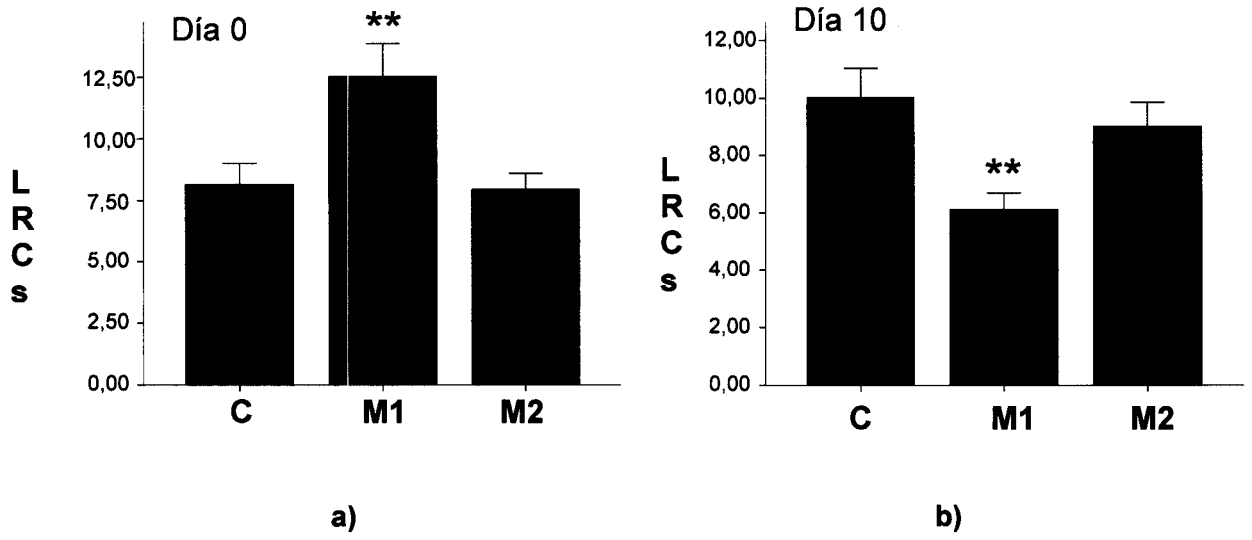


FIGURA 3



- ②① N.º solicitud: 201150021  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2010  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FR 2594333 A1 (CENTRE D'ETUDES DE PHYSIOLOGIE, D'HYGIENE ET DE COSMETOLOGIE) 21.08.1987, reivindicaciones; página 1, línea 20 – página 4.	1-5
X	CN 1205872 A (YANG YONGGUANG) 27.01.1999, (resumen) Recuperado de ESPACENET [en línea] [recuperado el 22.06.2010].	1,3
X	CN 101468130 A (WU WEI) 01.07.2009, (resumen) Recuperado en EPO-WPI Database [en línea] [recuperado el 22.06.2010].	1,4
A	EP 2085381 A1 (BIOPTIK TECHNOLOGY, INC) 05.08.2009, todo el documento.	1,5
A	CN 101361758 A (WEIFANG HUANG) 11.02.2009, (resumen) Recuperado en EPO-WPI Database [en línea] [recuperado el 22.06.2010].	
A	CA 2611645 A (VOON, GERARD) 20.05.2009, todo el documento.	1
A	FR 2196747 A (INRA) 22.3.1974, todo el documento.	1,5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 04.03.2013</p>	<p><b>Examinador</b> A. I. Polo Díez</p>	<p><b>Página</b> 1/5</p>
---	--	------------------------------



## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K8/98** (2006.01)  
**A61K35/56** (2006.01)  
**A61Q19/08** (2006.01)  
**A61Q19/00** (2006.01)  
**A61P17/00** (2006.01)  
**A01K67/033** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61Q, A61P, A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.03.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 5	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 3, 4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-5	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FR 2594333 A1	21.08.1987
D02	CN 1205872 A	27.01.1999
D03	CN 101468130 A	01.07.2009
D04	EP 2085381 A1	05.08.2009
D05	CN 101361758	11.02.2009
D06	CA 2611645 A	20.05.2009
D07	FR 2196747 A	22.03.1974

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La primera reivindicación de la invención se refiere a un producto que comprende moléculas orgánicas e inorgánicas derivadas de huevas de gasterópodo de la familia Helicidae que se obtiene por un procedimiento que incluye las etapas de criar los gasterópodos, recolectar las huevas, lavarlas, mantenerlas refrigeradas sumergidas en suero fisiológico, filtrarlas por una malla de 3 mm, suspenderlas en agua o suero, homogeneizarlas y filtrar con una malla de 1 mm. El producto obtenido por el procedimiento de la reivindicación 1 es un extracto filtrado y homogeneizado de huevas de caracol.

