

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 767**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) A61K 36/05	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01) A61K 36/18	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01) A61K 8/97	(2007.01)
A61K 47/32	(2006.01) A61K 47/14	(2007.01)
A61K 47/36	(2006.01)	
A61K 9/10	(2006.01)	
A61K 36/00	(2006.01)	
A61K 36/28	(2006.01)	
A61K 36/31	(2006.01)	
A61K 36/45	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014 PCT/EP2014/067298**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022348**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014 E 14750493 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 3033073**

54 Título: **Preparación para la protección contra el envejecimiento extrínseco e intrínseco de la piel**

30 Prioridad:

16.08.2013 DE 102013216295
07.08.2014 US 201414453822

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2017

73 Titular/es:

LA PRAIRIE GROUP AG (100.0%)
Industriestrasse 8
8604 Volketswil / Zürich, CH

72 Inventor/es:

DUDLER, BERNHARD y
STANGL, DANIEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 632 767 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

Preparación para la protección contra el envejecimiento extrínseco e intrínseco de la piel

5 La presente invención se refiere a una preparación cosmética o dermatológica que comprende uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* (saxífraga púrpura) y/o de *Soldanella alpina* (lunaria menor de flores azules), así como a su uso contra el envejecimiento de la piel extrínseco e intrínseco.

10 Como envejecimiento de la piel se hace referencia al proceso biológico complejo de la modificación de la piel que viene acompañada de la edad. En este caso se diferencia entre el envejecimiento de la piel intrínseco, debido a factores internos fisiológicos y genéticos, y el envejecimiento de la piel extrínseco.

15 El envejecimiento extrínseco de la piel se debe a factores externos, como por ejemplo, factores del entorno, como luz UV, reactivos químicos, carga mecánica, humo de cigarrillos, estrés o contaminación del aire. Dado que la radiación UV representa la causa principal para el envejecimiento de la piel extrínseco, se habla también de "fotoenvejecimiento".

20 Los factores extrínsecos conducen por ejemplo, a la formación de arrugas, a la flacidez de la piel, a la pérdida de elasticidad y a la apariencia seca de la piel.

25 El envejecimiento intrínseco, denominado también envejecimiento cronológico, está causado por factores fisiológicos y genéticos internos y refleja procesos de degradación en la piel. Estos procesos se deben principalmente a una actividad de proliferación reducida de las células de la piel, a una síntesis reducida de la proteína matriz y a un aumento de la expresión de enzimas degradantes de la matriz.

Las células envejecidas muestran una resistencia contra señales apoptóticas, que conduce a la acumulación en el tejido de células envejecidas que no proliferan con patrón de expresión genética modificado.

30 Durante el envejecimiento de la piel se da a menudo la conformación de arruguitas y líneas y la pérdida de elasticidad y tonicidad de la piel.

35 El envejecimiento de la piel y la conformación de arrugas pueden retrasarse de manera decisiva mediante correspondiente protección de la piel. En el estado de la técnica se presentan para ello muchos tipos de posibilidades, como por ejemplo, desde el cambio a un modo de vida saludable, hasta preparaciones cosméticas y dermatológicas que pueden aplicarse tópicamente.

40 La *Saxifraga oppositifolia* es una planta, la cual se encuentra preferentemente en las latitudes templadas en pastos pedregosos y morrenas a alturas de entre 1.600 y 4.500 metros y que representa de esta manera la fanerógama a más altura en Europa.

Las hojas perennes soportan temperaturas de hasta -40 °C sin daños. Las hojas dispuestas de forma opuesta en pequeñas rosetas perennes presentan desde forma ovalada invertida hasta forma de lanceta longitudinal y tienen una longitud de 2,5 a 5 mm.

45 En el documento US 6406682 B1 se describe la especie vegetal *Saxifraga* como componente o como preparación autobronceadora.

50 El documento EP 1104670 A2 describe mascarillas cosméticas tipo película, las cuales comprenden un polímero soluble en agua, un extracto de *Saxifraga* y agua como agente disolvente. El extracto de *Saxifraga* usado en este caso se produce mediante la extracción de la hoja sin triturar de *Saxifraga* (*Saxifraga stolonifera* Meerb.) con agua purificada, etanol, 1,3-Butilenglicol o similares, y es un extracto, el cual se produce mediante la concentración de la solución extraída o de un polvo producido mediante el secado de la solución de extracto y pulverización del extracto secado.

55 La *Soldanella alpina* es una planta de las primuláceas. Su emplazamiento preferente es la sombra parcial en substratos húmedos. Las hojas son redondeadas y perennes.

60 En el documento US 2009/0104295 A1 se indica la *Soldanella alpina* como una posible fuente de una clase de sustancia activa como aditivo al complejo de crecimiento de cabello de base. Los documentos JP2009185007 y JP2006104117 divulgan el uso de extractos de *Saxifraga*/*Saxifraga stolonifera*. Es deseable poner a la disposición preparaciones, las cuales sean eficaces contra el envejecimiento de la piel extrínseco e intrínseco.

65 La presente invención pone a disposición una preparación cosmética o dermatológica, la cual comprende (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* (saxífraga púrpura) y/o (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina* (lunaria menor de flores azules). Preferentemente la preparación contiene al menos respectivamente al menos un extracto de *Saxifraga oppositifolia* y de *Soldanella alpina*.

Es particularmente preferente que la preparación comprenda respectivamente solo un extracto de *Saxifraga oppositifolia* y de *Soldanella alpina*, en particular solo estos dos extractos, y ningún otro extracto de planta.

5 Es igualmente preferente, que la preparación comprenda o bien solo uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* o solo uno o varios extractos de *Soldanella alpina*. La preparación comprende en particular entonces solo este uno o varios extractos y ningún otro extracto de planta.

10 Es preferente además de ello, que la preparación según la invención comprenda adicionalmente uno o varios extractos del género *Chlamydomonas* (llamado también *Chlamydocapsa* sp. (alga nieve)).

La totalidad de la divulgación del documento WO 2012/069073 A1 se recoge aquí de forma expresa mediante referencia.

15 La preparación según la invención comprende ventajosamente de forma correspondiente uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia*, *Soldanella alpina* y *Chlamydomonas* sp., de manera que correspondientemente uno o varios extractos de las tres plantas están contenidos en la preparación según la invención y pueden retrasar e incluso detener mediante sus efectos de protección de la piel, el proceso de envejecimiento de la piel extrínseco e intrínseco.

20 No hay contenidos entonces preferentemente otros extractos de planta en las preparaciones según la invención, de manera que solo hay contenidos uno o varios extractos de planta de *Saxifraga oppositifolia*, *Soldanella alpina* y del género *Chlamydomonas*.

25 En el caso de los extractos contenidos en la preparación según la invención, puede tratarse tanto de extractos solubles en aceite como también en agua de *Saxifraga oppositifolia* y *Soldanella alpina*. Este tipo de extractos pueden producirse por ejemplo, según los siguientes o procedimientos parecidos.

Material vegetal:

30 La biomasa de las plantas se obtiene mediante la plantación de estas plantas en invernaderos o al aire libre. Las plantas pueden o bien plantarse mediante semillas (*Soldanella*) o multiplicarse mediante plantones (*Saxifraga*), en cuanto que se plantan en sustratos adecuados. Tan pronto como hay disponibles plantas adultas, las plantas madre pueden separarse en plantas hijas más pequeñas. El material vegetal se cultiva como biomasa como máximo a comienzos del verano. Para garantizar un cultivo sostenible y evitar la destrucción de las plantas, se usan preferentemente solo partes de la planta que crecen por encima de la tierra y de manera particularmente preferente solo ramas (tallos) y/u hojas de las plantas, aunque pueden usarse igualmente también por ejemplo, flores (en particular adicionalmente).

40 Las partes de la planta que crecen por encima de la tierra se cortan, y tras ello, en la medida de lo posible se secan directamente, por ejemplo, en un horno adecuado mediante aire de circulación caliente o en un armario de secado de vacío. La temperatura de secado se encuentra preferentemente entre 40 y 45 °C, para cargar en la menor medida posible térmicamente los productos naturales sensibles a la temperatura.

45 Mediante el secado se reduce el contenido de humedad del material a preferentemente menos del 10 %. Tras ello, el material secado se corta por ejemplo, en una trituradora, para reducir su tamaño a preferentemente unos pocos milímetros. El material debería almacenarse entonces hasta su procesamiento posterior en un lugar fresco y seco.

