

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 558**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/537 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2014 E 14153316 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2762131**

54 Título: **Uso de extractos de Salvia haenkei en composiciones contra la senescencia**

30 Prioridad:

31.01.2013 IT RM20130063

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

12.04.2017

73 Titular/es:

**ALIMONTI, ANDREA (100.0%)
Piazza del Governo 4
6500 Bellinzona, CH**

72 Inventor/es:

**ALIMONTI, ANDREA y
MATIC, IVANA**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ PÉREZ ZABALGOITIA, Miren
Edurne**

ES 2 608 558 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de extractos de *Salvia haenkei* en composiciones contra la senescencia

- 5 La presente invención se refiere a compuestos con actividad contra la senescencia, en particular, a extractos de *Salvia haenkei* y a composiciones que comprenden dichos extractos.

Estado de la técnica anterior

- 10 La senescencia celular es una detención del crecimiento celular irreversible que sucede en todas las células del organismo humano durante el envejecimiento. La mayoría de las células no pueden dividirse indefinidamente debido al acortamiento progresivo de sus telómeros. De hecho, después de solo 50-60 duplicaciones de la población de células (límite de Hayflick) detienen su crecimiento, a pesar de seguir metabolizando y produciendo ATP.

- 15 Las células pueden convertirse en senescentes prematuramente como resultado de agresiones estresantes, tales como oncogenes, pérdida de genes supresores de tumores y daño del ADN (inducido por la radiación UV o por el estrés oxidativo, tal como después de la acumulación de ROS). Este fenómeno se denomina senescencia prematura, ya que se produce rápidamente después de que ocurra el evento desencadenante.

- 20 Estudios recientes han identificado un nuevo tipo de respuesta de senescencia celular, que se produce de forma aguda después de la inactivación del supresor de tumores PTEN, un regulador esencial de la vía PI3K en células de ratón y humanas primarias. Es importante destacar que la senescencia también puede suceder en las células cancerosas que han perdido completamente PTEN, o puede ser inducida en células de cáncer humano después de la inhibición farmacológica de PTEN (Alimonti et al. J Clin Invest. 2010,681-93 y Lin HK et al. Nature, 2010, 464 (7287): 374-9).

Por lo tanto, PTEN y los genes pertinentes de senescencia adicionales pueden ser las dianas de la terapia pro-senescencia para el cáncer.

- 30 La vía PI3K/AKT también está implicada en la senescencia replicativa y el envejecimiento. De hecho, la inhibición de mTOR, un componente fundamental de esta vía, puede prevenir la senescencia mediante el bloqueo de p53 y la disminución del envejecimiento en un modelo de ratón (Alimonti et al. J Clin Invest. 2010). Esto se confirmó en un estudio reciente, en donde la rapamicina - un inhibidor de mTOR, cuando se administra en una fase tardía de la vida, prolonga la vida de los ratones tratados. La vía PI3K/AKT también está implicada en la senescencia celular inducida por UV (fotoenvejecimiento). De hecho, los últimos hallazgos muestran que la irradiación UV puede activar AKT y mTOR, aumentando así la senescencia.

- El fotoenvejecimiento de la piel es principalmente una consecuencia de la exposición a la irradiación UV durante la vida, y se caracteriza por la formación de arrugas, cambios en la pigmentación, agrietamiento y pérdida de elasticidad de la piel.

- 45 Del mismo modo, la exposición de la piel a una radiación distinta a la UV, por ejemplo, durante la exposición a radiación X (por ejemplo, durante los tratamientos de radioterapia para el cáncer), puede tener como resultado efectos secundarios agudos que puedan suponer una limitación del tratamiento. Por lo general, la piel comienza a adquirir un tono rosa y duele durante el tratamiento de radioterapia. La reacción puede agravarse durante el tratamiento y durante hasta aproximadamente una semana después del final de la radioterapia.

- Dado que se cree que la senescencia celular es un elemento esencial (causal) del envejecimiento, la investigación científica se centra en el desarrollo de terapias eficaces para prevenir y retrasar la senescencia celular. Sin embargo, solo unos pocos compuestos han demostrado efectos anti-senescentes potentes *in vivo* y se han hecho varios esfuerzos para desarrollar ensayos para la identificación de nuevos compuestos contra la senescencia.

- Dada la importancia de la senescencia celular para patologías como el cáncer y el envejecimiento, existe una gran necesidad de un método que permita una identificación rápida y eficaz de nuevos compuestos pro- y contra la senescencia.

- 55 En la Solicitud de patente PCT WO2009046436 (Alimonti et al.), 6 de octubre de 2008, se describe un método de selección basado en células MEF Pten nulo ($Pten^{-/-}$) para evaluar la capacidad de un compuesto para alterar el estado de senescencia de una célula. De hecho, para evaluar compuestos candidatos, las células MEF $Pten^{Lx/Lx}$ deben infectarse con vectores retrovirales Cre, a continuación, seleccionarse durante 2 días y finalmente sembrarse para el experimento. La posibilidad de que la infección sea óptima es generalmente del 50 % de los casos, y muy a menudo el porcentaje de células infectadas es muy bajo. Esto reduce notablemente el número de compuestos candidatos que se pueden analizar en el ensayo. Por otra parte, las células MEF $Pten^{Lx/Lx}$ deben regenerarse continuamente mediante cruzamiento con ratones $Pten^{Lx/Lx}$. Estos ratones se sacrifican posteriormente para obtener las células MEF (o "MEF" necesarias para el ensayo).

Fengemei et al "A study of scavenging effects of Chinese medicine on superoxide anion radicals by pulse radiolysis" (Radiation Physics and chemistry, 1993) divulga el uso cosmético de un extracto de *S. miltiorrhiza*.

5 Fournet et al. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants (Journal of Ethnopharmacology 1994) divulgan el uso de *Salvia haenkei* como antipirético y diurético.

Almanza et al "Clerodone Diterpenoids and an Ursane Triterpenoid from *Salvia Haenkei*" (1997 Tetrahedron) es un estudio científico sobre la constitución química de los terpenoides.

10 Topcu G. "Bioactive triterpenoids from salvia species" (Journal of natural products, American chemical society 2006) es un documento de revisión que resume el conocimiento sobre el extracto de plantas de *Salvia*. Es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto que resuelva las ventajas antes mencionadas.

Sumario de la invención

15 Un primer objeto de la invención es un uso cosmético de un extracto de *Salvia haenkei* para la mejora y/o la prevención de los signos del envejecimiento de la piel, cabello, uñas, mucosa bucal, tejidos gingivales y mucosa vaginal. Un segundo objeto de la invención es una composición cosmética que comprende un extracto de *Salvia haenkei* y uno o más vehículos cosméticamente aceptables para la administración tópica, en la que dicha composición está en la forma de aceite, emulsión, crema, aerosol, pomada, gel, suero.