En la reivindicación 2 se enumeran las especies de la familia Helicidae adecuadas para llevar a cabo la invención.

La invención también se refiere al uso del producto para la preparación de composiciones cosméticas aplicables a la prevención de signos de envejecimiento cutáneo (reivindicación 3), a la composición que contiene dicho producto (reivindicación 4) y al procedimiento para obtenerlo (reivindicación 5)

**Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P)**

El documento D01 divulga (página 1, línea 20-página 2, línea 31; reivindicaciones 1 y 2) un extracto obtenido a partir de huevas de caracoles, tratadas con agua, homogeneizadas y filtradas, de manera que sus constituyentes no se degradan. El extracto contiene tanto moléculas orgánicas, como ácidos nucleicos, mucoproteínas, como componentes inorgánicos como magnesio, sulfatos. El producto se utiliza en composiciones cosméticas destinadas al tratamiento de la piel, entre ellas en una crema para protección solar, en una proporción del 5% (página 3, línea 13-página 4; reivindicación 3).

El producto descrito en D01 no se puede, en principio, diferenciar del producto de la reivindicación 1 de la solicitud por lo que se considera que dicho documento afecta a la novedad de la reivindicación 1. De la misma manera se considera que las reivindicaciones 3 y 4 están anticipadas por D01.

Aunque en D01 no se mencione la especie de la que se obtiene el extracto de huevas de caracol, es de suponer que se utiliza cualquier especie de caracol, pero fundamentalmente *Helix aspersa o pomatia*, dos de las especies que se nombran en la reivindicación 2 y que son las especies más comunes en Francia.

En cuanto al procedimiento de la reivindicación 5 se considera que en lo sustancial (tratamiento únicamente con agua, homogenizado y filtrado) es semejante al que se utiliza para obtener el extracto de D01, con pequeñas variaciones o detalles concretos que cualquier experto en la materia podría llevar a cabo sin ejercer actividad inventiva, y que además, no tienen ningún efecto técnico ventajoso.

En consecuencia, las reivindicaciones 2 y 5 carecen de actividad inventiva en vista de lo divulgado en D01.

En el documento D02 las huevas de caracol se someten a una serie de procesos físicos o químicos que incluyen el lavado y el filtrado para obtener un producto líquido rico en proteínas y que se utiliza en preparaciones cosméticas para prevenir la senilidad, las arrugas y nutrir la piel. Tampoco este producto se diferencia del de la reivindicación 1, por lo que se considera que D02 afecta a la novedad del producto de la reivindicación 1 y a del uso de la reivindicación 3.

El documento D03 describe un procedimiento para obtener un polvo de huevas de caracol que consiste en lavar las huevas, esterilizarlas, triturarlas y filtrarlas. Dicho polvo tendrá moléculas orgánicas e inorgánicas derivadas de huevas de caracol y, por tanto, no se puede diferenciar del de la reivindicación 1 de la solicitud. Se utiliza en una proporción del 50 a 60% para elaborar un medicamento que combate el estrés y la fatiga. Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1 y 4.

Los documentos D04 a D07 citados en el informe reflejan únicamente el estado de la técnica:

El documento D04 se refiere a un método de obtención de un compuesto concreto, la astaxantina, a partir de huevas de caracol.

En D05 se divulga un líquido para uso oral que contiene huevas de caracol en un 2 a 3% y se utiliza para tratar las hemorroides.

El documento D06 divulga la utilización de la baba de caracol (*Helix aspera*), rica en glicopolisacáridos, en una composición para aumentar la proliferación de células madre de la piel.

Por último, el documento D07, trata del cultivo artificial de caracoles.