Productos solubles en aceite:

50 La producción de extractos solubles en aceite puede producirse por ejemplo mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE). En este caso se extraen mediante SFE con dióxido de carbono principios activos solubles en aceite del material vegetal secado. El recipiente de extracción se llena con el material vegetal secado y el material se compacta para eliminar canales de aire. La presión del gas es de por ejemplo hasta aproximadamente 200 bares en el caso de una temperatura de por ejemplo, 40 °C. En estas condiciones, la extracción dinámica se lleva a cabo habitualmente durante por ejemplo, 60 minutos. Tras ello se libera de tensión el dióxido de carbono supercrítico y se realimenta, y se recoge el extracto lipófilo en un recipiente de acumulación. Los extractos de varias pasadas se purifican y se disuelven por ejemplo, en una correspondiente cantidad de aceite vegetal (por ejemplo, aceite de jojoba) mediante agitación durante una hora a aproximadamente 50 °C. Tras el enfriamiento, la solución se guía a través de un filtro de 5 µm y un filtro de 4 µm. La solución filtrada se corresponde con el producto de extracto soluble en aceite. De esta manera, 1500 g de *Saxifraga* secada dan por ejemplo aproximadamente 15 kg de producto (la extracción alcanzada es de aproximadamente 5-10 %), mientras que 900 g de *Soldanella* dan por ejemplo, 15 kg de producto (la extracción alcanzada es de aproximadamente 2-5 %).

65 El material vegetal extraído puede recogerse y usarse por ejemplo, para la extracción hidroalcohólica que se describe a continuación.

Productos solubles en agua:

1. Extracción hidroetanólica

5 El material vegetal se mezcla con una cantidad suficiente de agua y de etanol (1:1 peso/peso). El lodo se agita durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y tras ello, se guía a través de un filtro de 1 µm. El material vegetal solvatado puede exprimirse para obtener más extracto. El filtrado se diluye con aproximadamente 1,5 veces el peso de agua y se almacena durante varios días a 4 °C. Tras ello se guía el producto por un filtro de 4 µm y un filtro de 0,6 µm, y a continuación, se somete a una granulación por pulverización.

10

2. Granulación por pulverización

La solución de extracción se mezcla antes del granulado por pulverización con maltodextrina. Se producen por ejemplo, con 10 kg de la materia prima de Saxifraga secada (< 10 % de contenido en agua) y cortada, aproximadamente 100 kg de granulado de pulverización y con 6 kg de la materia prima de Soldanella secada y cortada, aproximadamente 100 kg de granulado de pulverización.

15

La solución mezclada con maltodextrina puede granularse por pulverización en un dispositivo de granulación de lecho fluidizado, por ejemplo, en las siguientes condiciones:

20

Granulación:

Aire entrante: 80 °C / 250 a 800 m³ / h

25

Proporción de pulverización: 3 bares / 150 - 200 ml

Aire saliente: 30 - 50 °C

30

Secado:

Aire entrante: 80 °C / 250 a 800 m³ / h / 5 - 10 minutos

Aire saliente: 55 °C

35

Periodo de tiempo: varias horas, dependiendo del tamaño del lote.

Los procedimientos de producción anteriores solo a modo de ejemplo, representan las formas preferentes de la puesta a disposición de los extractos solubles en agua o en aceite según la invención, de Saxifraga oppositifolia y Soldanella alpina. Como se ha mencionado arriba, se usan en este caso preferentemente en particular solo las hojas y los tallos de las plantas, pero no las flores ni en particular las raíces de las plantas.

40

Dado que los extractos pueden producirse y usarse tanto en forma soluble en aceite, como también en agua, se da una amplia libertad para la formulación de preparados cosméticos y farmacéuticos.

45

Los extractos pueden usarse en concentración cualquiera en preparaciones cosméticas o dermatológicas.

Preferentemente, la concentración de uno o de varios extractos de una planta (Saxifraga oppositifolia, Soldanella alpina y de cualquier otra planta, cuyo(s) extracto(s) está(n) contenido(s) eventualmente en la preparación, como por ejemplo, de Chlamydocapsa sp.) es en la preparación, de manera correspondientemente independiente, de no más de 15 % en peso, por ejemplo, de no más de 5 % en peso, de no más de 1 % en peso, de no más de 0,5 % en peso, de no más de 0,1 % en peso, o de no más de 0,01 % en peso, pero preferentemente, de al menos 0,0001 % en peso, por ejemplo, de al menos 0,0005 % en peso, de al menos 0,001 % en peso o de al menos 0,002 % en peso. El correspondiente rango de concentración para el/los extracto(s) de cada una de las plantas, es habitualmente de 0,0001 a 0,5 % en peso, referido respectivamente a la masa total de la preparación.

55

Las anteriores indicaciones de concentración de los extractos usados según la invención se refieren a la masa del extracto puro (normalmente en forma de polvo), sin agentes disolventes ni agentes de extracción.

Los extractos usados según la invención se producen por ejemplo, en forma de los productos AlpinEffect Saxifraga SFE OS (0,2 % en peso de extracto seco, resto aceite de jojoba), AlpinEffect Saxifraga WS (0,3 % en peso de extracto seco, > 91 % en peso de maltodextrina, resto preferentemente agua), AlpinEffect Soldanella SFE OS (0,08 % en peso de extracto seco, resto aceite de jojoba) y AlpinEffect Soldanella WS (0,4 % en peso de extracto seco, > 91 % en peso de maltodextrina, resto preferentemente agua) de la empresa Mibelle (Suiza).

60

Si se usa por ejemplo, un 1 % en peso de AlpinEffect Soldanella WS en la preparación, entonces la proporción de extracto de Soldanella alpina real es de aproximadamente 0,004 % en peso en la preparación, referido a la masa

65

total de la preparación.

Las preparaciones según la invención comprenden preferentemente al menos dos de los extractos de planta elegidos del grupo (i) *Saxifraga oppositifolia*, (ii) *Soldanella alpina* y (iii) *Chlamydocapsa* sp..

- 5 Las preparaciones preferentes según la invención comprenden de esta manera
- un extracto de (i) *Saxifraga oppositifolia* y un extracto de (ii) *Soldanella alpina*,
 - un extracto de (i) *Saxifraga oppositifolia* y un extracto de (iii) *Chlamydocapsa* sp.,
 - 10 - un extracto de (ii) *Soldanella alpina* y un extracto de (iii) *Chlamydocapsa* sp. o
 - un extracto de (i) *Saxifraga oppositifolia*, un extracto de (ii) *Soldanella alpina* y un extracto de (iii) *Chlamydocapsa* sp..

15 Las preparaciones según la invención pueden presentarse en las formas y tipos conocidos.

Preferentemente se trata de una preparación tópica.

20 Una forma de las preparaciones se conoce como preparaciones que de permanencia, como por ejemplo, crema, loción o leche corporal. Estas preparaciones se formulan a menudo como emulsiones, en particular emulsiones W/O (agua en aceite), O/W (aceite en agua), O/W/O (aceite/agua/aceite) o W/O/W (agua/aceite/agua). Las preparaciones pueden representar igualmente microemulsiones, dispersiones, geles, soluciones acuosas o alcohólicas, sérums, aceites, agentes de impregnación, tinturas o pomadas. Los extractos pueden aplicarse sobre la piel ventajosamente también aplicados sobre o integrados en pañuelos, apósitos, vendas, parches o almohadillas.

25 La preparación según la invención se presenta ventajosamente en forma de una emulsión.

30 Las preparaciones cosméticas o dermatológicas según la invención pueden contener eventualmente otros componentes activos. Se mencionan aquí solo a modo de ejemplo otros extractos como por ejemplo, uno o varios extractos de *Artemisia umbelliformis*, *Rubus idaeus* (frambuesa), *Plantago lanceolata* (extracto de hoja), *Saccharomyces cerevisiae*, raíz de *Panax ginseng*, *Equisetum arvense*, y *Evernia furfuracea* (musgo de árbol). Otros ejemplos de componentes activos adicionales preferentes incluyen biopolímeros, glicoproteínas, vitaminas y antioxidantes.

35 Las preparaciones cosméticas o dermatológicas según la invención pueden contener además de ello, excipientes y sustancias activas adicionales, como se usan habitualmente en este tipo de preparaciones, por ejemplo, agentes conservantes, agentes auxiliares conservantes, bactericidas, sustancias para impedir el espumado, colorantes y pigmentos de color, espesantes, sustancias humectantes o de conservación de la humedad, grasas, aceites, ceras u otros componentes habituales de una formulación cosmética o dermatológica, como alcoholes, polioles, polímeros, estabilizadores de la espuma, electrolitos, agentes disolventes orgánicos o derivados de silicona, autobronceadores,

40 soluciones tampón, reguladores del pH, tensioactivos, gases propelentes, polvos, sustancias de absorción de sebo, filtros UV, sustancias activas como por ejemplo, agentes antienvjecimiento, anticelulíticos, anti acné, anti rosácea, anti neurodermitis, antioxidantes, hidratantes, quelantes, antitranspirantes, aclarantes y colorantes, siempre y cuando la adición no influya negativamente de forma significativa en o queden excluidas las propiedades requeridas en lo que se refiere a la estabilidad requerida, propiedades sensoriales y sobre todo, en lo que se refiere a la función

45 de protección, así como a la compatibilidad con la piel y el pelo.

Las preparaciones según la invención comprenden preferentemente de forma adicional uno o varios agentes de hidratación de la piel. Es ventajosa también la adición de uno o varios filtros de protección contra la luz.