20

Un cuarto objeto de la invención es un extracto de *Salvia haenkei* para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con el envejecimiento celular, en el que dicha enfermedad asociada con el envejecimiento celular se selecciona de entre progeria, artrosis, aterosclerosis, demencia senil y tumores.

25 Otras ventajas, así como las características y las etapas operativas de la presente invención se harán evidentes en la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones preferidas de la misma.

Descripción detallada de las figuras

30 La Fig. 1 es una representación esquemática del método divulgado en la presente memoria.

La Fig. 2 es un diagrama que muestra los compuestos que han dado positivo. En total, se ensayaron 1.465 compuestos, de los cuales: 1.000 productos químicos, 313 extractos de plantas y 152 extractos marinos. En comparación con los productos químicos, que mostraron un porcentaje muy bajo de principios activos contra la senescencia (8 de 1.000), los compuestos naturales demostraron ser una fuente valiosa de principios activos contra la senescencia (18 extractos activos tienen un efecto estadísticamente significativo sobre uno o más de los parámetros utilizados en el ensayo de selección, tal como se representa en la Fig. 2). El criterio para señalar a los compuestos contra la senescencia se basa en la evaluación del crecimiento de células en contacto con ese compuesto dado y en el porcentaje de células positivas para β -gal. Las células no sometidas a la inducción de la senescencia debido a la anulación del gen *Pten* siguen proliferando en el cultivo y su número es mayor que el de las células que entran en senescencia y detienen la proliferación (control). Un aumento de ≥ 40 % en el crecimiento de las células tratadas con respecto al control no tratado se considera un indicador importante de un posible efecto contra la senescencia de los compuestos. En la Fig. 2, se representan 18 compuestos capaces de aumentar el crecimiento de células *Pten*^{-/-} de una manera estadísticamente significativa (un aumento del crecimiento de 40 % o más). Estos compuestos se han ensayado para la expresión de la β -galactosidasa, un marcador de la inducción de la senescencia; el extracto de *Salvia haenkei* confirmó su actividad contra la senescencia, por lo tanto, se probó en más pruebas de fotoenvejecimiento y en modelos de senescencia replicativa.

50 Fig. 3 - Senescencia replicativa (protocolo 3T3) en fibroblastos WI38 tratados con extracto de *Salvia haenkei*.

Fig. 4 - Senescencia y muerte celular en cultivos celulares de fibroblastos WI38 (Código de cultivo celular: CCL-75tm) tratados con extracto de *Salvia haenkei* en diferentes pases.

55 Fig. 5 - Proliferación inducida en cultivos primarios de células humanas (Código de cultivo celular: CCL-75tm) tratados con extracto de *Salvia haenkei* y Nutlin-3 (control positivo) en el ensayo de la senescencia inducida por radiación UV.

60 Fig. 6 - Senescencia en cultivos de células humanas primarias (Código de cultivo celular: CCL-75tm) tratados con radiación UV en presencia de extracto de *Salvia haenkei*.

Fig. 7 - Porcentaje de muerte celular en las células no irradiadas (Código de cultivo celular: CCL-75tm) y en las células irradiadas con UV en presencia de diferentes concentraciones de extracto de *Salvia haenkei*.

65

Descripción detallada de la invención

El método *in vitro* divulgado en la presente memoria permite detectar la actividad contra la senescencia o pro-senescencia de un compuesto candidato, tal como un extracto natural o un compuesto sintético.

5 El método comprende una primera etapa a), en la que se proporciona una línea celular manipulada genéticamente de modo que pueda ser inmortalizada de manera reversible, que carece de un gen *Pten* funcional (*pten nulo*^(-/-)). En una realización preferida dichas células se obtienen de células MEF (Fibroblastos de embriones de ratón) aisladas y cultivadas a partir de fetos de ratones homocigotos PTEN IxP/IxP recogidas de ratonas preñadas de 13 días (los ratones de este tipo se identifican, por ejemplo, por el código de referencia *Jax Lab B6.129S4-Pten tm1HwulJ-Homocigoto para Pten^{tm1Hwu}*). Las células aisladas se pueden convertir en *Pten* nulo con un vector retroviral Cre; ejemplos de vectores adecuados son los vectores de recombinasa Cre. Las células pueden ser inmortalizadas de manera reversible por transfección con vectores adecuados, preferiblemente podría usarse un vector retroviral inducible por doxociclina, tal como, por ejemplo, un vector lentiviral TRIPZI-shp53 (inducible por doxociclina (DOXO)). El mismo resultado se puede obtener si MEF PTEN IxP/IxP se infectan primero con TRIPZI-shp53 y posteriormente con vectores de recombinasa Cre.

20 En la segunda etapa b), la línea celular proporcionada en la etapa a) se lleva de nuevo a un estado no inmortalizado. En una realización, las células se convirtieron en no inmortalizadas mediante la reactivación del gen p53 después de la extracción de doxociclina del medio de cultivo. Por lo tanto, no hay necesidad de infectar de forma continua MEF *Pten Lx/Lx* primarias y sacrificar innecesariamente a los animales. Además, dado que las MEF en presencia de doxociclina se inmortalizan, millones de células pueden ser fácilmente sembradas sobre ellas para probar miles de compuestos y extractos, sembrando tantas células como sea necesario para la selección. La reactivación de p53 provoca que las células vuelvan a entrar en senescencia desde el día 2. El pico de células β-galactosidasa positivo y de células detenidas se produjo en el día 9 después de la eliminación de la doxociclina.

30 En la tercera etapa c) del método, el compuesto candidato, cuya actividad anti- o pro-senescencia debe detectarse, se pone en contacto con las células preparadas en b). Los compuestos y extractos pueden, por ejemplo, administrarse a las células a partir de 1-3 días después de la eliminación de DOXO.

35 En la cuarta etapa d) del método, se evalúa la proliferación celular de las células después del contacto con el compuesto candidato a ser analizado. La evaluación del efecto pro-senescencia o contra la senescencia del compuesto candidato podría llevarse a cabo basándose en la proliferación celular evaluada, por ejemplo, con un ensayo de tinción citológica, utilizando la tinción de cristal violeta y/o determinando al mismo tiempo la expresión de la β-galactosidasa de las células después del contacto con el compuesto candidato. Los compuestos que aumentan la proliferación de las células PTEN^{-/-} (evaluados, por ejemplo, usando el ensayo de tinción con violeta cristal estándar) y/o disminuyen su actividad β-galactosidasa se consideran contra la senescencia, mientras que los compuestos que disminuyen la proliferación de las células PTEN^{-/-} y/o aumentan su actividad β-galactosidasa, se consideran pro-senescencia.

