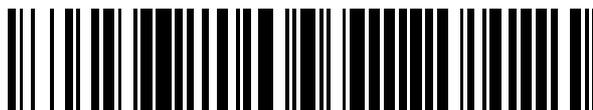


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 977**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61K 31/202** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/375** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 10156458 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2189155**

54 Título: **Composición oral con un efecto antienvjecimiento sobre la piel**

30 Prioridad:

**12.04.2006 EP 06252019**

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

**09.03.2016**

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)  
Weena 455  
3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**CASEY, JOHN;  
JENKINS, GAIL y  
ROGERS, JULIA, SARAH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 562 977 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

Composición oral con un efecto antienvjecimiento sobre la piel

La presente invención se refiere a una composición adaptada para el consumo oral.

5 La mejora del aspecto y la sensación de la piel humana han recibido muchísimo esfuerzo investigador. Sin embargo, la gran mayoría de los productos comercialmente disponibles aborda este problema actuando sobre el exterior de la piel. La forma más común es una crema tópica para la piel. Sin embargo, tales aplicaciones tópicas tienen sus limitaciones y tratan principalmente las capas superficiales muertas de la piel. Es sabido que ciertos ingredientes pueden proporcionar mejoras en el aspecto de la piel y en el mantenimiento de la textura a partir de que se ingieren. Tales ingredientes actúan así desde el interior de la piel y por tanto pueden proporcionar mayores  
10 oportunidades para mejorar la piel accediendo al interior vivo. Además, un efecto tal puede ser percibido por el público general de naturaleza más potente o médico que una aplicación tópica.

Es conocido que el aceite de pescado de dieta presta después de haber sido ingerido una protección significativa frente al eritema inducido por radiación UV.

15 Los carotenoides, tales como licopeno y 3-caroteno, han mostrado también proporcionar protección frente al eritema inducido por UV cuando se inducen por vía oral.

De manera similar, cuando se toman por vía oral combinadas las vitaminas E y C han mostrado también proporcionar protección contra el eritema inducido por UV.

20 El documento U.S. 6.589.535 (Johnson & Johnson) da a conocer un suplemento nutricional que contiene un aceite rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 y un carotenoide en combinación para combatir los efectos perjudiciales de los xenobióticos sobre la piel, en particular sobre el sistema inmune de la piel. Sin embargo, está limitado a suplementos alimentarios tales como cápsulas o comprimidos y no se da a conocer cómo se pueden suministrar tales materiales por medio de una bebida u otro producto alimentario. Se prefiere el aceite de semilla de grosella negra como fuente de los ácidos grasos, aunque contiene el menos eficaz ácido  $\omega$ -3 PUFA  $\alpha$ -linolénico y no es globalmente tan rico en  $\omega$ -3 PUFA como el aceite de pescado.

25 El documento US 2003/0082275 da a conocer una preparación para beber de  $\omega$ -3, que es estable en almacenamiento. La bebida dada a conocer contiene un nivel muy alto de aceite y consecuentemente es inestable, formando una bebida bifásica al almacenarla. Se da como ejemplo una bebida que tiene un 4 % en peso de aceite que da una concentración de  $\omega$ -3 del 1,6 %. Se usa yema de huevo como emulsionante que contiene aproximadamente el 8 % en peso de lecitina.

30 La solicitud de patente internacional, en tramitación, del solicitante, con el n.º: PCT/EP2005/011658 se refiere a emulsiones consumibles estables.

El documento WO 02/074308 describe una composición para la prevención de osteoporosis que comprende una combinación de isoflavonas y ácidos grasos poliinsaturados.

35 El documento US 5.976.606 se refiere a un procedimiento para obtener tofu que contiene DHA o una bebida de leche de soja. El objetivo es evitar el sabor y/o el olor no deseados del aceite de pescado.

El documento EP-A-1340427 divulga leches ácidas que contienen EPA y/o DHA. El documento proporciona formulaciones que son estables frente a la oxidación y la separación de fases.

40 El documento DE-U-20304752 da a conocer una gama de formulaciones antioxidantes nutricionales que contienen diferentes componentes, incluidos cinc, selenio, licopeno, vitamina C, vitamina E, extracto de semilla de uva y ácidos grasos omega-3.

Sigue existiendo la necesidad de composiciones que puedan proporcionar efectos antienvjecimiento beneficiosos a la piel. En particular, existe la necesidad de composiciones que pueden tener efectos intensificados sobre la piel.