50 Según la invención, pueden usarse uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* (*saxifraga púrpura*) y/o de *Soldanella alpina* (*lunaria menor de flores azules*) en preparaciones cosméticas o dermatológicas para la reducción o la prevención de daños en la piel debidos a factores extrínsecos y/o intrínsecos o pueden usarse para la fabricación de preparaciones farmacéuticas, en particular dermatológicas, y servir para reducir o prevenir daños en la piel debidos a factores extrínsecos y/o intrínsecos.

55 Es ventajoso el uso no terapéutico de preparaciones cosméticas comprendiendo (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* y/o (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina*, así como eventualmente uno o varios extractos de *Chlamydocapsa* sp., para reducir o prevenir daños en la piel debidos a factores extrínsecos y/o intrínsecos.

60 La preparación comprende en este caso preferentemente al menos dos de los extractos.

65 Un procedimiento para reducir o evitar daños en la piel debidos a factores extrínsecos y/o intrínsecos, el cual comprende la aplicación tópica de la preparación según la invención sobre la piel, forma igualmente parte de la invención.

Es igualmente parte de la invención un procedimiento para el retraso del envejecimiento de la piel intrínseco e/o extrínseco, el cual comprende la aplicación tópica de una preparación según la invención sobre la piel.

5 Las preparaciones según la invención ayudan a la piel a protegerse frente a los signos visibles del envejecimiento de la piel prematuro, a reducir el estrés inducido por la radiación UV, a alisar arrugas, a volver a establecer la barrera de humedad y a hacer debido a ello la piel más resistente en comparación con piel sin el uso según la invención.

10 Los extractos según la invención están contenidos preferentemente en preparaciones que pueden ser aplicadas tópicamente. La preparación que puede ser aplicada tópicamente es en particular una preparación cosmética.

Uno o varios extractos de Saxifraga oppositifolia y/o de Soldanella alpina pueden usarse de esta manera también para la producción de preparaciones farmacéuticas, en particular, dermatológicas.

15 Los extractos según la invención se usan preferentemente en combinación con uno o con varios extractos de Chlamydocapsa sp. (alga de nieve).

20 En otra forma de realización, las preparaciones según la invención comprenden adicionalmente uno o varios extractos elegidos de los siguientes extractos: extracto de Artemisia umbelliformis, extracto de Rubus idaeus (frambuesa), extracto de hoja de Plantago lanceolata, extracto de Saccharomyces cerevisiae, extracto de raíz de Panax ginseng, extracto de Equisetum arvense, extracto de Evernia furfuracea (musgo de árbol).

25 La extracción puede llevarse a cabo en este caso según procedimientos conocidos y mediante la ayuda de agentes auxiliares de extracción conocidos. En la tecnología de la extracción pueden usarse diferentes procedimientos, por ejemplo, maceración, dimaceración, digestión, re/percolación, procedimiento de Soxhlet, extracción según Twisselmann, turbo extracción (torbellino), Turrax, de ultrasonidos, de corriente contraria y extracción mediante extractor centrífugo.

La preparación según la invención puede comprender además de ello, adicionalmente al menos un aminoácido.

30 En lo sucesivo se ilustran las propiedades ventajosas de la preparación según la invención mediante los resultados de diferentes pruebas. En las pruebas se usaron a modo de ejemplo los productos de extracto solubles en agua AlpinEffect Saxifraga WS y AlpinEffect Soldanella WS mencionados más arriba, para los extractos según la invención. Las indicaciones de porcentajes se refieren a extracto usado en efecto (es decir, sin los aditivos contenidos en estos productos, como por ejemplo, maltodextrina).

35 *1. Función mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo*

40 Es conocido que las mitocondrias se ocupan de la generación de energía para las células humanas. Se encuentran en el citoplasma y les sirven a las células como "baterías", para producir, almacenar y distribuir energía. La célula humana contiene por término medio 1500 mitocondrias. Las células con un alto rendimiento metabólico (por ejemplo, los músculos o el hígado) contienen más mitocondrias. Las mitocondrias se mueven en el citoplasma dependiendo de la necesidad de la célula. Están dotadas de su propio ADN y pueden reproducirse de manera autónoma debido a ello independientemente de la división de la célula. Sin las mitocondrias, la célula es incapaz de funcionar y no es posible ningún tipo de vida. Cuando estas centrales de energía de las células no funcionan libres de fallos, estos

45 pueden acelerar los procesos de envejecimiento en la piel. Los defectos en las mitocondrias, en particular también en el ADN mitocondrial, pueden acelerar por lo tanto, el envejecimiento.

50 La protección de la funcionalidad mitocondrial frente a factores dañinos extrínsecos, por ejemplo, frente a radiación UV y estrés oxidativo, o la garantía de la integridad de las mitocondrias es por lo tanto una protección eficaz frente al envejecimiento de la piel.

55 La siguiente prueba muestra que 10 mM de solución de peróxido de hidrógeno reduce el potencial de membrana de las mitocondrias como medida para células cutáneas sanas, activas metabólicamente, a razón de un 50 %. El peróxido de hidrógeno es de esta manera un ejemplo de factor dañino extrínseco.

60 En presencia tanto del extracto de Saxifraga, como también del de Soldanella, la reducción del potencial de membrana debida a peróxido de hidrógeno es solo aproximadamente 25 %, es decir, los extractos según la invención protegen las células cutáneas de manera eficaz frente a estrés oxidativo y con ello frente a envejecimiento de la piel extrínseco.

Al llevarse a cabo las pruebas, se usaron queratinocitos epidérmicos humanos primarios, más exactamente "*transit amplifying cells*" (células de amplificación transitoria).

65 Para analizar la influencia del extracto en la funcionalidad mitocondrial tras una carga oxidativa, se llevó a cabo un ensayo de potencial de membrana mitocondrial JC-1. En las células sanas, el potencial mitocondrial activo metabólicamente es alto y el colorante JC-1 conforma espontáneamente complejos (agregados J) y muestra debido

a ello una fluorescencia roja intensa. Por otro lado, el colorante JC-1 se mantiene en las células dañadas con un potencial de membrana bajo, en la forma sencilla monómera. La proporción de la intensidad de la fluorescencia de agregados J con respecto a monómeros JC-1 sirve como medida para la funcionalidad de la célula.

- 5 En las figuras 1 y 2 se representan gráficamente los resultados de las pruebas. Estas figuras muestran la efectividad y la función de protección de los extractos según la invención contra factores dañinos extrínsecos.

La concentración de *Saxifraga oppositifolia* usada en la prueba fue de 0,00024 % en peso y aquella de *Soldanella alpina* fue de 0,00024 % en peso (referido al peso de medio celular).

10

2. Protección de ADN mitocondrial en caso de radiación UV

El siguiente ensayo muestra el efecto de protección de los extractos según la invención en lo referente al ADN mitocondrial en caso de radiación UV.

15

En el ADN mitocondrial (ADNmt) se encuentran algunos, sin embargo, no todos, los genes para las enzimas de la cadena respiratoria, así como los genes, los cuales son responsables de la estructura y la reproducción de las mitocondrias. Pueden aparecer muy fácilmente daños en el ADNmt, dado que éste se presenta sin protección en las mitocondrias y está expuesto allí a los radicales libres, que pueden hacer su aparición durante la producción de energía. Los daños en el ADNmt pueden conducir por lo tanto a una fuerte influencia negativa en la obtención de energía celular.

20

Uno de los daños más frecuentes del ADNmt, que se detecta en el siguiente ensayo, se denomina "*common deletion*" (delección común).

25

Las células HaCaT son células de una línea celular de queratinocitos humana específica. Los queratinocitos cultivados (HaCaT) se incuban durante 48 h con diferentes compuestos, y a continuación, se estresan durante 1 h con radiación UVB (1,5 mJ/cm²). Las células se recogen entonces y se lisan con el fin de la extracción de ADN. Con la ayuda de la intensidad de la banda de delección común, expresada como proporción de la delección común frente al estándar, puede determinarse la protección frente a daño por luz UV.

30

Se examinaron los siguientes compuestos:

Extractos de plantas	Proporción % en peso	% de reducción de los daños de ADN inducidos por UVB (pruebas de delección común)	Figura
<i>Saxifraga oppositifolia</i>	0,002 %	- 46 %	3a
<i>Soldanella alpina</i>	0,002 %	- 52 %	3a
<i>Saxifraga</i> + <i>Soldanella</i>	<i>Saxifraga</i> = 0,0003 % <i>Soldanella</i> = 0,00036 %	- 100 %	3b
<i>Saxifraga</i> + <i>Soldanella</i> + Algas nieve	<i>Saxifraga</i> = 0,00033 % <i>Soldanella</i> = 0,0004 % Algas nieve = 0,0022 %	- 92 %	3c

- 35 La figura 3a muestra que el extracto de *Soldanella alpina* reduce los daños inducidos por UV del ADN mitocondrial en queratinocitos (células HaCaT) a razón de un 52 % y el extracto de *Saxifraga oppositifolia* a razón del 46 % en relación con la muestra de control.