40 El método comprende una etapa adicional e) en la cual se pone en contacto el compuesto candidato con células *Pten*^{-/-} manipuladas genéticamente y células *Pten*^{+/+} (tipo silvestre, *wild type*) manipuladas genéticamente, obtenidas como se describió anteriormente y una etapa f) en la cual se evaluó la proliferación celular de dichas células después del contacto con dicho compuesto. Estas etapas adicionales permiten evaluar la especificidad de los compuestos/extractos seleccionados. Los compuestos candidatos se ensayan posteriormente para determinar su eficacia a diferentes dosis (por ejemplo, cinco concentraciones crecientes diferentes).

45 Los compuestos contra la senescencia se ensayaron después para determinar su eficacia para prevenir tipos adicionales de senescencia, en 3 modelos *in vitro* conocidos: 1) senescencia replicativa en fibroblastos humanos primarios; 2) senescencia inducida por UV en células humanas primarias; 3) modelo de Episkin.

50 Los compuestos seleccionados como pro-senescencia también se ensayaron para determinar su eficacia para inducir la senescencia en: 1) líneas celulares de cáncer humano; 2) células madre de cánceres, de cáncer murino y de cáncer humano; 3) validación *in vivo* en modelos murinos pre-clínicos.

55 Los inventores, utilizando el método divulgado en la presente memoria, han descubierto sorprendentemente que el extracto de la planta *Salvia haenkei* (también conocida en inglés como *Prawn Sage* o *Prawn Chorus* y denominada en la presente descripción también con la abreviatura HAEN) es particularmente eficaz como compuesto anti-envejecimiento. Las propiedades anti-envejecimiento del extracto de *Salvia haenkei* han sido confirmadas además en otros ensayos *in vitro*, como se describe en detalle en la sección experimental de la presente memoria.

60 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención el uso cosmético de un extracto de *Salvia haenkei* como sustancias y composiciones cosméticas anti-envejecimiento que comprenden un extracto de *Salvia haenkei* y uno o más vehículos cosméticamente aceptables. El extracto puede prepararse de acuerdo con los métodos conocidos por un técnico en el campo, por ejemplo, mediante pre-extracción del material vegetal con hexano seguido de la extracción con metanol, o mediante extracción etanólica con pre-extracción mecánica. Para la extracción, por lo general se utilizan las siguientes partes de la planta: tallo, hojas, flores o mezclas de los mismos.

65

- 5 Los vehículos cosméticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y podrían ser seleccionadas en base a la utilización final de la aplicación. Por ejemplo, los vehículos de la presente invención comprenden, pero no se limitan a aquellos que son adecuados para la aplicación sobre la piel. Tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir uno o más diluyentes adecuados para la aplicación en la piel. La cantidad exacta de vehículo podría depender de la cantidad de otros componentes opcionales incluidos en la composición. Por ejemplo, en las composiciones de la presente invención, el vehículo puede ser de aproximadamente 75 a aproximadamente 99,99 % en peso de la composición.
- 10 Las composiciones pueden ser formuladas de varias maneras, incluyendo pero sin limitarse a las emulsiones. Por ejemplo, las emulsiones adecuadas incluyen emulsiones de aceite en agua, agua-en-aceite, agua-en-aceite-en-agua, aceite-en-agua-en-aceite y aceite en agua en silicona. Las composiciones preferidas comprenden emulsiones de aceite-en-agua.
- 15 Las composiciones de la presente invención se pueden formular en una variedad de tipos de productos, incluyendo champús, cremas, ceras, pastas, lociones, leches, espumas, geles, aceites, emulsiones y aerosoles. Las composiciones preferidas se formulan en aceite, suspensión, emulsión, crema, aerosol, pomada, polvo, gel, suero o líquido. Estas formas de producto pueden utilizarse para una serie de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a lociones para manos y cuerpo, cremas hidratantes para la cara, cremas contra el acné, sombras de ojos, barras de labios, cremas solares y similares. Los posibles componentes adicionales necesarios para formular tales productos varían con el tipo de producto y pueden ser seleccionados por el técnico en el campo en base a la técnica conocida.
- 20 Las composiciones pueden comprender agentes hidratantes, emolientes y humectantes, por ejemplo, aceites, grasas, ceras, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, etoxilatos de ácidos grasos, glicoles, azúcares, ácido hialurónico, ciclometicona y similares. Otros ejemplos se pueden encontrar en el Diccionario Internacional de Ingredientes Cosméticos, CTFA. Las composiciones de la presente invención se podrían formular tanto para administración tópica como sistémica (por ejemplo, oral, intravenosa, transmucosa o intramuscular) dependiendo de la aplicación final. Las composiciones en forma oral son, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, polvos, gránulos.
- 25 Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenderán, por ejemplo, entre 0,001 y 45 %, preferiblemente entre 0,01 y 4 % de extracto.
- 30 La formulación también puede comprender componentes que se seleccionan dependiendo del vehículo y/o la utilización prevista en la formulación. Otros componentes incluyen, pero no se limitan a antioxidantes, agentes quelantes, estabilizadores de emulsión, conservantes, perfumes, agentes aromatizantes, humectantes, agentes impermeabilizantes, polímeros catiónicos, polímeros aniónicos, vitaminas, y similares. Las composiciones pueden comprender uno o más componentes adicionales activos, para preparar una composición tanto cosmética como farmacéutica.
- 35 De acuerdo con una realización preferida, las composiciones de la invención podrían comprender además extractos de salvia, romero, *Galega officinalis*, lavanda, *Angelica archangelica*, *Olea europaea* y/o imperatonina.
- 40 El extracto de *Salvia haenkei* y las composiciones de la presente invención podrían ser utilizadas como cosméticos para la prevención y/o ralentización del envejecimiento celular no asociada a afecciones patológicas, o para su uso en el tratamiento (se entiende también como prevención) de enfermedades asociadas con el envejecimiento celular.
- 45 El uso cosmético comprende, por ejemplo, la mejora y/o la prevención de los signos de envejecimiento cutáneo (piel), tales como arrugas, disminución de la tersura y/o luminosidad de la piel y similares, la mejora y/o la prevención de los signos del envejecimiento del pelo, las uñas, la mucosa oral (tejidos gingivales incluidos) y de la mucosa vaginal.
- 50 Ejemplos de enfermedades asociadas con el envejecimiento celular que pueden ser tratadas con el extracto y las composiciones de la presente invención son, por ejemplo, progeria, artrosis, aterosclerosis, demencia senil y tumores, como por ejemplo, gastrointestinales y de próstata.
- 55 En la presente memoria, con la expresión "enfermedades asociadas con el envejecimiento celular" se entiende también enfermedades cuyo tratamiento implica un envejecimiento celular como un efecto secundario, tales como, por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad tumoral con radiación X, que provoca el fotoenvejecimiento y/o la quimioterapia.
- 60 Es un objeto de la presente invención también es un método para la preparación de un extracto de *Salvia haenkei* que comprende las etapas siguientes:
- a) preparar un extracto seco de hojas, tallo y/o flores de *Salvia haenkei*;
- 65 b) someter el extracto seco de la etapa a) a una o más etapas de extracción con disolvente orgánico, como, por ejemplo, etanol y/o metanol;

c) eliminar total o parcialmente el disolvente orgánico del extracto obtenido en el punto b), y opcionalmente, realizar una o más etapas de filtrado y/o concentración.

