

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 511**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2016** **E 16166002 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 3085418**

54 Título: **Composiciones cosméticas que comprenden unos oligómeros de ácidos hialurónico y unas células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán**

30 Prioridad:

20.04.2015 FR 1553493

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DE RECHERCHE COSMÉTIQUE
S.À.R.L. (100.0%)
4 Place de Paris
2314 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**LECONTE, NADINE y
FIORENTINO, JULIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 638 511 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

Composiciones cosméticas que comprenden unos oligómeros de ácidos hialurónico y unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán

5 La presente invención se refiere al campo técnico general de los productos cosméticos para uso tópico, utilizables en particular sobre la piel.

10 Más precisamente, la presente invención se refiere a composiciones cosméticas para aplicación tópica que comprenden unos oligómeros de ácido hialurónico y unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán. Se refiere también a un procedimiento cosmético no terapéutico para los cuidados de la piel que utiliza tal composición, así como a la utilización no terapéutica de tal composición cosmética para el cuidado de la piel, y en particular para mejorar la firmeza de la piel, en particular favoreciendo la regeneración de la dermis, y para reducir las arrugas cutáneas.

15 La piel es un verdadero órgano que comprende varias capas integradas, que va desde la capa superficial, la epidermis, hasta las capas más profundas, la dermis y la hipodermis, y cada una de estas capas posee unas propiedades específicas que permiten al conjunto reaccionar y adaptarse a las condiciones de su entorno y conferir a la piel su flexibilidad y su resistencia.

20 La epidermis, principalmente compuesta de queratinocitos de melanocitos y de células de Langerhans, tiene un papel fundamental para asegurar la protección y el mantenimiento de una buena troficidad. Los queratinocitos son unas células extremadamente dinámicas que sufren una proliferación y una diferenciación permanentes al final de las cuales se transforman en células muertas (corneocitos), eliminándose regularmente por descamación.

25 La dermis se compone principalmente de colágeno, de elastina y de proteoglicanos, moléculas sintetizadas por los fibroblastos dérmicos. Las fibras de colágeno aseguran la resistencia mecánica y la textura de la piel, la elastina es responsable de la elasticidad, y los proteoglicanos, que combinan proteínas y glicosaminoglicanos, desempeñan una función principal de estructura y de hidratación de la piel. Los glicosaminoglicanos, tales como el ácido hialurónico, son unas moléculas muy higroscópicas que son capaces de retener unas cantidades importantes de agua. Otras células, como los macrófagos y los leucocitos, están también presentes en la capa de la dermis.

30 La hipodermis, que es la capa más profunda de la piel, contiene los adipocitos que producen unos lípidos para que el tejido subcutáneo fabrique una capa grasa que protege los músculos, los huesos y los órganos internos contra los choques.

35 El colágeno es una proteína de estructura principal que presenta más del 70% de la cantidad de proteínas de la piel. Se describen 14 tipos de colágeno en la piel humana. El colágeno I es el principal y representa el 90% del colágeno total en la piel.

40 A lo largo del tiempo, se producen profundas modificaciones a nivel de la dermis. La población de fibroblastos, células especializadas en la síntesis de las fibras de elastina y de colágeno, disminuirá a la mitad entre los 20 y los 80 años. Estos fibroblastos aseguran el equilibrio entre la síntesis, la maduración y la degradación de las fibras de elastina y de colágeno. En el tiempo, el equilibrio se desplazará hacia una degradación de estas fibras con, como resultado, una pérdida de elasticidad y de tonicidad de la dermis y una flacidez que se opone más a los efectos de contracción de los músculos subyacentes, llevando a la aparición de arrugas. Así, con el envejecimiento, la dermis sufre un adelgazamiento y una rigidificación: la piel es menos flexible, menos firme con la edad y aparecen arrugas. Además, la piel debe continuamente hacer frente a múltiples agresiones exteriores que pueden acelerar el proceso natural del envejecimiento.

50 De este modo, se buscan constantemente nuevos activos cosméticos a fin de luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento y, en particular contra la atrofia de la dermis y la aparición de arrugas.

55 Las células elicidadas y desdiferenciadas de cultivo vegetal de buganvilla se describen en la solicitud de patente FR 14 53647. Estas células permiten transportar cualquier tipo de ingrediente activo y liberarlos de manera progresiva en el núcleo de las diferentes capas de la epidermis, aunque estos ingredientes activos sean hidrosolubles o liposolubles. En efecto, las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla se presentan en forma de vesículas que comprenden una membrana vegetal formada de una bicapa lipídica que delimita un volumen interno que contiene una fase encapsulada. Los constituyentes de la membrana son idénticos a los lípidos inter-corneocitarios de la capa superior de la epidermis y a los lípidos intercelulares (ácidos grasos, ceramidas, colesterol). Así, después de la aplicación de las células desdiferenciadas y elicidadas, el contenido celular se difundirá por simple cizallamiento de la piel: el o los ingredientes activos se benefician de una encapsulación natural y de una liberación por biomimetismo. Así, tras la aplicación sobre la piel, la acción de las células se efectúa en 3 tiempos, que son 1) la fragmentación de las membranas lipídicas de las células enteras, 2) la inserción en los lípidos inter-corneocitarios y 3) la liberación progresiva del o de los ingredientes activos por bio-mimetismo dentro de la epidermis. Se ha demostrado así que la encapsulación de un extracto de azafrán, como ingrediente activo, por las células

desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla tiene un efecto positivo sobre la proliferación de las células de la dermis y de la epidermis de la piel, favoreciendo así su regeneración.