40 La combinación de los extractos de *Saxifraga oppositifolia* y *Soldanella alpina* reduce los daños inducidos por UV a razón del 100 % (imagen 3b). Incluso con una proporción del 0,0003 % - 0,00036 % de extractos usados según la invención, se observa una protección significativa, que como muestra la figura 3b, en caso de aumento de la concentración y combinación de los extractos puede aumentar hasta el 100 %.

45 También la combinación con otro extracto de alga o de planta usado preferentemente, *Chlamydomonas* (*Chlamydocapsa* sp. (alga nieve)), conduce a una protección de casi el 100 % frente a los daños inducidos por radiación UV (figura 3c).

3. Protección de ADN celular en caso de radiación UV

- 50 Los daños en el ADN conducen a una influencia negativa en las funciones celulares y finalmente al envejecimiento de la piel. La radiación UV es el factor esencial en el caso de envejecimiento de la piel prematuro (extrínseco).

Se examinaron cultivos epidérmicos en 3D mediante el uso de queratinocitos humanos primarios y medio de cultivo excelente 3D. Tras 18 días se trataron los cultivos durante una hora con 100 µm de o bien una solución de extracto de *Soldanella alpina* en medio o medio solo (muestras de control no tratadas). En caso de una radiación de 1200

55

mJ/cm² (totalidad UV) se expusieron las muestras entonces durante cuatro horas a luz UVB /UVA (20 % / 80 %). Entonces se fijaron las muestras, se incorporaron en parafina, se cortaron y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo monoclonal con dímeros de timina. A continuación, se grabaron imágenes con un microscopio de fluorescencia.

5 Resultado:

10 En la muestra de control sin tratar no se observaron dímeros de timina. En las muestras de control expuestas a UV pudieron verse claramente dímeros de timina nucleares en las capas inferiores de las muestras. A diferencia de ello, en las células tratadas con *Soldanella alpina* (0,1 %) y UV no pudieron verse dímeros. Esto muestra, que el extracto de *Soldanella alpina* impide la formación de daños de ADN inducidos por UV en las células de un modelo de piel tridimensional epidérmico y con ello previene el envejecimiento de la piel prematuro o el fotoenvejecimiento.

15 *4. Retraso del proceso de envejecimiento de queratinocitos humanos (envejecimiento de la piel intrínseco)*

Además de la función de protección de factores extrínsecos, los extractos usados según la invención también muestran una eficacia en lo que se refiere al retraso del proceso de envejecimiento de queratinocitos humanos (envejecimiento de la piel intrínseco).

20 Para ilustrar esto, se incubaron queratinocitos humanos en una fase de crecimiento temprana (células de amplificación transitoria) en un medio definido, en cuanto que estas células envejecen en cuatro semanas, con y sin extracto de *Soldanella* y se determinó la tasa de proliferación de las células como medida de su envejecimiento.

25 Para la evaluación de la función anti-envejecimiento intrínseca de los extractos, se cultivaron las células en medio CnT-07 (medio destinado a células progenitoras) o en medio CnT-AG1, un medio de envejecimiento completamente definido, en el cual los queratinocitos envejecen durante un periodo de tiempo de 4 semanas. Los signos del envejecimiento comprenden una reducción de la tasa de proliferación. La proliferación se midió cada semana con un contador de células automatizado. Durante las dos primeras semanas del envejecimiento las tasas de proliferación de los queratinocitos, los cuales se trataron con extractos de plantas, eran parecidas a aquellas de las células de crecimiento autónomo en medio CnT-AG1. Tras proceso de envejecimiento de 3 a 4 semanas aumentaron no obstante, las diferencias. En la cuarta semana, la tasa de proliferación de las células con extracto de *Soldanella alpina* (0,00024 %) fue a razón de un 40 % mayor en comparación con la muestra de control de CnT-AG1.

35 La figura 4 muestra que la proliferación de las células en el medio de envejecimiento en presencia del extracto de *Soldanella alpina* es tras 2 y 4 semanas mayor que en el medio de envejecimiento sin extracto. Dado que las células envejecidas ya no se multiplican tan rápidamente y de esta manera presentan una tasa de proliferación menor que las células jóvenes, esto muestra, que el envejecimiento intrínseco de las células es ralentizado mediante el extracto de *Soldanella alpina*.

40 *5. Formación de piel epidérmica tras radiación UV*

Mediante la radiación UV también queda dañada la nueva formación de piel epidérmica.

45 La renovación de la epidermis se asegura mediante las células madre epidérmicas y sus descendientes directos, las "células de amplificación transitoria". Si estas células pierden su capacidad para la renovación de la piel, ya sea debido a envejecimiento o debido a estrés externo, por ejemplo, radiación UV, entonces se ralentiza la renovación de la piel en general y la calidad, es decir, el grosor de la epidermis se reduce, y se hacen visibles signos del envejecimiento.

50 Diseño de prueba:

Un indicador importante de la función de células progenitoras de queratinocitos, es la posibilidad de formar una estructura epidérmica en 3D, estratificada. Para evaluar la capacidad de protección de los extractos de plantas usados según la invención, frente a la pérdida de la función de las células progenitoras, se dejaron crecer queratinocitos hasta un 80 % de confluencia en medio de cultivo y se trataron entonces durante 24 horas con 0,002 % de extracto de *Soldanella alpina* o con 0,002 % de extracto de *Saxifraga oppositifolia*. Las células se expusieron entonces a luz UVB / UVA. Las muestras sin exposición a la luz sirvieron como muestra de control negativa. Una hora tras el tratamiento de UV, se sembraron las células para la estructuración de modelos 3D mediante el uso del protocolo estándar. El decimotercero día del cultivo de agitación por aire se extrajeron muestras de modelo 3D, se dispusieron en formalina, se fijaron en parafina, se cortaron y se tiñeron. Las secciones histológicas se evaluaron a continuación bajo el microscopio de luz. Se grabaron imágenes duplicadas y se midió para cada estado el grosor epidérmico (desde la capa basal hacia abajo hacia la capa córnea). Como resultado pudo determinarse, que ambos extractos usados según la invención mantienen el potencial de renovación de la piel de células cutáneas humanas sometidas a estrés inducido por la radiación UV. Sin un tratamiento previo de las células cutáneas con uno de los dos extractos, las células pierden su capacidad de conformar *in vitro* una epidermis tridimensional intacta, cuando se exponen a radiación UV. Los extractos protegen por lo tanto la capacidad de las "células de amplificación transitoria"

de renovación de piel en condiciones de estrés inducido por la radiación UV. El grosor epidérmico de la piel se mantiene, como se representa en las figuras 5 y 6.

6. *Activación del proteasoma en células HaCaT tras estrés inducido por la radiación UV*

5 En otro ensayo se examinó la activación del proteasoma en células HaCaT tras estrés inducido por la radiación UV.

10 El proteasoma es un complejo proteínico, el cual degrada en el citoplasma y en el núcleo celular (en el caso de eucariotas) defectos y proteínas ya no necesarias en fragmentos. El proteasoma es de esta manera un componente del control de calidad de las proteínas.

15 El estrés inducido por la radiación UV inhibe la actividad proteolítica del proteasoma, lo cual conduce a la acumulación de proteínas defectuosas o ya no necesarias e influye finalmente de forma desventajosa en las funciones celulares. En caso de que se agreguen las proteínas defectuosas u oxidadas, esto puede conducir a la conformación del pigmento de envejecimiento lipofuscina.

20 En la figura 7 se muestran los resultados tras el tratamiento de los proteasomas con la combinación según la invención de tres extractos de plantas (*Saxifraga oppositifolia*, *Soldanella alpina* y *Chlamydocapsa* sp.): la actividad de los proteasomas en las células HaCaT tras la radiación UV (70 mJ/cm² UVB + 10 J/cm² UVA) vuelve a aumentar y a reactivarse, y en concreto a razón del 48 %.

Las concentraciones (% en peso) de los extractos fueron de: *Saxifraga* 0,00033 %, *Soldanella* 0,00044 % y *Chlamydocapsa* 0,0022 %.

25 7. *Inhibición de la liberación de las metaloproteinasas de matriz MMP-1 y MMP-3 tras estrés inducido por la radiación UVA en fibroblastos dérmicos humanos*

30 Se llevaron a cabo pruebas adicionales en lo que se refiere a la inhibición de la liberación de las metaloproteinasas de matriz MMP-1 y MMP-3 tras estrés inducido por la radiación UVA en fibroblastos dérmicos humanos.

Las metaloproteinasas de matriz son proteasas, las cuales degradan componentes de la matriz extracelular. La luz UV puede estimular la expresión de metaloproteinasas de matriz.

35 MMP-1 es una colagenasa, es decir, una proteínasa de degradación de colágeno. MMP-3 degrada además de diferentes colagenasas, también fibronectina, elastina y laminina y tiene una importancia central en la modulación del tejido conjuntivo y en la sanación de las heridas.