De acuerdo con una realización, el método para la preparación de un extracto natural de *Salvia haenkei*, p.ej. para uso cosmético, comprende las siguientes etapas: preparar hojas frescas o secas, flores y/o tallo de *Salvia haenkei*, macerar la preparación de *Salvia haenkei* en aceite vegetal o glicerina o extraer la preparación de *Salvia haenkei* por destilación al vapor. De acuerdo con una realización preferida, el aceite vegetal y la glicerina vegetal para la maceración son orgánicos y el agua para la extracción por destilación al vapor es mineral o termal.

Ejemplos destinados a ilustrar mejor los métodos divulgados en la presente memoria descriptiva se presentan a continuación; estos ejemplos no deben ser considerados de ninguna manera como una limitación de la memoria precedente y de las reivindicaciones posteriores.

Ejemplos

Ejemplo 1 Método de selección para identificar compuestos con actividad pro-senescencia o contra la senescencia

Etapas 1

En la primera etapa, los compuestos de los que se va a determinar la actividad pro-senescencia o contra la senescencia se añaden en una sola concentración (0,01 mg/ml) a células MEF (o "MEF") Pten nulo (Pten^{-/-}) inmortalizadas. Estas células se obtienen a partir de ratones PTEN IxP/IxP homocigotos. Ratones PTEN IxP/IxP se cruzan y se recogen los fetos a 13,5 dpc. Las MEF individuales se producen y se cultivan siguiendo los protocolos estándar descritos, por ejemplo, en Alimonti et al. J Clin Invest. 2010.

Las células MEF PTEN IxP/IxP se infectan posteriormente con un vector retroviral recombinasa Cre (Adgene plásmido 21654: pMSCV PIG Cre (vector Puro IRES cre)). Este vector se produce en células de Phoenix, tanto Eco como Ampho, de Life Technology. A continuación se describe el protocolo:

Se transfectan células Phoenix con un 70-80 % de confluencia con el vector retro-Cre utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Al mismo tiempo, se preparan MEF PTEN Ix/Ix con el fin de alcanzar un 70 % de confluencia después de 48 horas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección de las células Phoenix su sobrenadante se utilizó para infectar MEF PTEN Ix/Ix. Para aumentar la eficacia de la infección, se usa *Polybrene* (Santa Cruz) en una concentración de 5 µg/ml. Doce horas después de la primera infección, las MEF PTEN Ix/I se infectan por segunda vez. Veinticuatro horas más tarde, las MEF PTEN Ix/Ix infectadas se tratan con 3 µg/ml de puromicina como factor de selección. Cuarenta y ocho horas después de la incubación con puromicina, se seleccionan las MEF Ix/Ix que pierden PTEN mediante la recombinasa Cre y se convierten en Pten nulo (Pten^{-/-}). Las características anteriormente descritas del vector utilizado permiten una selección rápida y eficaz de las células Pten^{-/-}.

Para alcanzar la inmortalización, las MEF PTEN^{-/-} se infectan con un lentivector TRIPZI-shp53 que es inducible por doxociclina (DOXO). Esta variante permite la inmortalización de las MEF para facilitar procedimientos de selección, costes y tiempos. En presencia de DOXO estas células son inmortales y por lo tanto se pueden dividir de forma indefinidamente *in vitro*. Sin embargo, cuando DOXO se elimina del medio de cultivo estas células sufren senescencia debido a la reactivación de p53. En detalle, las MEF Pten IxP/IxP, producidas y cultivadas como se ha indicado antes, se infectan primero con un vector -shp53 TRIPZI que es inducible por doxociclina (DOXO). Dos días después de la infección, las células se seleccionan con la adición de puromicina y se dividen en varios pases antes de ser infectadas con pMSCV higo-Cre (Addgene plásmido 34565). Las células se seleccionan a continuación con higromicina durante 48 h. Después de la selección las células se convierten en Pten^{-/-}; p53^{-/-} en presencia de DOXO. Después de eliminar DOXO, las MEF se convierten en Pten^{-/-}; p53^{+/+} y sufren senescencia entre el día 4 y 6. Los compuestos y extractos a ensayar (o "HIT") se añaden en el día 2 con el fin de evaluar su potencial de aumentar o detener la senescencia.

El experimento acaba 5 días después de la administración de los HIT candidatos. Los HIT positivos que aumentan la proliferación de las MEF PTEN^{-/-} (la proliferación se evaluó mediante el ensayo de tinción con cristal violeta estándar) y disminuyen su actividad β-galactosidasa (evaluada mediante el kit de detección de la senescencia Calbiochem) se consideran HIT contra la senescencia y se seleccionan para la siguiente etapa del ensayo. HIT positivos que disminuyen la proliferación de las MEF PTEN^{-/-} y aumentan su actividad β-galactosidasa se consideran HIT pro-senescencia y también se seleccionan para la siguiente etapa del ensayo.

En particular, el ensayo de tinción con violeta de cristal se utiliza ya que se considera una prueba simple, rápida y eficaz para obtener información cuantitativa de la densidad relativa de células adherentes, como los fibroblastos utilizados en este método de la invención. La tinción en este ensayo (0,1 % de cristal violeta) incorpora en el ADN de células previamente fijadas con formaldehído al 4 %. Después de la solubilización en ácido acético al 10 %, la cantidad de tinción reabsorbida por la monocapa se cuantifica en un lector de ELISA a λ = 570 nm. En su lugar, la

senescencia celular en su lugar se visualiza como el aumento en el tamaño celular y la expresión de β -galactosidasa (β -Gal.) dependiente del pH. Para cuantificar la senescencia presente en MEF analizadas, se usa el kit de detección de senescencia Calbiochem, que fue diseñado para ser capaz de detectar histoquímicamente la actividad β -Gal en células de cultivo a un pH de 6,0. Esta es una característica conocida de las células senescentes. La β -Gal a pH 6,0 está presente solo en las células senescentes y no se encuentra en pre-senescencia, ni en un estado reversible de la detención del crecimiento (quiescencia) o en un estado inmortal. El mecanismo de este ensayo se basa en el mayor contenido lisosomal de las células senescentes, provocando un aumento de la enzima β -galactosidasa.