5 Sin embargo, aunque esta composición tiene un efecto favorable sobre la abundancia del colágeno I y la regeneración de la dermis, permanece la necesidad de proponer nuevos ingredientes activos que permitan luchar más eficazmente contra los signos del envejecimiento cutáneo y, en particular, contra la pérdida de firmeza de la piel y la aparición de arrugas.

10 El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano presente en todos los vertebrados, principalmente en los tejidos conjuntivos, epiteliales y nerviosos. Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. El ácido hialurónico es un constituyente natural de la dermis que desempeña una función importante en la hidratación, la tonicidad y la elasticidad de la piel. Es en los organismos jóvenes donde se encuentra en mayor cantidad. En efecto, con el tiempo, su presencia disminuye, en particular por que los radicales libres a los que estamos expuestos (sol, polución, etc.) lo destruyen.

15 En cosmética, los oligómeros de ácido hialurónico de bajo peso molecular (es decir generalmente inferior a 10 kDa) desempeñan una función importante en la migración y la proliferación de las células, dos procesos que intervienen durante cualquier regeneración, reconstrucción, o cicatrización de las heridas. Las capacidades regeneradoras de los oligómeros de bajo peso molecular pueden utilizarse por lo tanto eficazmente para tratar el envejecimiento de la piel.

20 Los trabajos realizados por la solicitante han mostrado que unos oligómeros de ácido hialurónico de bajo peso molecular, es decir inferior a 10 kDa, potencializan el efecto de las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán sobre la proliferación de las células de la dermis, más particularmente sobre la síntesis del colágeno I, favoreciendo así su regeneración. La asociación de oligómeros de ácido hialurónico de bajo peso molecular, es decir inferior a 10 kDa, y de células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán puede, por lo tanto, utilizarse ventajosamente a favor para el cuidado de la piel, y en particular para favorecer la regeneración de la dermis. Además, a las dosis utilizadas, los ensayos efectuados han mostrado que las composiciones cosméticas a base de células desdiferenciadas de buganvilla utilizadas en la presente invención no presentan ninguna citotoxicidad.

25 La presente invención tiene por lo tanto como primer objeto una composición cosmética que comprende unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que se presentan en forma de vesículas, comprendiendo dichas vesículas una membrana vegetal formada de una bicapa lipídica que delimita un volumen interno que contiene una fase encapsulada, caracterizándose dicha composición por que comprende además al menos un oligómero de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa y por que un extracto de azafrán está presente en la fase encapsulada de las vesículas.

35 Según la invención, la composición cosmética es preferentemente una composición cosmética para aplicación tópica.

40 La invención tiene también como otro objeto un procedimiento cosmético no terapéutico para los cuidados de la piel, en particular para mejorar la firmeza de la piel, favoreciendo la regeneración de la dermis, y para reducir las arrugas cutáneas, caracterizado por que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tal como se ha definido anteriormente, es decir una composición cosmética que comprende al menos un oligómero de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa y unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que se presentan en forma de vesículas, cuya fase encapsulada comprende al menos un extracto de azafrán. Finalmente, la invención tiene por objeto la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que comprende al menos un oligómero de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa y unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán, para los cuidados de la piel, en particular para mejorar la firmeza de la piel, en particular favoreciendo la regeneración de la dermis de la piel, y para reducir las arrugas cutáneas.

50 Todas las especies de buganvilla se pueden utilizar según la presente invención, pero se pueden mencionar en particular *Bougainvillea glabra*, *Bougainvillea alba*, *Bougainvillea spectabilis*, *Bougainvillea infesta*, et *Bougainvillea buttiana*.

55 Por células vegetales desdiferenciadas de buganvilla, se entiende cualquier célula vegetal procedente de un cultivo *in vitro* de células de buganvilla, no presentando dichas células ningún carácter de una especialización particular y siendo capaces de vivir por ellas mismas y sin depender de otras células.

60 Las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla utilizables según la presente invención se pueden obtener mediante técnicas conocidas de crecimiento o multiplicación celular, en medio líquido o sólido, de células de buganvilla cultivadas *in vitro* en un entorno controlado, en condiciones asépticas en ausencia de microorganismos.

65 La técnica de cultivo vegetal presenta la ventaja de producir unas células cultivadas en condiciones del entorno bien

definidas y reproducibles, en lo que se refiere en particular a la temperatura, la luz y el medio de cultivo y producir unas células no diferenciadas que se encuentran en la misma etapa fisiológica en un instante dado (desdiferenciadas). Otra ventaja es la formación de metabolitos secundarios en un tiempo más corto, del orden de una a tres semanas, que en la planta, en la que este plazo es de varios meses.

5 Por ejemplo, se pueden preparar unas células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla a partir de explantes de hojas, flores, tallo o raíz.

10 Las células desdiferenciadas y elicitadas utilizables según la invención se pueden obtener mediante cualquier método conocido por la técnica anterior tal como, por ejemplo, según los métodos descritos por E. F. George y P. D. Sherrington en Plant Propagation by tissue culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories (Exegetics Ltd, 1984).