40 Una preparación según la invención, la cual comprende una combinación de extractos de *Saxifraga oppositifolia* (0,00135 %) y *Soldanella alpina* (0,0018 %), inhibe la expresión inducida por UV de MMP-1 y de MMP-3 de forma significativa y previene debido a ello el envejecimiento de la piel inducido por la luz, como queda claro a partir de las figuras 8a y 8b.

45 8. *Formación de colonias mediante células progenitoras de queratinocitos epidérmicos primarios tras radiación UV o tratamiento con peróxido de hidrógeno*

50 La combinación según la invención de los extractos de *Saxifraga oppositifolia*, *Soldanella alpina* y/o *Chlamydomonas* sp., en particular la combinación de los tres extractos, protege el potencial de proliferación de células madre en caso de estrés inducido por la radiación UV u oxidativo, como se mide en la capacidad de las células, de conformar colonias *in vitro* (*Colony Forming Efficiency* = CFE, eficiencia de conformación de colonias). Para ello se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Radiación UV:

55 Se sembraron células progenitoras de queratinocitos epidérmicos primarios en presencia de la combinación de extractos en medio de cultivo CnT-07 y se dejaron crecer durante 48 horas. Cada muestra fue expuesta entonces a una radiación de una fuente de luz UVA y UVB (1200 mJ o 1800 mJ). Se llevó a cabo igualmente una prueba con una muestra no expuesta a radiación. Tras la exposición a la luz, se sembraron las células para los ensayos CFE con una densidad reducida y se cultivaron. Los cultivos fueron entonces fijados y teñidos y se contaron las colonias. Las evaluaciones CFE se llevaron a cabo tres veces. Las células no tratadas se usaron como muestra de control.

Peróxido de hidrógeno:

65 Con un diseño experimental parecido al descrito para la radiación UV, se evaluó la CFE en caso de carga de peróxido de hidrógeno.

Tal como muestran los resultados representados gráficamente en la figura 9a, la combinación de extractos usada según la invención protege el potencial de proliferación de las células madre epidérmicas de forma significativa frente a la radiación UV. De esta manera, la cantidad de las colonias conformadas en presencia de los extractos se duplica en comparación con la muestra de control sin tratar en 1200 mJ/cm². Los extractos protegen igualmente frente a las influencias negativas de los peróxidos (10 µm) sobre la capacidad de proliferación de las células madre epidérmicas (Fig. 9b).

9. *Formación de colonias esféricas mediante células progenitoras dérmicas tras radiación UV*

Los extractos de plantas usados según la invención no solo protegen células madre epidérmicas, sino también dérmicas frente a los efectos negativos de radiación UV en su capacidad de proliferación.

Las células progenitoras dérmicas (aisladas de papila dérmica) se cultivaron en monocapas en presencia o en ausencia de los extractos durante un periodo de tiempo de 2 días y se irradiaron entonces con una fuente de luz UVA y UVB con una dosis de 1200 mJ o 1800 mJ. La conformación de colonias esféricas se evaluó tras aproximadamente 5 días de cultivo.

La capacidad de proliferación de las células madre dérmicas se determinó mediante su capacidad de conformar colonias esféricas (esferas). Mientras que en la muestra de control (sin extractos) la cantidad de las esferas conformadas bajo radiación UV (1200 mJ o 1800 mJ) se redujo a razón del 50 % o del 62 %, la cantidad de las esferas aumentó en presencia de los extractos a razón de hasta un 100 % (figura 10).

Las células madre, epidérmicas o dérmicas, o sus descendientes participan de manera esencial en el mantenimiento rutinario o la renovación de la correspondiente capa cutánea. La protección de estas células frente a factores de estrés como la radiación UV o los radicales libres contribuye de esta manera de forma esencial al mantenimiento de una piel joven, sana y bonita.

Los siguientes ejemplos no limitadores, han de aclarar adicionalmente la presente invención.

30 **Ejemplo 1**

Preparación de cuidado con contenido de aceite

INCI	% en peso
PRUNUS AMYGDALUS DULCIS (SWEET ALMOND) OIL	91,0370
HELIANTHUS ANNUUS (SUNFLOWER) SEED OIL	4,0000
SIMMONDSIA CHINENSIS (JOJOBA) SEED OIL	1,1000
SILYBUM MARIANUM ETHYL ESTER	1,0000
FRAGRANCE (PARFUM)	1,5000
PHENOXYETHANOL	0,6000
CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE	0,5000
TOCOPHERYL ACETATE	0,1000
C 10-18 TRIGLYCERIDES	0,0995
BRASSICA CAMPESTRIS (RAPESEED) SEED OIL	0,0495
ALGAE EXTRACT	0,0100
SAXIFRAGA OPPOSITIFOLIA EXTRACT	0,0040
SOLDANELLA ALPINA EXTRACT	0,0016
	100,0000

La composición puede ser completada ventajosamente con otros aceites vegetales, vitaminas solubles en aceite y/o antioxidantes.

Ejemplo 2

40 Emulsión agua en aceite

INCI	% en peso
WATER (AQUA)	42,400
GLYCERIN	15,170
CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE	10,500
BUTYLENE GLYCOL	6,150
COCO-CAPRYLATE/CAPRATE	4,000
CYCLOPENTASILOXANE	3,500
DIMETHICONE	3,000
GLYCERYL STEARATE	2,000

CETYL ALCOHOL	2,000
MALTODEXTRIN	1,900
PEG-40 STEARATE	1,800
POTASSIUM CETYL PHOSPHATE	1,600
BUTYROSPERMUM PARKII (SHEA BUTTER)	1,500
PHENOXYETHANOL	0,900
SORBITAN TRISTEARATE	0,700
CARBOMER	0,500
FRAGRANCE (PARFUM)	0,350
CALCIUM ALUMINUM BOROSILICATE	0,338
ETHYLHEXYLGLYCERIN	0,300
SODIUM ACRYLATE/SODIUM ACRYLOYLDIMETHYL TAURATE COPOLYMER	0,247
PROPANEDIOL	0,200
SODIUM HYDROXIDE	0,176
ISOHEXADECANE	0,163
PENTYLENE GLYCOL	0,150
TITANIUM DIOXIDE	0,135
ISOMALT	0,092
SODIUM HYALURONATE	0,070
TRITICUM VULGARE (WHEAT) FLOUR LIPIDS	0,050
POLYSORBATE 80	0,046
PEG-8	0,025
SILICA	0,023
CHLAMYDOMONAS EXTRACT	0,006
SOLDANELLA ALPINA EXTRACT	0,004
SAXIFRAGA OPPOSITIFOLIA EXTRACT	0,003
CITRIC ACID	0,002
POTASSIUM SORBATE	0,001
	100,000

Los extractos solubles en aceite y en agua usados en los ejemplos muestran ambas las ventajas mencionadas en lo que se refiere a la función de protección frente a factores de influencia extrínsecos e intrínsecos.

5 Esta preparación puede contener ventajosamente de forma adicional uno o varios de los siguientes componentes:

Cellular Complex (La Prairie), péptidos, extractos de plantas, extractos de células madre vegetales, biopolímeros, vitaminas, antioxidantes.