De acuerdo con la invención, se proporciona una composición adaptada para consumo oral y capaz de proporcionar un efecto antienvjecimiento en la piel del consumidor, que comprende:

45 (i) un ligando PPAR,

(ii) un agente de unión de un receptor de estrógenos,

(iii) un agente que está implicado en una modificación postraduccional de colágeno y

(iv) un carotenoide,

en la que la composición está sustancialmente libre de cinc y/o selenio añadidos, en la que la composición está en forma de una cápsula, a condición de que cuando la composición contenga al menos el 0,01 % en peso de un emulsionante fosfolipídico de calidad alimentaria; la cantidad total de un ácido docosahexanoico (DHA) y de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la composición sea mayor que el 0,6 % en peso o menor que el 0,024 % en peso;

en la que el ligando PPAR comprende un ácido graso omega-3 seleccionado entre DHA, EPA y mezclas de los mismos,

en la que el agente que está implicado en la modificación postraduccional de colágeno es vitamina C y

en la que el agente de unión del receptor de estrógenos es genisteína.

#### 10 El ligando PPAR

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (abreviadamente aquí PPAR) son factores de transcripción que controlan el metabolismo lipídico. Los ligandos PPAR son conocidos y se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/102337, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

15 El ligando PPAR comprende un ácido graso omega-3 (es decir, un ácido carboxílico insaturado que tiene de 12 a 26 átomos de carbono) seleccionados de DHA, EPA y mezclas de los mismos.

Típicamente, el ácido graso omega-3 está presente en la composición en una cantidad del 0,001 % al 10 % en peso de la composición. Las cantidades más preferidas son del 0,01 % al 5 % en peso o del 0,1 % al 1 % en peso o del 0,1 al 0,5 % en peso.

20 El ácido graso omega-3 está preferiblemente presente en forma de un aceite de pescado o en forma de una fuente microbiana. El ácido graso omega-3 puede estar en forma de un ácido libre, un éster de alquilo C1 a C6, un glicérido (incluyendo mono, di- y tri-glicéridos) o mezclas de los mismos. Preferentemente, el ácido graso omega-3 está en forma de un glicérido (por ejemplo, un triglicérido). Referencia en el presente documento al ácido graso omega-3 quiere decir el ácido libre o los ésteres de alquilo o glicéridos o mezclas de los mismos.

Los ácidos grasos omega-3 son DHA y EPA.

25 DHA es un ácido graso de 22 carbonos  $\omega$ -3 poliinsaturado. También está presente abundantemente en ciertos peces (como atún y pescado azul) y aceites de animales marinos.

Típicamente, la cantidad de DHA en las composiciones de la invención varía del 0,001 % al 10 % en peso de la composición. Las cantidades más preferidas son del 0,01 % al 5 % en peso, tales como del 0,1 % al 1 % de la composición o del 0,1 % en peso al 0,5 % en peso.

30 En una realización alternativa, la composición puede comprender menos del 0,2 % en peso de aceite que comprende DHA. En otra realización alternativa, la composición puede comprender más del 5 % en peso de aceite que comprende DHA.

El DHA puede estar presente junto con EPA.

35 El ácido eicosapentaenoico (EPA) es uno de varios ácidos grasos  $\omega$ -3 usados por el cuerpo. Una ingestión aumentada de EPA ha demostrado ser beneficiosa en enfermedades cardíacas coronarias, presión sanguínea alta y trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide.

40 Los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) proceden de peces de agua fría tales como salmón salvaje (no criado en granja), caballa, sardinas, arenque y otros animales marinos de aguas septentrionales. Los peces pueden producir EPA y DHA a partir del ácido graso  $\omega$ -3 esencial, ácido alfa-linolénico (LNA), pero obtienen gran parte de su EPA y DHA de algas pardas y de algas rojas que producen EPA y DHA a partir de hidratos de carbono – azúcar, almidón, celulosa, etc.

Más recientemente, se ha comenzado a cultivar comercialmente algas pardas y algas rojas para obtener EPA y DHA. Estas producen del 10 al 14 % de ácidos  $\omega$ -3 de cadena larga (basado en el peso en seco) y se pueden usar como fuente de triglicéridos que contienen EPA y DHA.

45 Cuando en las composiciones de la invención están presentes tanto DHA como EPA, la relación ponderal de DHA a EPA normalmente es de 1:10 a 10:1, más preferiblemente de 5:1 a 1:5 y aún más preferiblemente de 3:1 a 1:3, como puede ser de 1:1 a 1:2.

El agente de unión del receptor de estrógenos

Las composiciones de la invención comprenden un agente de unión de receptor de estrógenos. El agente de unión de receptor de estrógenos es preferentemente un producto natural o un derivado o extracto del mismo.