15 Los medios de cultivo utilizables según la invención son los generalmente conocidos por el experto en la materia. Se puede citar a título de ejemplo los medios de Gamborg, de Murashige Skoog, de Heller, de White, y cuya descripción completa puede encontrarse en «Plant Culture Media: formulations and uses», E. F. George, DJM Puttock y H. J. George (Exegetics Ltd 1987, Tomos 1 y 2).

20 Se entiende por "elicitación" la realización de una tensión o de una agresión (biológica, química o física) sobre las células vegetales en su medio de cultivo a fin de provocar uno o varios mecanismos de defensa que se concretizan en particular, pero no únicamente, por la síntesis de metabolitos secundarios de interés tales como las fitoalexinas.

25 Según la invención, la elicitación de las células desdiferenciadas de buganvilla en medio de cultivo se puede realizar por aplicación de agentes químicos o de tensiones diversas tales como presión, depresión, vacío, variación de presión, presencia de un gas, atmósfera variable, calor, frío, luz, ciclos de luminosidad, radiaciones, toxinas, agitación, contaminación por microorganismos (bacterias, levaduras, virus), ultrasonidos, rayos infrarrojos o ultravioleta, asfixia.

30 Según la presente invención, se pueden utilizar más particularmente unas células desdiferenciadas, elicitadas y liofilizadas de buganvillas. La liofilización de las células permite mejorar su conservación y, a continuación, facilitar su incorporación en las composiciones cosméticas.

Los elementos determinados en las células liofilizadas son los siguientes (para 100 g de células liofilizadas):

35 Proteínas (determinadas según el método descrito en el decreto del 8 de septiembre de 1977 relativo a los métodos oficiales de análisis de los productos dietéticos y de régimen): 13,56 g

40 El aminograma del extracto proteico ha puesto en evidencia los principales aminoácidos siguientes. A continuación, los contenidos en aminoácidos se indican en gramos por 100 g de células liofilizadas.

Ácido aspártico	10,61
Ácido glutámico	10,15
Prolina	6,75
Lisina	6,38
Valina	5,79
Alanina	5,29
Serina	5,27
Glicina	4,82
Arginina	4,72
Glutamina	4,63
Isoleucina	4,61
Leucina	4,60
Fenilalanina	4,25
Treonina	4,01
Tirosina	3,70
Asparagina	3,29
Triptofano	3,02
Metionina	2,58
Cisteína	1,89
Ornitina	0,24

45 Lípidos (determinados según el método descrito en el decreto del 8 de septiembre de 1977 relativo a los métodos oficiales de análisis de los productos dietéticos y de régimen): 1,08 g, que se compone en particular del 73% en masa aproximadamente de ácidos grasos saturados e insaturados de C₁₈ y del 21% en masa aproximadamente de ácidos grasos saturados de C₁₆.

Azúcares (determinados por cromatografía iónica – detección amperométrica pulsada (PAD)):

- Glucosa	11,23 g
- Fructosa	13,10 g
- Lactosa	< 0,12 g
- Sacarosa	10,78 g
- Maltosa	< 0,13 g

5 Las células elicidadas y desdiferenciadas de buganvilla según la presente invención encapsulan un extracto de flores de azafrán (*Crocus sativus*) a título de ingrediente activo. El extracto de azafrán se puede obtener a partir de flores de azafrán, después de la retirada de los estigmas y de los pistilos. Las flores sin estigmas y pistilos se secan después, se reducen a polvo y después se extraen con agua por maceración.

10 Así, las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán se obtienen preferentemente mediante el procedimiento que comprende las etapas siguientes:

1) la preparación de células desdiferenciadas por cultivo *in vitro* en medio de cultivo de explantes de buganvilla,

15 2) la elicitación de las células desdiferenciadas obtenidas en la etapa anterior en el medio de cultivo,

3) la extracción de las células desdiferenciadas y elicidadas obtenidas anteriormente en la etapa anterior,

20 4) la incubación de las células desdiferenciadas y elicidadas obtenidas en la etapa 3) con una solución o una dispersión que contiene el extracto de azafrán en el medio líquido.

25 La etapa 4) de incubación se realiza preferentemente a una temperatura inferior o igual a 30°C, y aún más preferiblemente a una temperatura que varía de 20 a 30°C, durante un tiempo de 12 a 48 horas aproximadamente. El medio líquido utilizable para efectuar la incubación de las células desdiferenciadas y elicidadas con el o los ingredientes activos se puede seleccionar entre los medios utilizados en la etapa 1) del procedimiento para el cultivo *in vitro* de las células, es decir para la multiplicación celular de las células de buganvilla.

Al final de la incubación, las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan el extracto de azafrán se pueden recuperar en el medio líquido, por ejemplo por filtración.

30 La cantidad de extracto de azafrán presente en la fase encapsulada varía generalmente del 0,01 al 5% en masa aproximadamente con respecto a la masa total de las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla, y aún más preferiblemente del 0,1 al 3% en masa aproximadamente. De manera muy particularmente preferida, la cantidad de extracto de azafrán presente en la fase encapsulada es del 1% en masa aproximadamente.