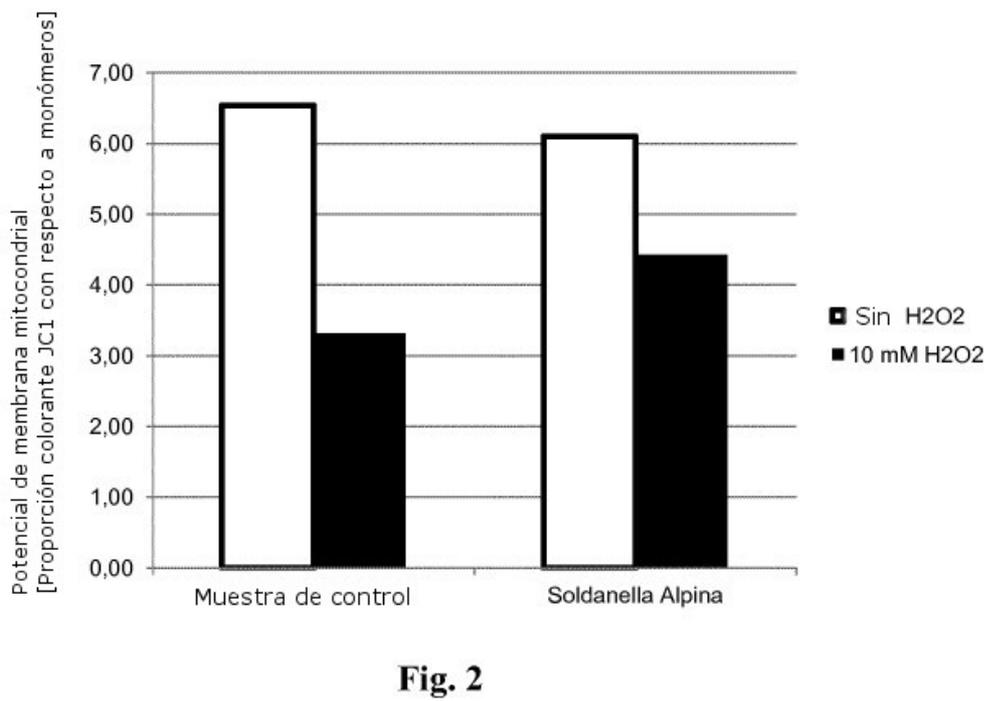
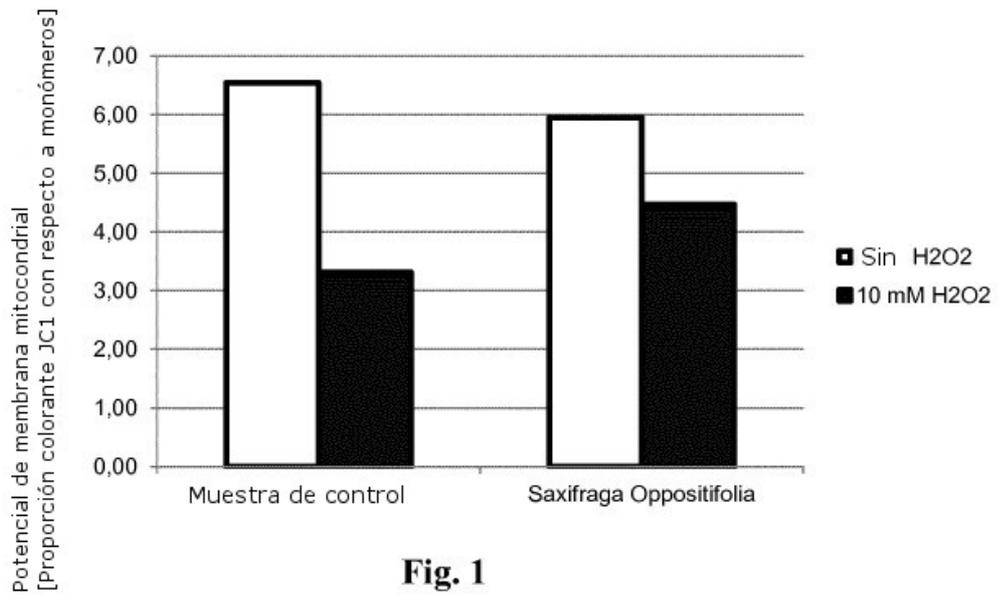
El Cellular Complex comprende una combinación de

- 10 a) glicoproteína 1, que puede obtenerse a partir de la fracción citoplasmática purificada de levaduras (*Saccharomyces*),
- b) glicoproteína 2, que puede obtenerse a partir de la fracción citoplasmática de *Lactobacillus*,
- 15 c) extracto de ginseng y
- d) extracto de cola de caballo (horsetail extract, *Equisetum Arvense* extract)

en correspondencia con el documento US 5840309.

REIVINDICACIONES

1. Preparación cosmética o dermatológica, que comprende (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* y/o (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina*.
5
2. Preparación según la reivindicación 1, que comprende al menos (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia*.
3. Preparación según la reivindicación 1, que comprende al menos (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina*.
10
4. Preparación según la reivindicación 1, que comprende tanto (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia*, como también (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina*.
5. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que, referida a la masa total de la preparación, no contiene más del 15 % en peso, preferentemente no más del 5 % en peso y en particular del 0,0001 al 0,5 % en peso de respectivamente (i) y/o (ii).
15
6. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual (i) y/o (ii) comprenden al menos un extracto soluble en agua.
20
7. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual (i) y/o (ii) comprenden al menos un extracto soluble en aceite.
8. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual todos los extractos (i) y/o (ii) son o bien solubles en agua o solubles en aceite.
25
9. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual (i) y/o (ii) se obtuvieron mediante extracción de hojas de planta y/o de tallos de planta.
10. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente (iii) uno o varios extractos de *Chlamydocapsa* sp.
30
11. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos un extracto diferente de (i), (ii) y (iii).
35
12. Preparación según la reivindicación 11, que comprende adicionalmente uno o varios extractos elegidos de los siguientes extractos: extracto de *Artemisia umbelliformis*, extracto de *Rubus idaeus* (frambuesa), extracto de hoja de *Plantago lanceolata*, extracto de *Saccharomyces cerevisiae*, extracto de raíz de *Panax ginseng*, extracto de *Equisetum arvense*, extracto de *Evernia furfuracea* (musgo de árbol).
40
13. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, que no contiene extractos de plantas adicionales.
14. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos un aminoácido.
45
15. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se presenta en forma de una emulsión.
16. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en cuyo caso se trata de una preparación tópica.
50
17. Uso de uno o de varios extractos de *Soldanella alpina* para la producción de preparaciones farmacéuticas, en particular dermatológicas.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que se usa adicionalmente al menos un extracto de *Saxifraga oppositifolia* y/o de *Chlamydocapsa* sp.
55
19. Uso no terapéutico de preparaciones cosméticas, que comprenden (i) uno o varios extractos de *Saxifraga oppositifolia* y/o (ii) uno o varios extractos de *Soldanella alpina*, así como eventualmente uno o varios extractos de *Chlamydocapsa* sp., para reducir o para evitar daños en la piel debidos a factores extrínsecos y/o intrínsecos.
60
20. Uso según la reivindicación 19, **caracterizado por que** la preparación comprende al menos dos de los extractos.