5 El agente de unión de receptor de estrógenos comprende isoflavonas de soja, específicamente la isoflavona de soja es genisteína.

La composición de la invención preferiblemente comprende genisteína en una cantidad del 0,0001 % al 0,1 % en peso, más preferiblemente del 0,001 % al 0,05 % en peso, incluso más preferiblemente del 0,005 % al 0,04 % en peso, lo más preferiblemente del 0,005 % al 0,025 % en peso, tal como del 0,01 % al 0,025 % en peso.

10 Se prefiere que la composición comprenda del 0,0002 al 0,2 % en peso de isoflavonas de soja. Esto es equivalente a de 20 a 200 mg/100 g de la composición. Preferentemente, la composición contiene del 0,02 al 0,05 % en peso de isoflavonas de soja.

15 La genisteína puede estar en forma glucosilada o no glucosilada, o en una mezcla de estas dos formas. La referencia a la genisteína a lo largo de esta memoria descriptiva significa las formas glucosilada o no glucosilada, o mezclas de estas dos formas, a no ser que específicamente se indique lo contrario. Las cantidades de genisteína se calculan sobre la base de la forma no glucosilada (esto es, como si toda la genisteína glucosilada fuera no glucosilada). La genisteína preferiblemente está presente en la composición de la invención como un componente de un producto natural o un extracto o concentrado del mismo. Preferiblemente, el producto natural es soja o trébol rojo, más preferiblemente soja.

20 La genisteína, cuando es de soja, preferiblemente se purifica al menos en cierto grado eliminando la proteína de soja. Por tanto, las composiciones de la invención contienen preferiblemente menos del 1 % en peso de proteína de soja, más preferiblemente menos del 0,5 % en peso de proteína de soja, incluso más preferiblemente menos del 0,1 % en peso de proteína de soja, tal como menos del 0,01 %, o menos del 0,001 % o menos del 0,0001 % en peso. La composición de la invención puede estar libre de proteína de soja o sustancialmente libre de proteína de soja.

25 El agente que está implicado en la modificación postraduccional de colágeno

Las composiciones de la invención comprenden un componente que es un agente (por ejemplo, un compuesto) involucrado en la modificación postraduccional de colágeno

El agente que está implicado en la modificación postraduccional de colágeno es vitamina C.

30 Típicamente, la vitamina C está presente en composiciones de la invención en una cantidad del 0,01 % al 1 % en peso, más preferiblemente del 0,05 % al 0,5 % en peso, lo más preferiblemente del 0,1 % al 0,3 % en peso.

El carotenoide

Las composiciones de la invención contienen uno o más carotenoides.

35 Se prefiere que la composición comprenda del 0,0005 al 0,1 % en peso de carotenoides. Esto es equivalente a de 0,5 a 100 mg/100 g. Preferiblemente, la composición contiene del 0,002 al 0,04 % en peso de carotenoides. Los carotenoides, que son solubles en aceite, estarían preferiblemente comprendidos en la fase oleosa. Son carotenoides altamente preferidos  $\beta$ -caroteno y licopeno. Estos carotenoides proporcionan protección moderada contra el eritema inducido por radiación UV, aunque se cree que es debida a su funcionalidad antioxidante incluyendo la capacidad secuestrante de especies de oxígeno reactivas.

Preferiblemente, el carotenoide se selecciona entre  $\beta$ -caroteno, licopeno y mezclas de los mismos.

40 Típicamente, el carotenoide está presente en una cantidad del 0,001 % al 0,1 % en peso, más preferiblemente del 0,01 % al 0,05 % en peso.

Componentes opcionales

45 Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales opcionales preferidos incluyen los seleccionados entre antioxidantes, agentes aromatizantes, conservantes y estabilizadores y combinaciones de los mismos.

La composición preferiblemente comprende uno o más componentes adicionales seleccionados entre antioxidantes, agentes aromatizantes, conservantes y estabilizadores.

La composición de la invención preferiblemente tiene un pH de 3 a 5, tal como de 3 a 4.

En las composiciones de la invención preferiblemente están presentes uno o más antioxidantes con el fin de evitar o ralentizar la degradación oxidante natural de materiales oxidables, tales como cualquier ácido graso omega-3. El aceite de pescado rancio no solo tiene un sabor desagradable, sino que tiene efectos negativos sobre la salud (Kubow S., "Toxicity of dietary lipid peroxidation products", Trends in Food Sciences & Technology, 6 de septiembre, 67-71 (1990)).