Etapa 2

En la segunda etapa del método de selección, se añaden los compuestos positivos (HIT) seleccionados en la etapa 1 en la concentración individual (0,01 mg/ml) por duplicado. Esta etapa es necesaria para evaluar la especificidad de los compuestos/extractos seleccionados y es muy importante sobre todo para los compuestos pro-senescencia que luego serán utilizados para el tratamiento del cáncer. Las células cancerosas tienen un nivel bajo de PTEN, mientras que las células primarias tienen niveles normales de PTEN. Los compuestos pro-senescencia seleccionados no deben tener ningún efecto sobre las células primarias, solo en las células cancerosas. Las células MEF *Pten*^{1x/1x} se infectan con un vector retroviral que contiene pMSCV PIG (vector Puro IRES GFP) para obtener las células MEF *Pten*^{wt} resistentes a puomicina y con pMSCV PIG Cre para obtener células MEF *Pten*^{-/-} células MEF, también resistentes, como se ha descrito anteriormente. Ambos tipos de células se seleccionan con puomicina durante 2 días. Los compuestos positivos en la etapa 1 se añaden a las células, un día después de la selección. El experimento termina cinco días después de la administración de los compuestos a ensayar. Los compuestos positivos para los que se confirmó el efecto sobre la proliferación celular se confirmaron en células *Pten*^{-/-}, pero no en células *Pten*^{wt}, se consideran "HIT selectivos", es decir, compuestos selectivos para la vía de Pten y se analizan opcionalmente en la siguiente etapa.

Etapa 3

Los compuestos positivos en la etapa 2 se analizan para determinar su eficacia en la actividad de proliferación y β -Gal a diferentes dosis (cinco concentraciones diferentes, de menor a mayor) en células MEF *Pten*^{-/-} infectadas y seleccionadas como se describe anteriormente.

Ejemplo 2 Identificación y eficacia del extracto de *Salvia haenkei* como compuesto contra la senescencia

Entre los numerosos extractos naturales que se probaron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 (aproximadamente 500), el extracto de *Salvia haenkei* (o "HAEN") mostró efectos sobre la proliferación celular en la primera y segunda etapa del método, con una diferencia estadísticamente significativa > 40 % de aumento del crecimiento celular (Fig. 1). El material vegetal de *Salvia haenkei* se recoge de las partes de la planta tallo, hojas, flores y se seca en una estufa ventilada a 45 °C durante 24 horas y después se muele hasta dar un polvo fino usando un mezclador universal IKA M20. Una cantidad de 20,0 g de polvo vegetal seco se pesa en un matraz cónico de 100 ml al que se añaden 70 ml de hexano para la pre-extracción (grado de pureza 99 %). El matraz cónico se coloca en un baño de ultrasonidos (Branson 8210 o algún otro tipo) y se somete a ultrasonidos a una temperatura de 40 °C durante 30 minutos. La mezcla se filtra con papel de filtro, seguido de lavado con 20 ml de hexano y después con 50 ml de hexano. El filtrado se vierte en un matraz y el disolvente se concentra a vacío (aproximadamente a 11 mm Hg) a 5-10 ml por rotavapor, usando un baño de agua a 40 °C. Este residuo se pone en un recipiente, seguido de evaporación del disolvente. El recipiente se deja abierto durante la noche bajo una campana bien ventilada para evaporar los últimos restos de disolvente en el pre-extracto. Los sólidos recogidos en el filtro se subdividen y se secan al aire durante la noche en la campana. El material seco se extrae de la misma manera con metanol-agua (90:10). El material seco de los filtros se coloca en un matraz cónico de 100 ml al que se añaden 70 ml de metanol 90 %. La mezcla se somete a ultrasonidos a 40 °C durante 30 minutos, después de haber sido filtrada, luego se lava con 20 ml de etanol 90 %. El filtrado se vierte en un matraz y el disolvente se evapora completamente al vacío. El extracto seco en metanol 90 % se disuelve en la menor cantidad posible de metanol absoluto, utilizando el aparato de ultrasonidos y se vierte en un recipiente de 30 ml para dejar que se evapore durante la noche en la campana.

Como alternativa, se utiliza la extracción etanólica de los materiales vegetales: la planta *Salvia haenkei* se seca en la sombra y el polvo producido en un molino mecánico. El polvo de material vegetal se desengrasa inicialmente con benceno de petróleo (60-80 °C), seguido de 1.000 ml de etanol utilizando un aparato de extracción Soxhlet durante 72 horas a una temperatura no mayor que el punto de ebullición del disolvente [Lin et al., 1999]. El extracto se filtra utilizando papel de filtro Whatman y después se concentra a vacío y se seca a 45 °C para la eliminación de etanol. El extracto se almacena en botellas estériles bajo condiciones de refrigeración hasta el momento de la reconstitución.

El extracto crudo de HAEN se reconstituye en DMSO puro en la concentración de 10 μ m/ml, a continuación se diluye a la concentración específica utilizada en el medio de cultivo celular.

A continuación, el extracto de *Salvia haenkei* se prueba en el protocolo 3T3 en células primarias humanas (WI38-CCL75, ATCC) para validar el efecto contra la senescencia en el modelo de la senescencia replicativa. En detalle, se

sembraron 3×10^5 células en placas de 10 cm y posteriormente se pasaron y volvieron a sembrarse en el mismo número cada 3 días durante un total de 24 pases, momento en el cual se inició el tratamiento con el extracto de *Salvia haenkei* (HAEN). En el pase 25, las células se sembraron igualmente a razón de 3×10^5 células por placa y se trataron con el extracto de *Salvia haenkei* en una concentración única (0,01 mg/ml). Cada 3 días, se determinó el número de células y después las células volvieron a sembrarse a una densidad de 3×10^5 por placa y volvieron a tratarse con extracto de *Salvia haenkei* 0,01 mg/ml. En el pase 30, se observó la detención del crecimiento debido a la senescencia replicativa en el grupo de control no tratado; en cambio, las células tratadas con HAEN continuaron con la replicación (Fig. 2).

En los puntos temporales 28, 29 y 30, las células descritas anteriormente se analizaron para la expresión de β -galactosidasa. Las células tratadas con HAEN mostraron una disminución significativa del número de células positivas para el marcador de senescencia β -Gal en comparación con el control sin tratar (Fig. 3).