35 Según la invención, la fase encapsulada es preferentemente una fase acuosa seleccionada entre el agua y los medios de cultivo utilizados para el cultivo *in vitro* de dichas células.

40 Según una forma particularmente ventajosa de la invención, las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan el extracto de azafrán se dispersan en glicerina para obtener una suspensión de células, antes de ser incorporadas en una composición cosmética. Así, según una forma de realización preferida de la invención, las células desdiferenciadas y elicidadas que encapsulan un extracto de azafrán están presentes en forma de una suspensión de dichas células en la glicerina. Preferentemente, la cantidad de células desdiferenciadas y elicidadas que encapsulan un extracto de azafrán dentro de dicha suspensión varía del 15 al 30% en masa aproximadamente, y aún más preferiblemente es del orden del 20% en masa aproximadamente con respecto a la masa total de dicha suspensión.

45 Así, según esta forma particular de realización de la invención, la composición cosmética puede entonces comprender del 0,01% al 10% en masa aproximadamente de una suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán en la glicerina y tal como se ha descrito anteriormente, con respecto a la masa total de la composición cosmética, preferentemente del 0,05% al 5% en masa aproximadamente, y aún más preferiblemente del 0,1% al 3% en masa aproximadamente.

50 Según la invención, el o los oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa responden preferentemente a la fórmula $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$, en la que n es un número entero inferior a 25 que designa el grado de polimerización.

55 Según una forma de realización preferida de la invención, n está comprendido entre 5 y 25.

60 De manera ventajosa, la concentración en oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa en la composición cosmética de la invención puede variar del 0,01% al 1% aproximadamente, preferentemente del 0,05% al 0,5% aproximadamente, y aún más preferiblemente del 0,1 al 0,3% aproximadamente en masa con respecto a la

masa total de la composición cosmética.

Los oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa utilizables en el ámbito de la invención se pueden obtener gracias a la producción de ácido hialurónico según unos procedimientos biotecnológicos bien conocidos por el experto en la materia y tales como se describen por ejemplo por Schiraldi C. *et al.* («Biotechnological Production and Application of Hyaluronan», en *Biopolymers*, M. Elnashar, Ed., p. 387-412, InTech, Rijeka, Croatia, 2010) seguido de hidrólisis del ácido hialurónico a fin de obtener unos oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa.

Los métodos de medición del peso molecular de los oligómeros de ácido hialurónico utilizables según la invención son los generalmente conocidos por el experto en la materia, y tales como se describen por ejemplo por Mahnoey D.J. *et al.* («Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length», *Glycobiology*. 2001, 11(12), 1025-1033).

Se puede citar a título de ejemplo la combinación de difusión de la luz con ángulos múltiples acoplada con una cromatografía de exclusión sérica (MALLS-SEC) que separa las proteínas según su volumen hidrodinámico y permite acceder a la masa molecular de las especies y a la homogeneidad de un pico a la salida de la cromatografía de exclusión sérica. El peso molecular de los oligómeros de ácido hialurónico de fórmula $(C_{14}H_{21}N_{11})_n$, en la que n es un número entero inferior a 25 según la presente invención, varía así entre 2 kDa inclusive y 10 kDaltons exclusive.

También están disponibles en el comercio unos oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa. A título de ejemplo, se pueden mencionar en particular los productos vendidos bajo las denominaciones comerciales Signal-10® (CAS Number 90004-61-9) por la compañía Principium S.A. (Viganello, CH), o PrimaHyal 10® por la compañía Soliance (Pomacle, FR).

Las composiciones según la presente invención comprenden, en asociación, al menos un oligómero de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa y las células vegetales elicidadas y desdiferenciadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán, en combinación, llegado el caso, con los soportes y excipientes habituales en las composiciones cosméticas y dermatológicas, cosmética y dermatológicamente aceptables.

En el sentido de la presente invención, se entiende por “soporte cosmética y dermatológicamente aceptable”, los medios que comprenden agua, una mezcla de agua y uno o varios disolventes orgánicos, o un disolvente o una mezcla de disolventes orgánicos cosmética o dermatológicamente aceptables.

Según una forma ventajosa de realización, las composiciones cosméticas conformes a la presente invención pueden contener, además de las células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y los oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa, uno o varios activos suplementarios que refuerzan o complementan ventajosamente su actividad, y compatibles, es decir no susceptibles de reaccionar los unos con los otros u ocultar o limitar sus efectos. Tales ingredientes activos se pueden seleccionar entre cualquier tipo de compuestos habitualmente utilizados en las composiciones cosméticas. A título de ejemplo, se pueden citar los extractos de plancton, los extractos de origen vegetal tales como un extracto de maca (que tiene un efecto sobre la prevención de desajustes relacionados con una deficiencia de la microcirculación cutánea y con el estrés oxidativo que puede resultar de ella), un extracto de pétalos de amapola que actúa sobre la nutrición celular, una combinación de extractos de anchusa, de amapola y de pasiflora que, en combinación, tienen un efecto en la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo, un extracto de semilla de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbatimao, un extracto de kigelia africana o un extracto de cebada.