Se pueden seleccionar antioxidantes adecuados, aunque no exclusivamente, entre la siguiente lista, bien individualmente o bien en combinación: TBHQ, ésteres ascorbólicos (por ejemplo palmitato de ascorbilo), ácido ascórbico, tocoferoles, extracto de romero, concentrados o extractos de fruta, extracto de té negro o verde, galato de propilo, aceites esenciales u oleorresinas, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido cítrico o ésteres, coenzima Q10, tocotrienoles, quelantes (por ejemplo EDTA), vehículos, polifenoles, compuestos fenólicos, flavonoides, sequestrantes de oxígeno.

Un antioxidante especialmente preferido es la vitamina E.

Se debe añadir una cantidad de antioxidante suficiente para evitar que el ácido graso omega-3 se enrancie a lo largo de una vida útil habitual de 6 meses. Claramente, la cantidad de antioxidante dependerá del tipo y de la actividad del antioxidante usado.

Para estos propósitos una actividad antioxidante es la medida usando un ensayo apropiado (por ejemplo, capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

Las composiciones de la invención preferiblemente comprenden un aromatizante. Los agentes aromatizantes adecuados pueden ser naturales o sintéticos. Puede requerirse un aromatizante para hacer el producto más atractivo para el consumo.

En otra realización, la composición de la invención comprende menos del 50 % en peso de agua y/o está sustancialmente libre de conservantes y/o de aromatizante.

Se considera preferente que la composición contenga al menos 0,01 % en peso de emulsionante fosfolípido de calidad alimentaria. Preferentemente, el emulsionante está presente en una cantidad del 0,05% al 3% en peso, más preferentemente del 0,1 al 1 % en peso.

Se encontró que los emulsionantes fosfolipídicos son muy adecuados.

Se puede requerir un emulsionante fosfolípido de calidad alimentaria con el fin de estabilizar la composición como una emulsión de aceite en agua. Se prefiere que el emulsionante fosfolípido sea lecitina. Los emulsionantes fosfolipídicos son solubles en aceite, pero la lecitina se puede añadir en cualquier fase antes de emulsionar. Preferiblemente, se añade a la fase acuosa.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende menos del 0,01 % en peso de un emulsionante fosfolípido de calidad alimentaria.

La composición de la invención típicamente se consume de una a cuatro veces al día (preferiblemente una vez al día).

Las composiciones de la invención están sustancialmente libres de cinc y/o selenio añadidos. Las composiciones de la invención pueden contener vestigios de cinc y/o selenio de los componentes comercialmente disponibles de la composición, pero no contienen cinc o selenio añadidos en forma de sus metales o sales. Así, las composiciones de la invención, pueden contener, por ejemplo, menos de 0,5 mg de cinc y/o menos de 0,01 mg de selenio o menos del 0,0005 % de cinc y menos del 0,00001 % de selenio, respectivamente, más preferiblemente menos del 0,0001 % de cinc y menos del 0,000005 % de selenio.

Las composiciones específicas de la invención incluyen lo siguiente:

Composiciones que comprenden:

(i) un ácido graso omega-3, seleccionado de DHA y/o EPA;

(ii) genisteína, preferentemente a partir de isoflavona de soja;

(iii) vitamina C; y

(iv) un carotenoide.

Composiciones que comprenden:

- (i) un ácido graso omega-3, seleccionado de DHA y/o EPA;
- (ii) genisteína, preferentemente a partir de isoflavona de soja;
- (iii) vitamina C; y
- 5 (iv) beta-caroteno y/o licopeno.

La relación ponderal de (i) a (ii) en las composiciones de la invención preferiblemente es de 100:1 a 1:10, más preferiblemente de 50:1 a 1:1, aún más preferiblemente de 40:1 a 10:1.

#### Forma del producto

10 La composición de la invención es comestible y preferiblemente está basada en agua, esto es comprende al menos aproximadamente el 50 % en peso de agua, preferiblemente al menos el 60 % de agua o incluso al menos el 70 % en peso de agua. Puede ser líquida o congelada. El producto tiene así la sensación de ser un producto normal basado en agua y se puede consumir regularmente como parte de una dieta normal del consumidor. Por ejemplo, podría reemplazar un zumo de fruta normalmente consumido en el desayuno.

15 La composición de la invención puede tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, de productos alimentarios y suplementos nutricionales. Entre las composiciones para consumo oral que se pueden usar de acuerdo con la invención figuran bebidas, barras y otras formas líquidas y sólidas tales como comprimidos, píldoras, cápsulas y polvos (que pueden contener material cristalino) así como pastas para untar, margarinas, cremas, salsas, condimentos, mahonesas, helados, rellenos, repostería y cereales.