El extracto de *Salvia haenkei* también se ensayó para determinar la capacidad de prevenir la senescencia en un modelo de senescencia debido a la irradiación UVB en fibroblastos humanos primarios (WI38-CCL75, ATCC). En resumen, se irradiaron células WI38 con la dosis optimizada de la irradiación UV que causa la senescencia prematura. Seis horas después de la irradiación, se añadió HAEN en una concentración única (0,01 mg/ml), junto con el control positivo tratado con Nutlin-3 (0,01 mg/ml). La proliferación celular se determinó en los puntos temporales 24 h, 48 h y 72 h después del tratamiento usando un ensayo con cristal violeta, donde la intensidad de color leída en espectrómetro corresponde al número de células vivas presentes en el cultivo. En los puntos temporales 48 h y 72 h después del tratamiento, se realizó el ensayo de la β -Gal para evaluar la presencia de células senescentes en el cultivo. El tratamiento con HAEN fue capaz de prevenir la detención del crecimiento y la senescencia causada por el tratamiento UV en comparación con las células no tratadas y tratadas con Nutlin-3. (Fig. 4,5).

Para excluir cualquier posibilidad de efecto tóxico eventual de HAEN y para probar si la dosis eficaz es inferior a la dosis usada (0,01 mg/ml) en el ensayo anterior, las células WI38 se trataron con cinco concentraciones diferentes de HAEN en presencia y en ausencia de irradiación UV. Las células se irradiaron y se analizaron para determinar la presencia de muerte celular por exclusión con azul de tripano y los niveles de proliferación se evaluaron por tinción con violeta cristal en los puntos temporales 24 h, 48 h y 72 h. HAEN no mostró ningún efecto tóxico cuando se administraba incluso en concentraciones 10 veces superiores a la eficaz, 0,01 mg/ml (Fig. 7). De hecho, el número de células muertas contadas usando tinción con azul de tripano fue menor en los grupos tratados con HAEN en comparación con los grupos de control no tratados (Fig. 7).

Los experimentos descritos anteriormente sugieren que el extracto de *Salvia haenkei* (HAEN) demostraba ser eficaz como compuesto contra la senescencia tanto en la senescencia replicativa como prematura inducida por radiación (fotosenescencia).

Por último, el efecto HAEN fue probado en un modelo de piel humana cultivada *in vitro* (Modelo Episkin) usando HAEN solubilizada en aceite obtenido de *Olea europaea*. Este extracto no tenía ninguna toxicidad en la piel humana irradiada con UV, y por otra parte no resultó ser irritante (Fig. 8). Por el contrario, HAEN redujo los niveles de la piel de IL1 α en comparación con el control, tanto en piel no irradiada como en la piel irradiada (Fig. 8). Esto pone de manifiesto que HAEN es capaz de disminuir la irritación de la piel y la inflamación inducida por la radiación.

Un ensayo clínico confirmó el efecto positivo a nivel de la piel humana en un grupo de sujetos tratados tanto con HAEN solubilizada en aceite obtenido a partir de *Olea europaea* como en un suero que contiene *Salvia haenkei* con la adición de la planta *Glyceria*, agua, goma de *Caesalpinia spinosa*, extracto de *Salvia officinalis* y extracto de *Galega officinalis*. Como se ha demostrado, HAEN en aceite (Fig. 9) y en suero (Fig. 10) mejoraron significativamente la luminosidad, el tono y la elasticidad de la piel de los sujetos estudiados. El 40 % de los pacientes refirió una mejora de las zonas de irritación de la piel presentes antes del tratamiento. Por último, la mayoría de los sujetos tratados observaron mejoras relevantes en la piel de la cara y se consideraron satisfechos con el tratamiento realizado (Fig.9-10).

Ejemplo 3 Composiciones que comprenden HAEN

Formulación específica que contiene:

Aceite de *Olea europaea* (96 % en peso);

Aceite esencial de hojas de *Salvia officinalis* (2 % en peso);

Aceite esencial de hojas de *Lavandula hybrida* (2 % en peso);

Extracto de *Salvia haenkei* (preparado como se describe en el Ejemplo 2) (0,01 % en peso); el porcentaje en peso se define con respecto al peso total de la composición.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición cosmética que comprende un extracto de *Salvia haenkei* y uno o más vehículos cosméticamente aceptables para la administración tópica, en la que dicha composición está en la forma de aceite, emulsión, crema, aerosol, pomada, gel y suero.
2. Composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho extracto está en una concentración comprendida entre 0,001 y 45 %, preferiblemente entre 0,01 y 4 % en peso de la composición.
- 10 3. Composición cosmética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además un extracto de salvia, romero, *Galega officinalis*, lavanda, *Angelica archangelica*, *Olea europaea* y/o imperatonina.
- 15 4. Uso cosmético de un extracto de *Salvia haenkei* para la mejora y/o la prevención de los signos del envejecimiento de la piel, cabello, uñas, mucosa bucal, tejidos gingivales y mucosa vaginal.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los signos de envejecimiento de la piel son arrugas, disminución de la tersura y/o la luminosidad de la piel.
- 20 6. Extracto de *Salvia haenkei* para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con el envejecimiento celular, en el que dicha enfermedad asociada con el envejecimiento celular se selecciona de entre progeria, artrosis, aterosclerosis, demencia senil y tumores.
- 25 7. Extracto de *Salvia haenkei* para su uso en el tratamiento del envejecimiento celular inducido por radioterapia y/o quimioterapia.
- 30 8. Composición farmacéutica que comprende un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con el envejecimiento celular, en el que dicha enfermedad asociada con el envejecimiento celular se selecciona de entre progeria, artrosis, aterosclerosis, demencia senil y tumores.
- 35 9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para administración oral, intravenosa, intramuscular, transmucosa o uso tópico.
10. Método para la preparación de un extracto de *Salvia haenkei*, que comprende las siguientes etapas:
- 40 a) preparar un extracto seco de hojas, tallo y/o flores de *Salvia haenkei*;
b) someter el extracto seco de la etapa a) a una o más etapas de extracción con disolvente orgánico;
c) eliminar total o parcialmente el disolvente orgánico del extracto obtenido en el punto b), y opcionalmente, realizar una o más etapas de filtrado y/o concentración.
- 45 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dichos disolventes orgánicos son etanol y/o metanol.
12. Método para la preparación de un extracto natural de *Salvia haenkei* que comprende las siguientes etapas: a) preparar hojas frescas o secas, flores y/o tallo de *Salvia haenkei*, b) macerar la preparación de *Salvia haenkei* en aceite vegetal o glicerina o c) extraer la preparación de *Salvia haenkei* por destilación al vapor con agua mineral o termal.
- 50 13. Método para la preparación de una composición que comprende un extracto de *Salvia haenkei* que comprende una etapa de mezclar el extracto obtenido de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y uno o más excipientes.