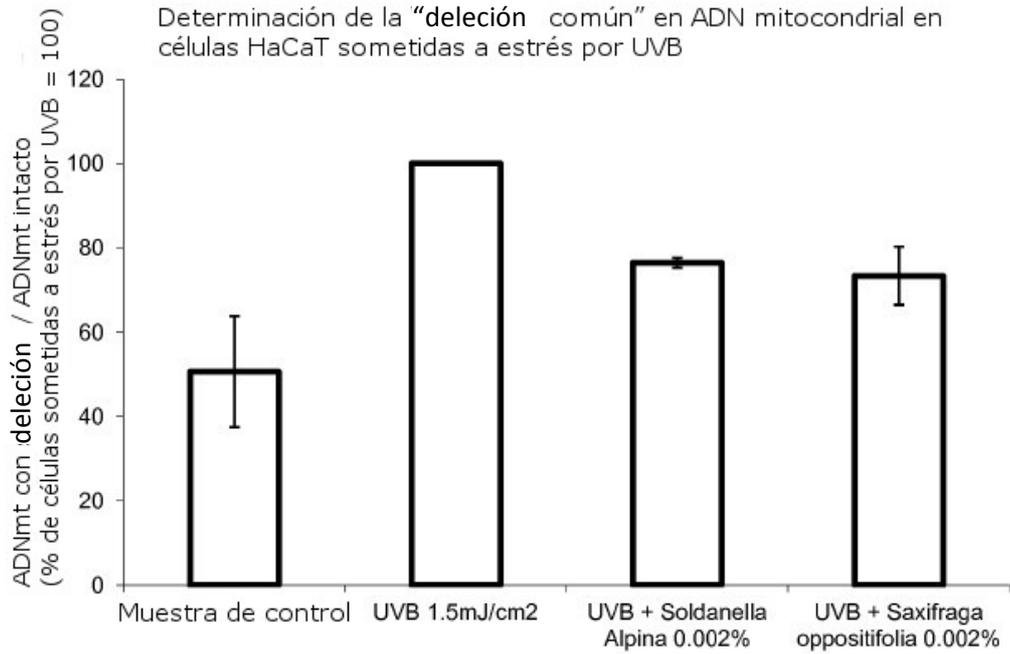


Fig. 3a

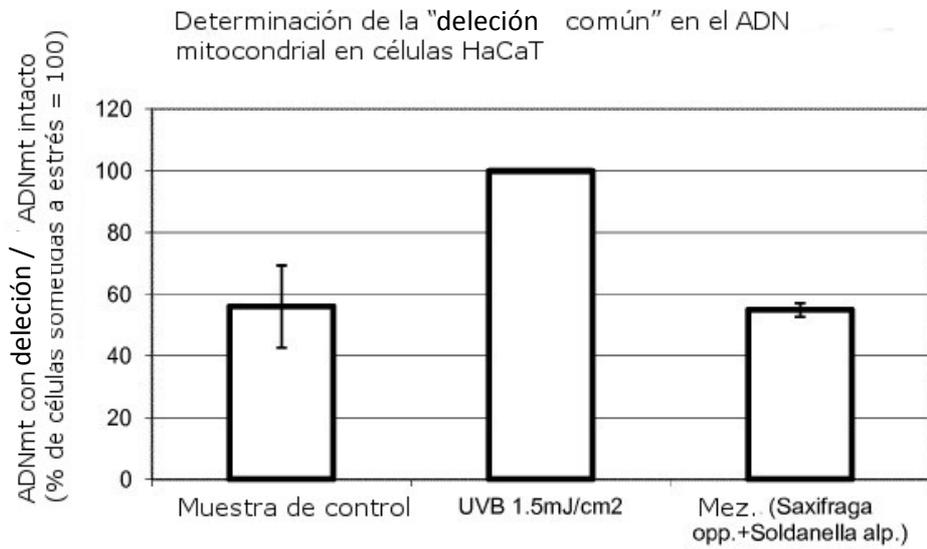


Fig. 3b

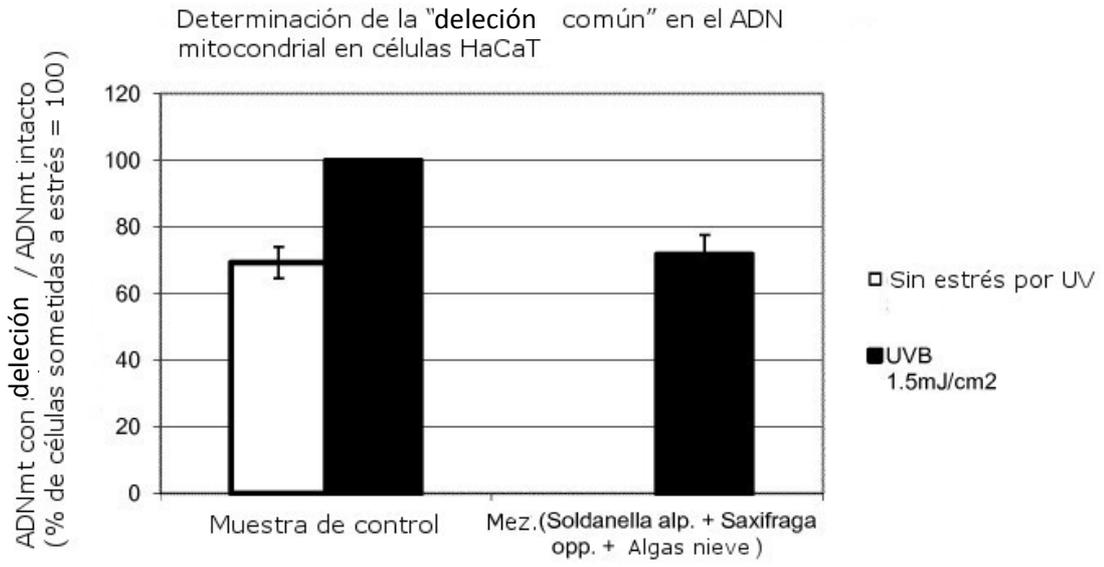


Fig. 3c

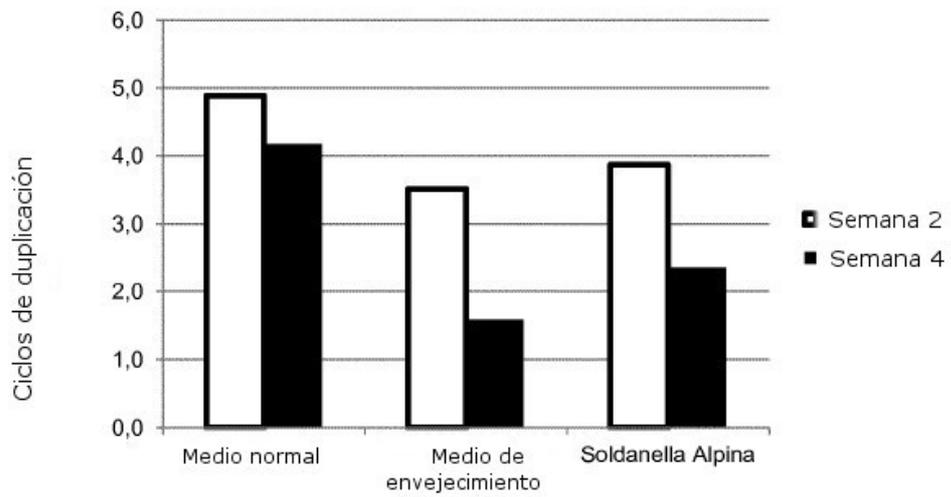


Fig. 4

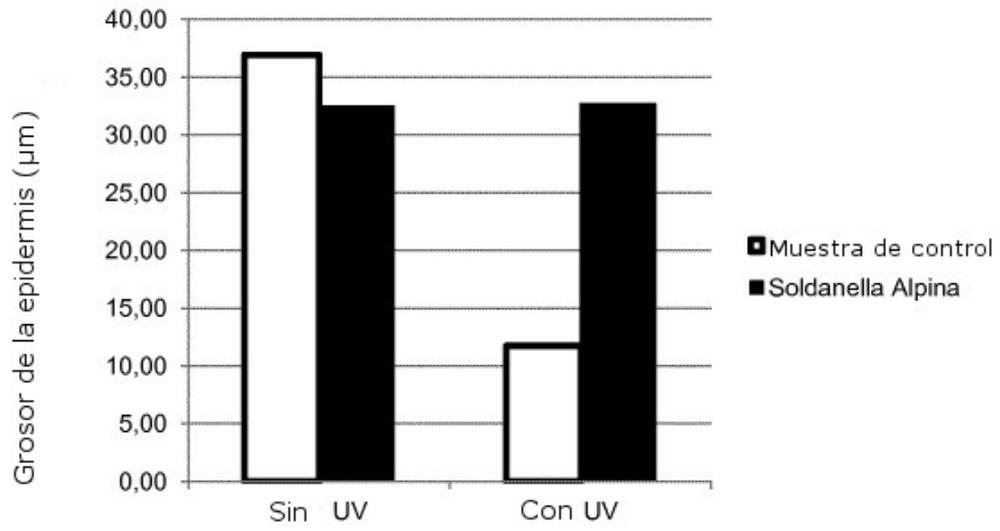


Fig. 5

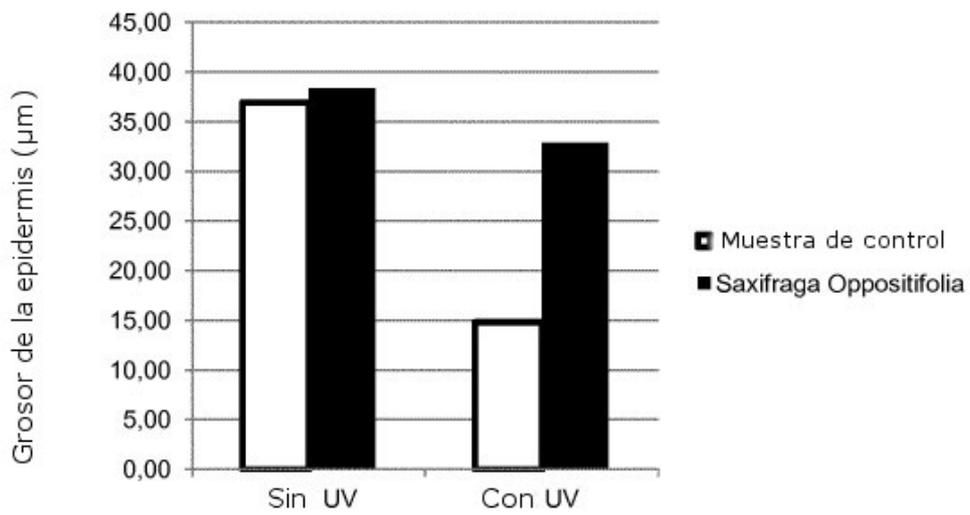


Fig. 6

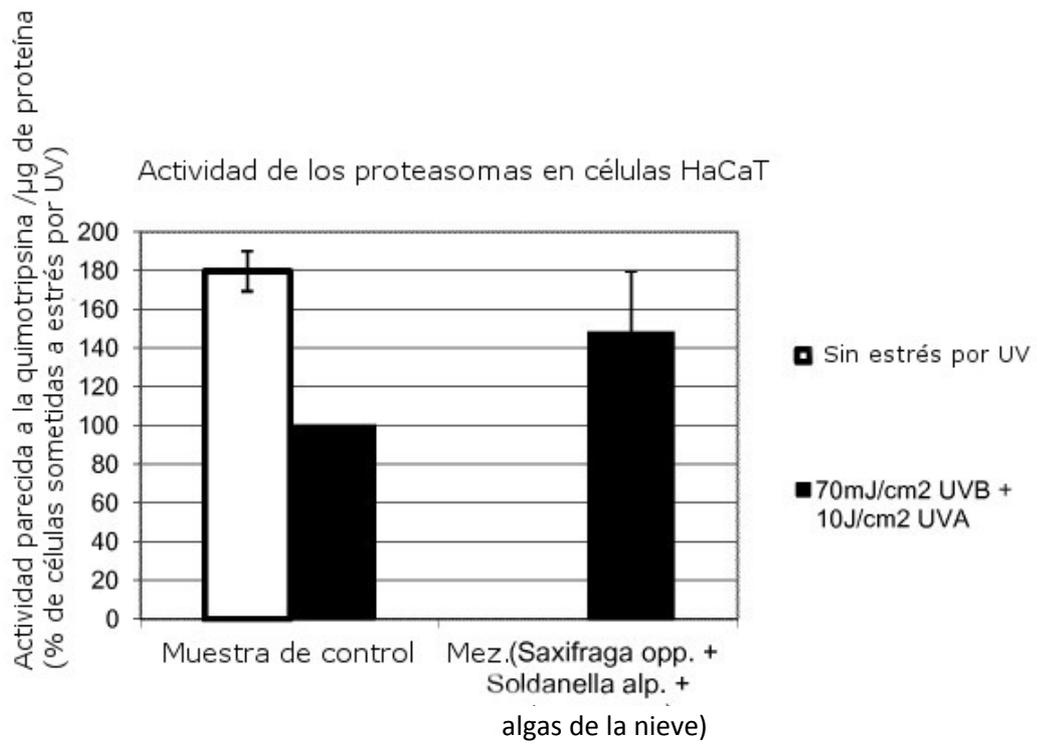


Fig. 7

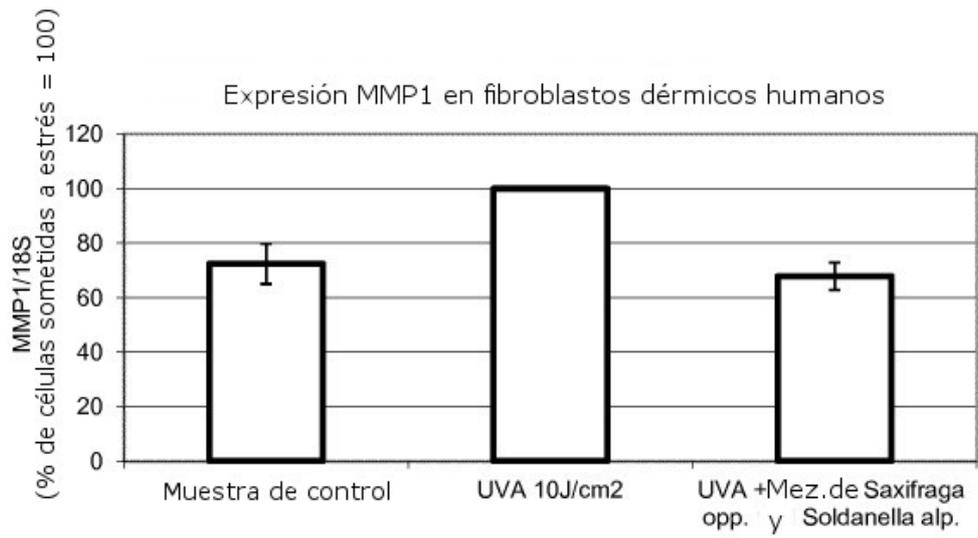