20 Preferiblemente las composiciones de la invención están en forma de una emulsión, suspensión o dispersión acuosa sustancialmente homogéneas.

La composición de la invención está envasada preferiblemente como una bebida.

Preferiblemente la composición tiene una viscosidad de 2 a 100 mPa.s para una velocidad de cizallamiento de  $1 \text{ s}^{-1}$  y a 25 °C.

25 La composición de la presente invención se puede preparar a partir de una fase acuosa y una fase oleosa. En general, los ingredientes solubles en agua se ponen juntos en la fase acuosa y los ingredientes solubles en aceite en la fase oleosa. La excepción es el emulsionante. Se ha encontrado sorprendentemente que el emulsionante, que es soluble en aceite, da una emulsión más estable cuando se añade a la fase acuosa.

Las dos fases se mezclan entonces en un equipo emulsionante convencional. La emulsión producida es de larga duración y el aceite no se enrancia durante meses.

30 La fase oleosa y la fase acuosa se mezclan luego formando una emulsión homogénea estable.

En un procedimiento preferente, el aceite está sobre un material vehículo en polvo para coadyuvar a la formación de la emulsión.

35 La emulsión estable se puede envasar luego en un recipiente cerrado tal como un recipiente metálico, de cartón revestido, (por ejemplo, tetraPak) o de plástico. Preferiblemente luego se cierra el recipiente para que no quede espacio en la cabecera o un espacio de la cabecera lleno de gas (por ejemplo nitrógeno o dióxido de carbono). Esto ayuda aún adicionalmente a evitar la oxidación.

Alternativamente, la emulsión se puede congelar y envasar y vender al consumidor como un producto congelado.

#### Usos de la invención

La composición de la invención preferiblemente es capaz de aumentar la síntesis de colágeno en la piel.

40 La composición puede producir en la piel un efecto antienvjecimiento. Por el término "antienvjecimiento" se entiende que la piel puede parecer menos arrugada (esto es, hay un efecto antiarrugamiento sobre arrugas y/o líneas finas, incluida una reducción de la profundidad de la arruga) y que la composición puede impartir uno o más beneficios adicionales para la piel, seleccionados entre: sequedad reducida, consistencia aumentada, elasticidad aumentada; suavidad aumentada; piel más clara; menos manchas, espinillas y marcas (incluyendo acné); piel más clara; piel menos sensible; y en general piel más sana.

45 Las composiciones de la invención pueden presentar el efecto antienvjecimiento por aumentar la síntesis de

5 colágeno en la piel y las composiciones de la invención pueden usarse para aumentar la síntesis de colágeno (como parte, o separadamente, del efecto antienvjecimiento); preferiblemente la síntesis de colágeno se aumenta en al menos el 10 %, más preferiblemente en al menos el 20 % tal como puede ser en al menos el 25 % en peso (por ejemplo, según se determinó sobre la base del peso de colágeno sintetizado preferiblemente en un período de 14 semanas).

La piel puede incluir la piel del cuerpo entero, preferiblemente la cara, el cuello y/o las manos. La piel puede ser también piel del cuero cabelludo con beneficios para el cabello (incluido el envejecimiento reducido) y para el picor o la irritación.

10 Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la invención y no limitan de forma alguna su ámbito. En los ejemplos y a lo largo de esta memoria descriptiva, todos los porcentajes, partes y relaciones son en peso a no ser que se indique lo contrario.

### Ejemplos

#### Determinación del aumento de la síntesis de colágeno

##### Exposición general del enfoque experimental

15 Se desarrolló un ensayo bioquímico y un procedimiento de extracción de proteínas para determinar cambios en síntesis de colágeno nueva en la piel.

a. Se tomaron biopsias de la piel en la línea de base (T1) y al final (T15) del período de intervención.

b. Se tomaron en cada punto temporal, dos biopsias por punción de 3 mm (profundidad de 4 mm), se pusieron en un criotubo e inmediatamente se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

20 c. Estas biopsias se almacenaron luego a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### Materiales y procedimientos

##### Preparación del lisado celular

25 Todas las biopsias se pusieron en un homogeneizador de tipo Dounce con 1 ml de tampón de lisis celular y se molieron completamente (hasta que no quedaran grumos de piel o matriz extracelular). El tampón de lisis contenía NP-40 al 1 %, desoxicolato sódico al 0,1 %, SDS al 0,1 %, cloruro sódico 6 mM y Tris 0,05 M a pH 7,6. Antes del uso se añadió un cóctel inhibidor de proteasa (1000X; Sigma P8340) a un nivel de 10  $\mu\text{l}$  por ml de tampón de lisis. Después de la homogeneización completa del tejido, se eliminó por centrifugación durante 20 min a 20.000 g a 4  $^{\circ}\text{C}$  el desecho de células innecesarias. Se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que fue necesario el lisado de células clarificado.