Las composiciones cosméticas conformes a la presente pueden presentarse en formas galénicas clásicamente utilizadas para una aplicación por vía tópica, es decir, en forma de gel, de emulsión (en particular crema o leche), de emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, de aceite corporal, de mascarilla, de pomada, de ungüento, de loción, de solución concentrada, conteniendo dichas formas galénicas además unos excipientes y soportes habituales y aceptables en el plano cosmetológico. Se utilizan preferentemente en forma de cremas, de suero, de loción o de gel.

Estas formas de administración por vía tópica se preparan mediante las técnicas habituales y, por ejemplo, en el caso de una crema, por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa para obtener una emulsión aceite en agua, o a la inversa para preparar una emulsión agua en aceite en el caso de las cremas, se pueden utilizar unas emulsiones de estructura laminar obtenidas con lecitinas hidrogenadas o unos sucro-ésteres, que contienen poco producto etoxilado o que no lo contienen en absoluto.

La composición tópica según la invención puede comprender unos excipientes apropiados para una aplicación tópica externa, en particular unos excipientes aceptables en el plano cosmetológico. Estos excipientes apropiados para la formulación son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden, en particular, unos agentes de penetración tales como el fitantriol, el octildodecanol y la escina; los espesantes tales como las gomas naturales y los polímeros de síntesis; los tensioactivos; los emolientes tales como el octanoato de cetearilo, el miristato de

isopropilo, el isononanoato de cetearilo, la dimeticona, la ciclometicona, el 3-diisoestearato de poliglicerilo, el poliisobuteno hidrogenado, el alcohol cetílico, el palmitato cetílico, el fosfato cetílico; los emulsionantes tales como unos derivados de poliglicerol; los conservantes tales como el fenoxietanol y el ácido deshidroacético; los colorantes; los perfumes.

Como otros ingredientes utilizables en las composiciones de la invención, se pueden citar los agentes hidratantes tales como la glicerina, el butilenglicol, la sal de sodio del ácido pirrolidona carboxílico (sodium PCA), así como asociaciones de derivados glucósicos con efecto hidratante y reestructurante como el producto Aquaxyl® (xilitil-glucósido y anhidroxilitol y xilitol), y también las vitaminas antioxidantes.

Se puede también añadir a la composición unos glucósidos seleccionados principalmente entre la glucosa, el glicógeno y la trealosa, o también un palmitoil pentapéptido-3 tal como el Matrixyl® o unos derivados tales como el palmitoil GHK (que posee la cadena glicil-histidil-lisina) y el palmitoil GQPR (glicil-glutamil-propil-arginina) o el palmitoil VGVAPG (valil-glicil-valil-alanil-prolil-glicina) asociado a una ceramida-2, así como de manera general cualquier asociación con una ceramida.

Se puede también añadir a la composición unos agentes de protección contra los rayos ultravioletas, y por ejemplo unos filtros solares UV-A y UV-B hidrófilos o lipófilos, o unos pigmentos que forman pantalla anti-ultravioleta.

Los filtros solares se pueden seleccionar, por ejemplo, entre la benzofenona o un derivado de benzofenona tal como la 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (Eusolex® 4360) o un éster de ácido cinámico y más particularmente el metoxicinamato de octilo (Eusolex® 2292), el metoxicinamato de etil-2-hexilo (Parsol MCX®), o también un ciano-β,β-difenilacrilato tal como el octocrileno (Eusolex® OCR), el 4-metilbencilideno alcanfor (Eusolex 6300®), y unos derivados del dibenzoilmetano tales como el 4-isopropildibenzoilmetano (Eusolex 8020), el t-butil-metoxi dibenzoilmetano (Parsol 1789®), y el 4-metoxi-dibenzoilmetano.

Los pigmentos se pueden seleccionar por ejemplo entre el dióxido de titanio, el óxido de zinc y el óxido de circonio.

La asociación, según la presente invención, de células desdiferenciadas y elicadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y de oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa ha hecho aparecer una excelente actividad sobre la síntesis del colágeno I. Así, a las concentraciones ensayadas, se ha podido constatar un aumento altamente significativo (+106%) de la abundancia del colágeno I. Estos resultados confirman que la asociación según la invención favorece la regeneración de la dermis y permite mejorar la firmeza de la piel y reducir la aparición de arrugas.

La utilización no terapéutica de la composición cosmética conforme a la invención comprende todos los cuidados del cuerpo y de la piel incluyendo los productos solares, protectores y bronceadores, los productos anti-edad, anti-seborreicos, tónicos, los productos que aseguran la mejora del aspecto de la piel incluyendo el tratamiento acneico y los enrojecimientos cutáneos.

Los resultados se explican en los ejemplos siguientes y demuestran la sinergia de los efectos de cada uno de los componentes, ya que, a dosis equivalentes, los resultados proporcionados por la asociación son superiores a la suma de los efectos que producen individualmente.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención son limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán

1. Extracción y cultivo de las células desdiferenciadas de buganvilla

Se han extraído unos trozos de hojas de aproximadamente de 5 a 10 cm sobre unas hojas frescas de buganvilla (*Bougainvillea glabra*).

Los trozos de hojas se esterilizan después, a continuación se cultivan en cajas estériles a temperatura ambiente sobre un medio nutritivo sintético (medio de Murashige y Skoog gelosado), hasta la formación, a nivel de los explantes, de cúmulos celulares desdiferenciados, denominados callos o células madres.