Fig. 8a

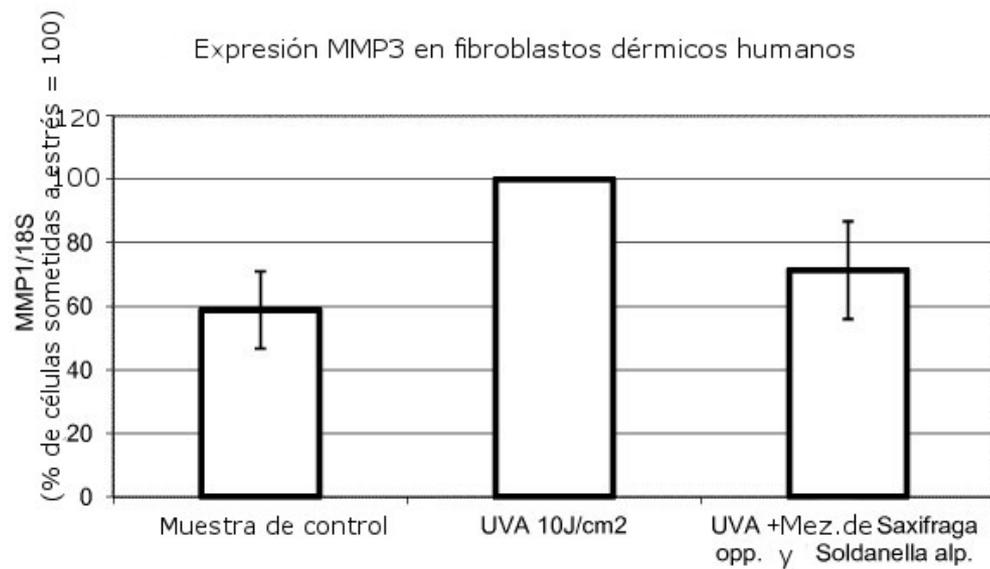


Fig. 8b

Formación de colonias tras radiación UV

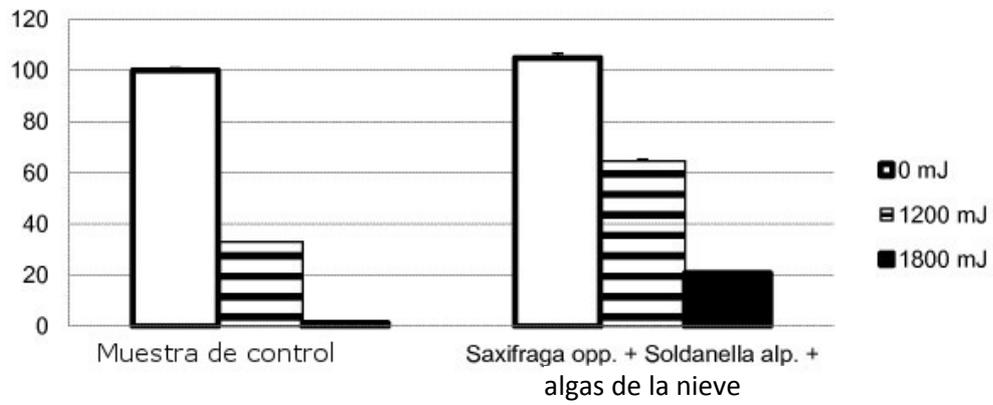


Fig. 9a

Formación de colonias tras tratamiento con peróxido de hidrógeno

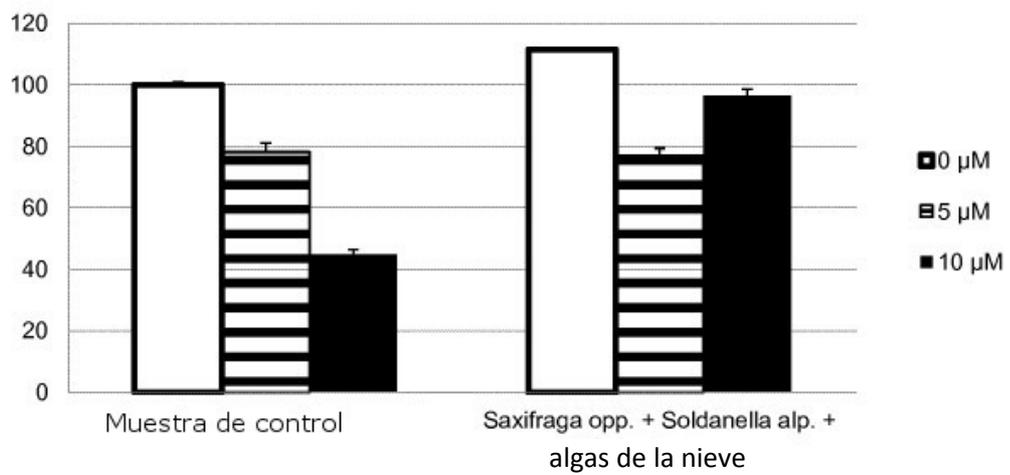


Fig. 9b

Formación de colonias esféricas tras radiación de UV

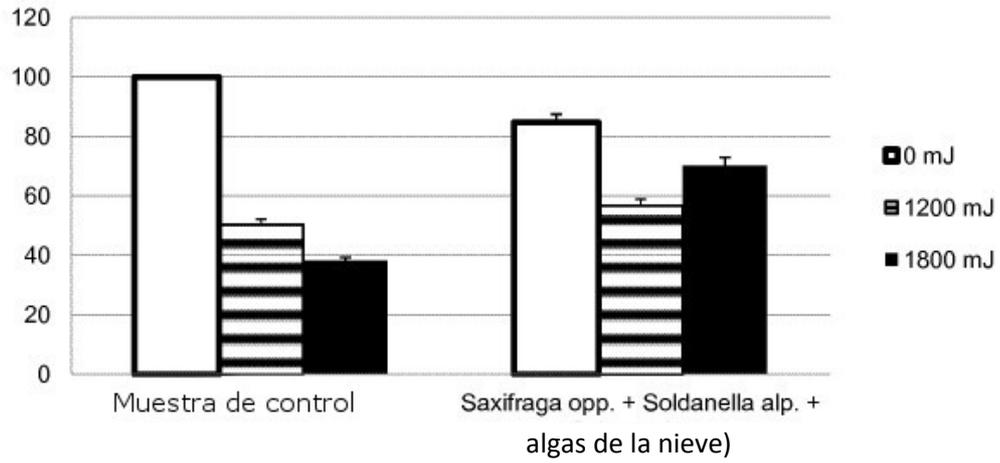


Fig. 10