##### Ensayo del total de proteínas (Pierce)

35 La concentración del total de proteínas de cada lisado de células se midió usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA., Se preparó a partir de una solución madre de BSA de 2 mg/ml un conjunto de 8 soluciones patrón del intervalo de 0 a 1200  $\mu\text{g/ml}$ . Se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de lisado patrón o de células a pocillos duplicados de una placa de microtitulación de 96 pocillos, de fondo plano. La solución de reactivo se preparó de acuerdo con las instrucciones del kit a partir de 50 partes de reactivo A y 1 parte de reactivo B. A cada pocillo de la placa de microtitulación se añadieron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo final. Se mezcló la placa, se cubrió e incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min y se midió la absorbancia a 562 nm. Se creó una curva patrón de proteínas y se usó para determinar la concentración de proteína de cada lisado de células.

##### Péptido IC de Procolágeno. KIT EIA (Takara Bio Inc.)

40 Se sintetiza Colágeno I como una molécula precursora, Procolágeno I. La cantidad de péptido libre por lo tanto, refleja estequiométricamente la cantidad de colágeno I sintetizado. El kit de Inmunoensayo Enzimático (EIA) de Péptido C-terminal de Procolágeno de Tipo I permite la determinación cuantitativa de Péptido C-terminal de Procolágeno de Tipo I (PIP).

45 Se prepararon 8 patrones de PIP en diluyente de muestra a concentraciones variables entre 0 y 640 ng/ml. A pocillos duplicados se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de anticuerpo-conjugado de peroxidasa y 20  $\mu\text{l}$  de lisado de células (1  $\mu\text{g}$  de proteína) o patrón. Se selló la placa y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 3 h antes de lavarse tres veces con 400  $\mu\text{l}$  de PBS. Cada pocillo recibió después 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato y se incubó la placa a temperatura ambiente en la cabecera del banco durante 15 min. Después de este periodo, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de solución de parada y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de placas.

Se trazó una curva patrón de absorbancia media frente a concentración de PIP y se calculó la línea de mejor ajuste por análisis de regresión. La concentración desconocida de PIP en todas las muestras se estimó a partir de esto.

#### Medida de la hidratación de la piel

Diversos procedimientos para determinar el estado de hidratación del estrato córneo se han resumido por Fluhr y cols., *Skin Res Technol.* 1999, 5:161-170. En resumen, el Corneómetro (Courage & Khazaka) mide la hidratación de la piel mediante la detección de la capacitancia epidérmica. La sonda se hace de dos placas metálicas de tipo dedo próximas entre sí, con una profundidad de medida de aproximadamente 30 mm. El instrumento determina el nivel de humedad de las capas cutáneas más externas del estrato córneo. El principio de acción del Corneometer® está basado en la modificación de las capacidades eléctricas del detector que está diseñado en forma de un condensador. La superficie de la cabeza de medición, en contacto con la piel, modifica su capacidad eléctrica de acuerdo con el nivel de humedad de la piel. Un aumento del valor medido por el corneómetro es indicativo de mejora de hidratación de la piel.

#### Medida de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

Un análisis de los procedimientos para medir la TEWL se ha llevado a cabo por Wilson & Malbach (1989) *Transepidermal water loss, A review*, en: *Cutaneous Investigación in Health and Disease, Non Invasive Methods and Instrumentation* (Leveque, J.J. eds), págs. 113-130, Dekker, Nueva York, NY. La barrera cutánea actúa como un regulador en el equilibrio hídrico de la piel. Cuando este se estropea, el sistema de regulación de intercambio de agua llega a desestabilizarse. Esto significa que el agua emigra más fácilmente al medio externo, aumentando la pérdida de agua transepidérmica. La eficiencia de la barrera cutánea disminuye con la edad. Sin embargo, si mejora el estado de la barrera cutánea, la pérdida de agua disminuye a medida que el mecanismo de regulación del intercambio de agua recupera su equilibrio. Las mediciones de la pérdida de agua transepidérmica se pueden realizar con un "Evaporimeter" EP®. Una sonda hecha con dos captadores se atraviesa por una corriente de vapor de agua. La diferencia de la presión parcial se mide entre los dos captadores. Este valor corresponde a la velocidad de evaporación de una sustancia volátil (en este caso, agua). Una reducción de la TEWL es indicativa de mejora de las propiedades de la piel.