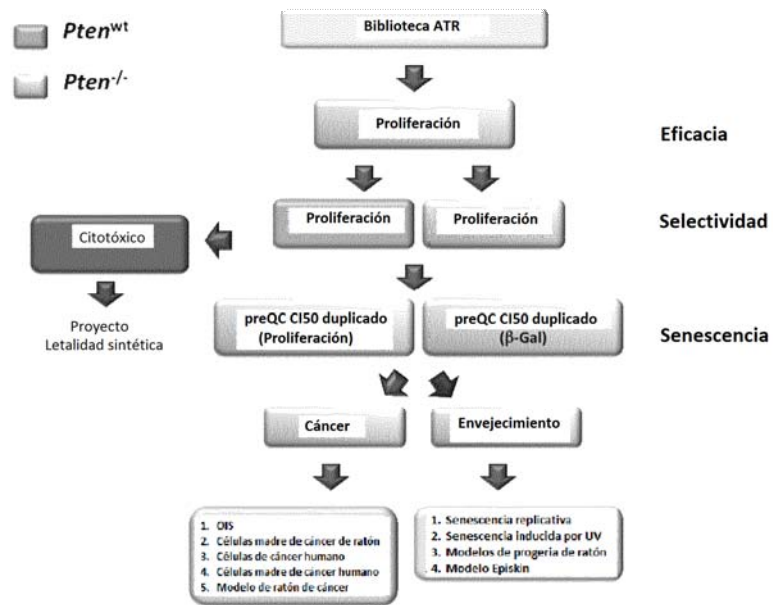


FIG.1

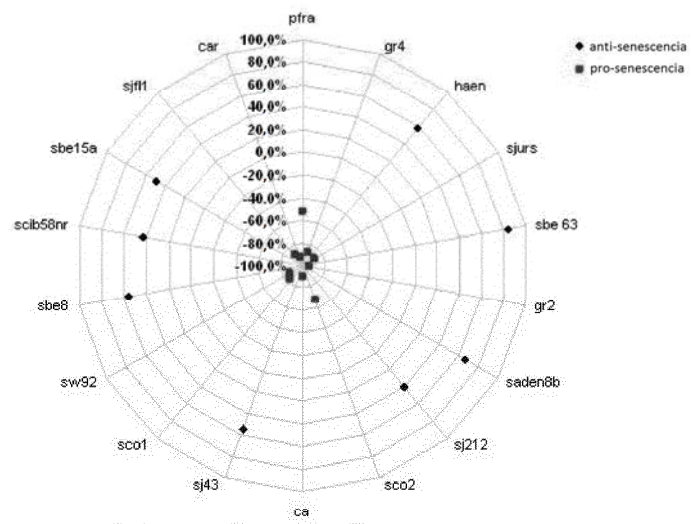


FIG.2

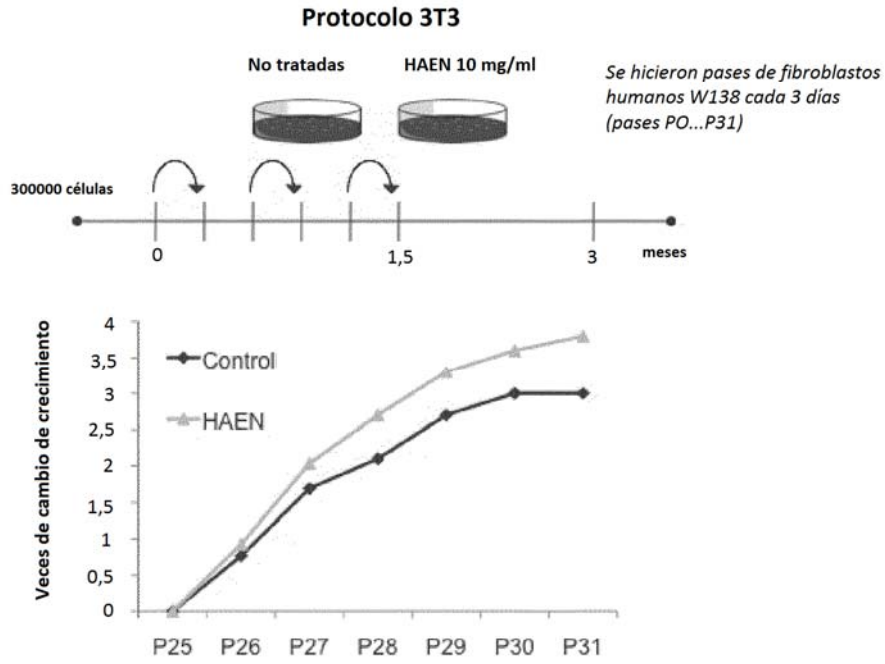


FIG.3

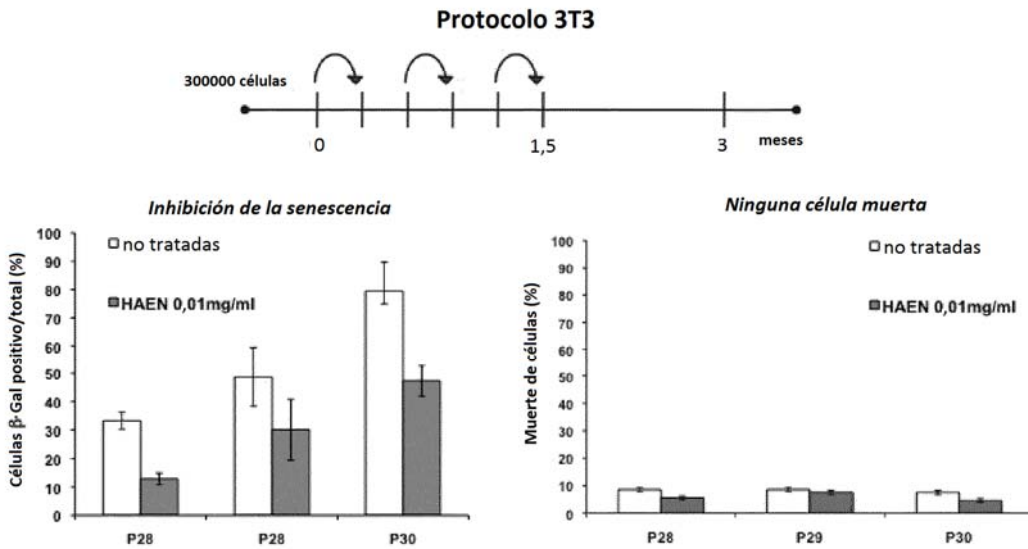


FIG.4

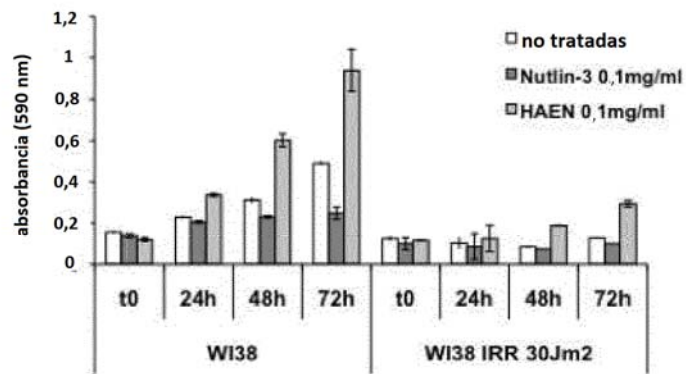


FIG.5