Las células madres se extrajeron al final de 30 días, y después se trasplantaron sobre un medio nutritivo nuevo en las mismas condiciones de cultivo que anteriormente, hasta la obtención de callos friables.

Se ha obtenido así una colección de cepas desdiferenciadas estables que presentan unas características de crecimiento y de producción de metabolitos.

2. Elicitación de las células obtenidas antes en la etapa anterior

La elicitación de las células se ha realizado por irradiación por luz UV a 180 nm durante 2 horas, con la ayuda de una luz Wilbert-Lourmat T-30C (600 $\mu\text{W}/\text{m}^2$), posicionada a una distancia de 1 m en iluminación directa encima de las células.

3. Preparación de la suspensión celular

Después de la elicitación, se ha extraído un trozo de callo y después se ha suspendido en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa).

Al final del cultivo (15 días), las células se han filtrado para eliminar el medio de cultivo y después se ha aclarado con agua fría (4°C). Se ha obtenido así una biomasa fresca de aproximadamente 250 g de células por litro de cultivo.

4. Obtención del extracto de azafrán

El extracto de azafrán se ha obtenido a partir de flores de azafrán, después de la retirada de los estigmas y de los pistilos. Las flores sin estigmas y los pistilos se han secado, reducido en polvo y después extraído con agua por maceración.

5. Encapsulación del extracto de azafrán en las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla

Unas células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla tales como se han preparado anteriormente se pusieron en suspensión en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa) que contiene un 1% en masa de extracto de azafrán. La incubación de las células de buganvilla se ha realizado durante 48 horas, a una temperatura de 25°C a fin de encapsular el extracto de azafrán en la fase acuosa de las células.

Al final del periodo de incubación, las células de buganvilla se recuperaron por filtración y después se suspendieron en glicerina a razón del 20% en masa para un 80% en masa de glicerina.

Se ha obtenido así una suspensión que comprende un 80% en masa de glicerina y un 20% en masa de células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán.

Ejemplo 2: puesta en evidencia de la ausencia de citotoxicidad de la asociación de las células vegetales de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y de oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa

En este ejemplo, se ha ensayado la citotoxicidad eventual de las células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán tales como las obtenidas en el ejemplo1, de oligómeros de ácido hialurónico de fórmula $(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11})_n$, en la que n es un número entero inferior a 25 vendido bajo la denominación comercial Signal-10 por la compañía Principium S.A., así como de su asociación.

El estudio se ha realizado sobre fibroblastos de dermis humana NHDF (Normal human Dermal Fibroblatos; origen: prepucio) a aproximadamente el 40% de su potencial proliferativo y cultivado en monocapas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contiene suero FBS (Fetal Bovine Serum) y antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Los diferentes tratamientos con los activos y su asociación se han realizado en un medio de cultivo que no contiene suero.

Las células se han mantenido en una atmósfera húmeda a 37°C que contiene un 5% de CO_2 .

Las células se sembraron en placa de 24 pocillos, 24 horas antes del tratamiento con, respectivamente, el 0,3% de oligómeros de ácido hialurónico de fórmula $(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11})_n$, en la que n es un número entero inferior al 25,3% de células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán, y la asociación de estos dos activos a estas dos concentraciones.

El tratamiento de los fibroblastos NHDF por los dos activos y su asociación, aplicados a estas concentraciones y por triplicado de cultivo (n=3), se ha realizado en el medio de cultivo DMEM que contiene unos antibióticos y en ausencia de suero.

Después, se ha analizado la viabilidad de las células mediante la utilización del ensayo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-3)3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) después de 48 horas de tratamiento.

La densidad celular y la cinética experimental corresponden a las condiciones que se han utilizado a continuación para el análisis del efecto de los activos sobre la abundancia del colágeno I.

Una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio al 0,08% en masa (SDS) se ha utilizado como control positivo, a fin de validar el experimento de citotoxicidad.

5 El límite de citotoxicidad se ha fijado arbitrariamente al 80% de viabilidad con respecto al control no tratado y el SDS se ha utilizado como control positivo de citotoxicidad a fin de validar el experimento.

10 No existe diferencia significativa en cuanto al porcentaje de viabilidad de los fibroblastos NHDF después de 48 horas de tratamiento entre las células tratadas por los dos activos o su asociación y las células control que no han recibido ningún tratamiento (resultados no representados).

Estos resultados son significativos de una ausencia de citotoxicidad.

15 Ejemplo 3: evaluación del efecto de la asociación de las células desdiferenciadas y elicítadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y de oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa sobre la regeneración de la dermis

20 El ensayo se basa en la evaluación por inmunomarcado en fluorescencia del colágeno I a fin de estimar el efecto de las células desdiferenciadas y elicítadas que encapsulan un extracto de azafrán, de un oligómero de peso molecular inferior a 10 kDa, así como de su asociación sobre la síntesis de colágeno I.

25 A fin de evaluar los efectos sobre la síntesis del colágeno I, los fibroblastos NHDF se han inoculado sobre láminas de vidrio (compartimiento de 0,7 cm²), 24h antes del principio de los tratamientos por los activos y su asociación. Se han constituido cinco lotes:

Lote 1: control que no recibe ningún producto.