#### Medida de la elasticidad y firmeza de la piel

Las mediciones de la elasticidad y la firmeza de la piel se hacen con un cutómetro y se describe por Escoffier y cols., *J. Invest. Dermatol.* 93(3): 353-7. La medición se hace con un instrumento que, usando el principio del vacío, sorbe una zona definida de superficie de la piel y la registra ópticamente. El análisis de las curvas de medidas registradas hace posible determinar las características elásticas y plásticas de la piel. La piel nueva muestra un grado alto de elasticidad y pierde la forma sólo gradualmente mientras que recupera su estado original al terminar el proceso de succión. La piel que es joven, sana, elástica y adecuadamente húmeda tendrá una elasticidad más alta que una piel rugosa, seca envejecida. El cutómetro da por lo tanto una serie de mediciones que permite a los autores de la invención cuantificar las características elásticas. La técnica consiste en aspiración cutánea con una sonda de medición. La piel se succiona dentro del orificio de la sonda por la presión negativa creada dentro del dispositivo. La profundidad a la que penetra la piel en la sonda se mide mediante un sistema de medición óptica sin contacto. Este sistema consiste en una fuente luminosa y receptor de luz, así como por dos prismas uno frente al otro, que proyectan la luz desde el transmisor al receptor. La intensidad de la luz varía con la profundidad de penetración de la piel. La resistencia de la piel a succionarse da una indicación de la firmeza de la piel y la capacidad de retornar a su posición original da una indicación de la elasticidad de la piel. Al final de cada medición se muestra una curva que permite hacer varios cálculos que corresponden a las propiedades mecánicas de la piel.

#### Análisis de las líneas finas, arrugas y suavidad de la piel

La rugosidad y las arrugas de la piel se pueden estimar usando réplicas y perfilometría de la piel según se describe por Cook, *J. Soc. Cosmet Chem.*, 1980, 31:339-359. Se prepara un material de caucho de silicio tal como Silflo y se aplica a la zona de ensayo. Una vez constituido ello se quita y analiza usando perfilometría óptica. Con este procedimiento de ensayo, se proyecta un modelo de tira paralela sobre la superficie de la piel y se reproduce en el chip de CCD de una cámara. La medición en 3 dimensiones se logra por el hecho de que diferencias en la evaluación mínimas en la superficie de la piel desvían las tiras de proyección paralelas y que estas desviaciones constituyen una medición cualitativa y cuantitativa del perfil de la piel. Los perfiles de la piel se registran por la cámara de CCD, se digitalizan y se transfieren a la calculadora de medición y evaluación para evaluación cuantitativa.

#### **Ejemplo 1 - Composición de la invención**

La siguiente es una composición de la invención.

## ES 2 562 977 T3

Ingrediente	% en peso
Aceite de pescado (que contiene DHA y EPA al 12 %)	3,2
Isoflavona de soja (al 40 %)	0,083
Vitamina C	0,17
Vitamina E	0,25

Lycopeno (activo al 20 %)	0,027
Betacaroteno (al 30 %)	0,008
Ácido cítrico	0,18
Aromatizante, edulcorante, espesante, emulsionante	a voluntad
Agua	Hasta el 100 %

La composición se puede preparar añadiendo los componentes a agua y homogeneizando la mezcla.

### Ejemplo 2

Se ensayó una formulación de la invención en un período de 14 semanas y dio los resultados siguientes:

Medida	Procedimiento	Cambio después de 14 semanas (media de 50)	
		Placebo	Ensayo
Color de piel (b*)	Cromómetro (unidades arbitrarias)	-0,2	0,72
Firmeza de la piel	Cutómetro (Ur/Uf)	-0,027	0,022
Profundidad de la arruga	Análisis PRIMOS de réplicas de piel (valor Rz)	7,82	-5,74
Procolágeno I	ELISA (%)	3	24,3

- 5 La Figura 1 muestra una réplica de la región de la piel en torno al ojo del consumidor antes del tratamiento con la composición (lado izquierdo de la Figura) y después de consumir la composición durante 14 semanas (lado derecho de la figura).

La Figura 2 es una comparación equivalente del mismo tipo que la Figura 1 para una parte diferente de la piel en torno al ojo del consumidor.