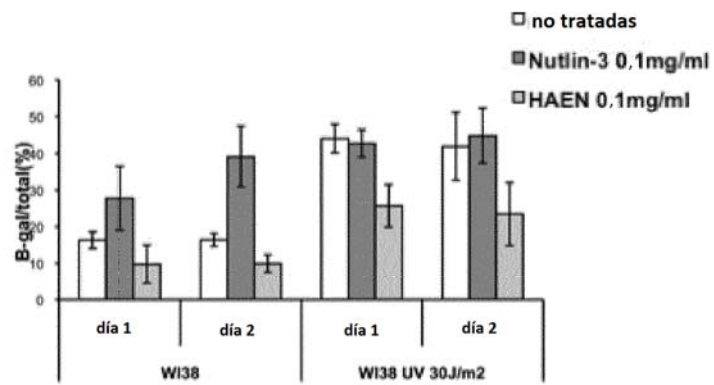


FIG.6

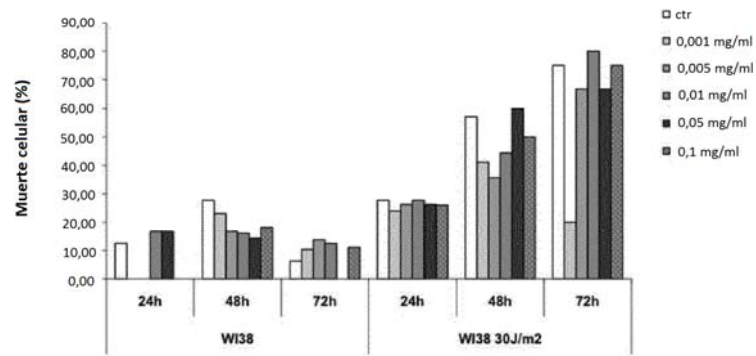


FIG.7

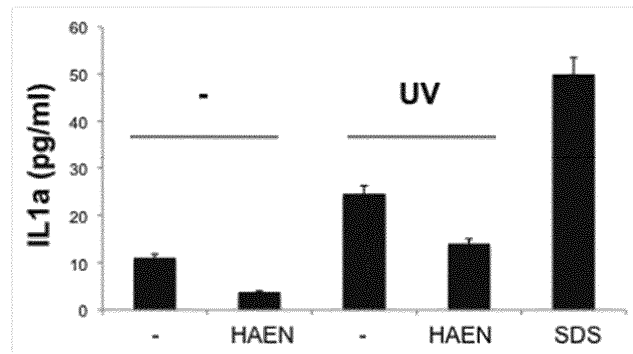


FIG.8

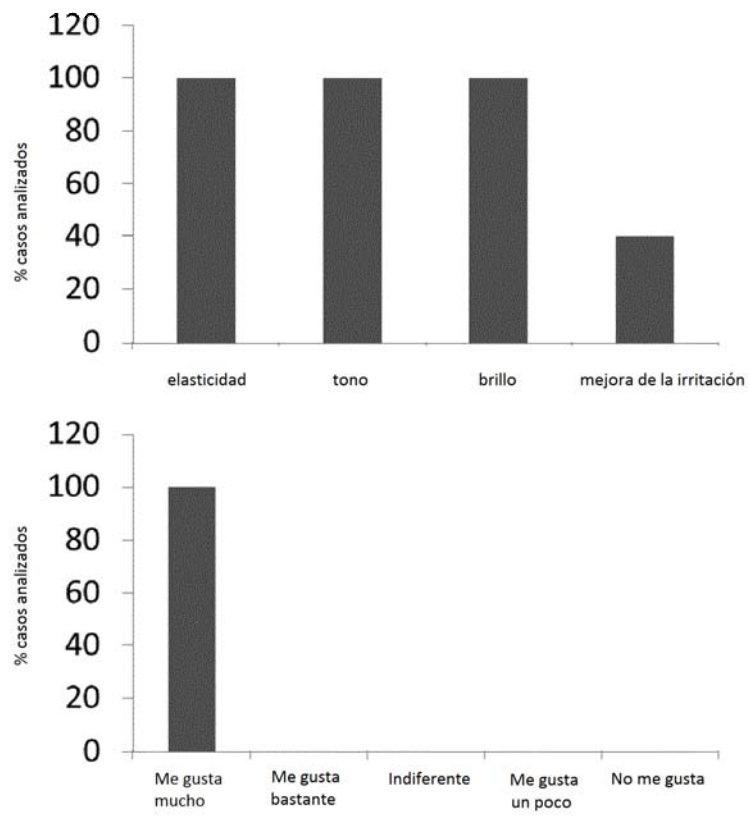


FIG.9

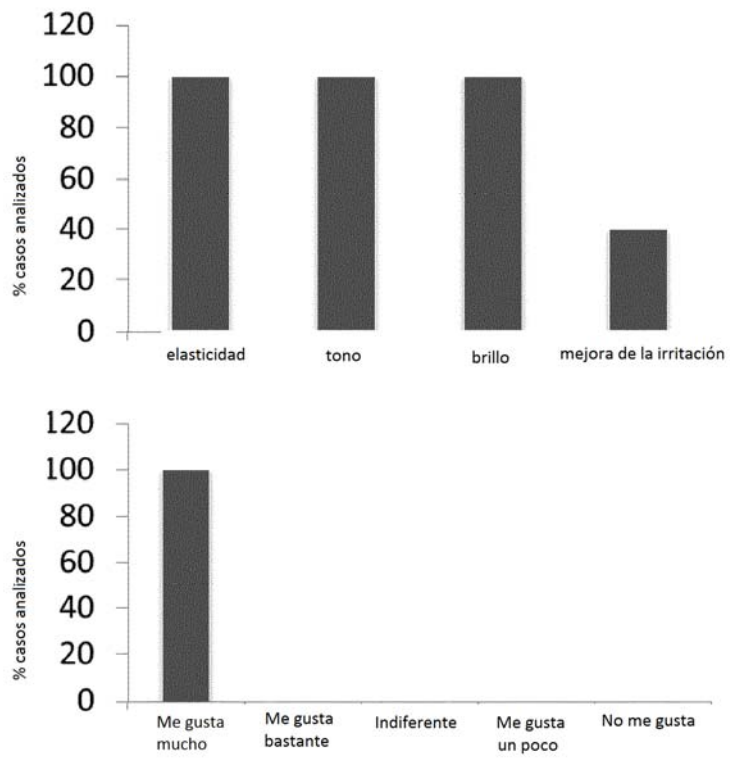


FIG.10