30 Lote 2: control positivo. Se ha utilizado una solución de TGF-β1 a 20 ng/ml como molécula de referencia que permite aumentar la síntesis de colágeno I dentro de los fibroblastos NHDF.

Lote 3: Los fibroblastos se han tratado con un 0,3% de oligómeros de ácido hialurónico de fórmula (C₁₄H₂₁NO₁₁)_n, en la que n es un número entero inferior a 25, vendido bajo la denominación comercial de Signal-10 por la compañía Principium S.A.

35 Lote 4: los fibroblastos se han tratado con un 3% de células vegetales desdiferenciadas y elicítadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán.

40 Lote 5: los fibroblastos se han tratado mediante la asociación del 3% de células vegetales desdiferenciadas y elicítadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y el 0,3% de oligómeros de ácido hialurónico de fórmula (C₁₄H₂₁NO₁₁)_n, en la que n es un número entero inferior a 25, vendido bajo la denominación comercial de Signal-10 por la compañía Principium S.A.

45 Los activos se han solubilizado en el medio de cultivo que no contenía suero y se han puesto en contacto con unos fibroblastos durante 48 horas. Cada condición se ha realizado en triplicado (n=3).

Al final de los tratamientos, los fibroblastos se han fijado con formol y después aclarado con PBS. Las láminas se han conservado después a 4°C hasta el día del marcado.

50 El inmunomarcado en fluorescencia del colágeno I se ha realizado incubando las láminas con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario conjugado con la fluoresceína. El DAPI (4',6'-diaminido-2-fenilindol), una molécula fluorescente capaz de unir el ADN, se ha utilizado para marcar los núcleos. Las láminas se montaron finalmente con alcohol polivinílico producto vendido bajo la denominación comercial de Mowiol[®] por la compañía Aldrich) y almacenadas a 4°C.

55 La cuantificación se ha realizado en base a 3 fotografías por réplica tomadas con la ayuda de un microscopio Leica[®] (DM 2000, objetivo 40x), y de una cámara Leica[®] (DFC420C).

60 El marcado en inmunofluorescencia del colágeno I se ha cuantificado con la ayuda del programa QWin 3[®] (Leica) utilizando el pixel como unidad de superficie (1 pixel = 1 μm²). Cada fotografía está constituida de 4751460 pixeles. La intensidad media del marcado se ha determinado para cada fotografía. Los núcleos se contabilizan gracias al programa *ImageJ* a fin de relacionar la superficie marcada y la intensidad media del marcado con el número de núcleo sobre cada fotografía. Esta relación, que permite determinar la intensidad del marcado, se compara con el valor que corresponde a la condición de control no tratado. Se ha realizado un ensayo estadístico *t-student* a fin de comparar el efecto de cada activo de la asociación.

Los resultados se presentan en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

5

Condición	Marcado en inmunofluorescencia del colágeno I	Diferencia con respecto al control (%)
Lote 1	386497 ± 5	-
Lote 2	1 833 434 ± 92	+374**
Lote 3	345 167 ± 14	-11
Lote 4	677 881 ± 9	+75
Lote 5	797 444 ± 33	+106*

Los valores de $0,001 < p < 0,01$ se consideran como altamente significativos (*) y $p < 0,001$ como muy altamente significativos (**) (ensayo t-student con respecto a la condición CTL no tratado)

10 Estos resultados muestran que el tratamiento de los fibroblastos NHDF por la asociación de las células vegetales
 15 desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán y unos oligómeros de ácido
 hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa induce a un aumento altamente significativo de la síntesis del
 colágeno I (+106% de marcado en inmunofluorescencia del colágeno I con respecto al control). Estos resultados son
 sorprendentes en la medida en la que los oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa no
 20 tiene influencia sobre la síntesis de colágeno I (marcado en inmunofluorescencia del colágeno I disminuido en un
 11% con respecto al control). Así, estos resultados demuestran que los oligómeros de ácido hialurónico de peso
 molecular inferior a 10 kDa potencializan los efectos de las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de
 buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán (aumento del 106% del marcado en inmunofluorescencia después
 del tratamiento por la asociación con respecto al control frente a un aumento de un 75% con respecto al control,
 después del tratamiento por las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que encapsulan un
 extracto de azafrán).

25 Así, la asociación de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que encapsulan un extracto de
 azafrán y de oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa tiene un efecto superior sobre la
 síntesis de colágeno I.

Ejemplo 4: crema para el cuidado de la piel

30 Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una crema para el cuidado de la piel que tiene la composición
 másica indicada a continuación:

- Gluconato de sodio	0,2 g
- Copolímero hidroxietil acrilato / acriloldimetil taurato de sodio vendido bajo la denominación de Sepinov [®] EMT10 por Seppic	1,65 g
- Glicerina pura al 99,8%	2,0 g
- Hidróxido de sodio	0,25 g
- Ácido cítrico, monohidratado	0,3 g
- Filtros solares	15,5 g
- Benzoato de alquilo de C ₁₂ -C ₁₅ vendido bajo la denominación de Cetiol [®] AB par BASF	11,0 g
- Mezcla de alcohol araquidílico, de alcohol behenílico y de glucósido araquidílico vendido bajo la denominación de Montanov [®] 202 par Seppic	3,0 g
- Dimeticona vendida bajo la denominación de Abil [®] 350 por Evonik Industries	2,0 g
- Aceite virgen de almendra dulce	3,0 g
- DL α-tocoferol	0,5 g
- Hidroxietilurea vendida bajo la denominación de Hydrovance [®] por AkzoNobel	3,0 g
- Células de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán tales como se preparan en el ejemplo 1	1,0 g
- Agente tensor	1,0 g
- Extracto hidroglicólico de <i>Crocus</i> decolorado vendido por GREENTECH	0,3 g
- Células de cacao trituradas vendidas bajo la denominación de Ground Cacao cells por DIANA PLANT	0,01 g
- Oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa vendidos bajo la denominación de Signal-10 [®] por Principium B.S.I.	0,1 g
- Conservantes	cs
- Perfumes	cs
- Agua desmineralizada 1	csp 100,0 g