- 10 En ambas Figura 1 y Figura 2, es evidente una reducción notoria en arrugas después del consumo de la composición.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición adaptada para consumo oral y capaz de proporcionar un efecto antienvjecimiento en la piel del consumidor, que comprende:

(i) un ligando PPAR;

5 (ii) un agente de unión de un receptor de estrógenos;

(iii) un agente que está implicado en la modificación postraducciona de colágeno; y

(iv) un carotenoide,

10 en la que la composición está sustancialmente libre de cinc y/o selenio añadidos, en la que la composición está en la forma de una cápsula, a condición de que cuando la composición contenga al menos el 0,01 % en peso de un emulsionante fosfolipídico de calidad alimentaria, la cantidad total de ácido docosahexanoico (DHA) y de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la composición sea mayor que el 0,6 % en peso o menor que el 0,024 % en peso;

en la que el ligando PPAR comprende un ácido graso omega-3 seleccionado entre DHA, EPA y mezclas de los mismos,

15 en la que el agente que está implicado en la modificación postraducciona de colágeno es vitamina C y en la que el agente de unión del receptor de estrógenos es genisteína.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la relación ponderal de (i) a (ii) es de 100:1 a 1:10.

3. Composición según la reivindicación 1, en la que el ácido graso omega-3 está presente en una cantidad del 0,01 % al 1,0 % en peso.

20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la genisteína está presente en una cantidad del 0,01 % al 0,1 % en peso.

5. Composición según la reivindicación 1, en la que la vitamina C está presente en una cantidad del 0,01 % al 1,0 % en peso.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el carotenoide se selecciona entre  $\beta$ -caroteno, licopeno y mezclas de los mismos.

25 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el carotenoide está presente en una cantidad del 0,001 % al 0,1 % en peso.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende uno o más componentes adicionales seleccionados entre antioxidantes, agentes aromatizantes, conservantes y estabilizadores.

30 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es capaz de aumentar la síntesis de colágeno en la piel.

Fig.1.

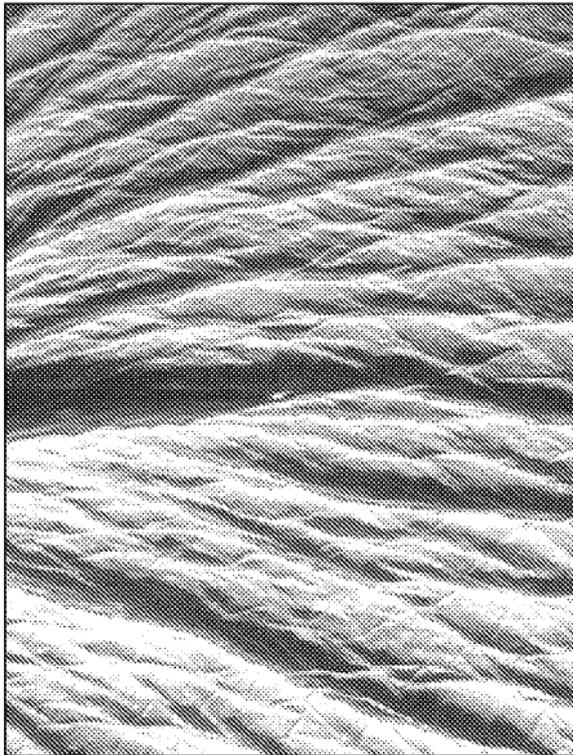
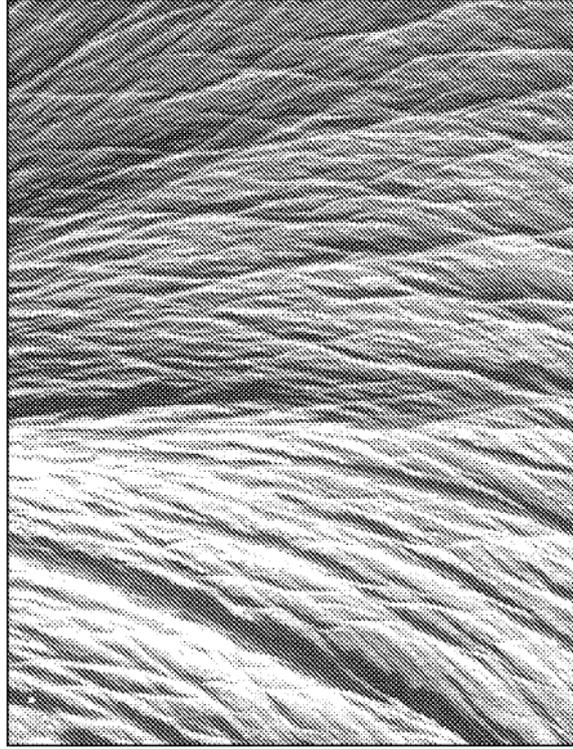


Fig.2.