Esta crema antiedad puede utilizarse una a dos veces al día por aplicación sobre las zonas de la piel a tratar.

35 Ejemplo 5: suero para el cuidado de la piel

Mediante las técnicas habituales, se ha preparado un suero para el cuidado de la piel que tiene la composición másica indicada a continuación.

- Gluconato de sodio	0,2 g
- Goma xantana vendida bajo la denominación	
- Glicerina pura al 99,8 %	1,0 g
- Acrilatos/Polímero reticulado de acrilato de C ₁₀₋₃₀ alquilo vendido bajo la denominación Pemulen [®] TR-1 por Lubrizol	0,3 g
- Mezcla de alcoholes de C _{14-C20} y de alquilglucósidos de C _{14-C20} vendida bajo la denominación Montanov [®] L por Seppic	1,5 g
- Estearoilglutamato de sodio vendido bajo la denominación Eumulgin [®] SG por BASF	0,2 g
- Triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico vendidos bajo la denominación Myritol [®] 318 por BASF	4,0 g
- aceite virgen de almendra dulce	3,0 g
- DL α-tocoferol	0,5 g
- Oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa vendidos bajo la denominación Signal-10 [®] por Principium B.S.I.	0,1 g
- Células de cacao trituradas vendidas bajo la denominación Ground cells Cacao por DIANA PLANT	0,01 g
- Hidroxietilurea vendida bajo la denominación Hydrovance [®] por AkzoNobel	3,0 g
- Extracto hidroglicólico de <i>Crocus</i> decolorado por la compañía GREENTECH	0,3 g
- Células de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán tales como se han preparado en el ejemplo 1	1,0 g
- Hidróxido de sodio	0,07 g
- conservantes	cs
- Perfumes	cs
- Agua desmineralizada	csp 100,0 g

5

Este suero se destina a fortalecer la piel y se puede utilizar una a dos veces al día.

Ejemplo 6: emulsión para el cuidado de la piel

10 Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una emulsión para el cuidado de las pieles normales a mixtas que tiene la composición másica indicada a continuación.

- Gluconato de sodio	0,2 g
- Copolímero hidroxietil acrilato / acriloldimetil taurato de sodio vendido bajo la denominación Sepinov [®] EMT10 por Seppic	1,2 g
- Glicerina pura al 99,8%	1,0 g
- Hidróxido de sodio	0,3 g
- Mezcla de alcohol araquidílico, de alcohol behenílico y de glucósido araquidílico vendido bajo la denominación Montanov [®] 202 por Seppic	1,5 g
- Estearoilglutamato de sodio vendido bajo la denominación Eumulgin [®] SG por BASF	0,25 g
- Palmitato de glicol vendido bajo la denominación Lanol [®] P por Seppic	1,0 g
- Triglicéridos cáprico y caprílico vendidos bajo la denominación Myritol [®] 318 por BASF	3,0 g
- Polifenilmetilsiloxano vendido bajo la denominación Dow Corning [®] 556 por Dow Corning	1,0 g
- aceite virgen de almendra dulce	2,0 g
- aceite de Limnanthes	2,0 g
- DL α-tocoferol	0,7 g
- Hidroxietilurea vendida bajo la denominación Hydrovance [®] por AkzoNobel	3,0 g
- Extracto acuoso de pétalos de amapola	0,5 g
- Mezcla de butilenglicol, de extracto de corteza de <i>Enantia Chlorantha</i> y de ácido oleanólico vendido bajo la denominación comercial de Evermat [®] por Sederma	1,0 g
- Células de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán tales como se preparan en el ejemplo 1	1,0 g
- Células de cacao trituradas vendidas bajo la denominación Ground Cacao Cells por DIANA PLANT	0,01 g
- Oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa vendidos bajo la denominación Signal-10 [®] por Principium B.S.I.	0,1 g
- Conservantes	cs
- Perfumes	cs
- Agua desmineralizada	csp 100,0 g

Esta emulsión se puede utilizar una a dos veces por día por aplicación sobre las zonas de la piel a tratar.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición cosmética que comprende unas células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que se presenta en forma de vesículas, comprendiendo dichas vesículas una membrana vegetal formada de una bicapa lipídica que delimita un volumen interno que contiene una fase encapsulada, caracterizándose dicha composición por que comprende además al menos un oligómero de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa y por que un extracto de azafrán está presente en la fase encapsulada de las vesículas.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que es una composición cosmética para aplicación tópica.
- 15 3. Composición cosmética según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la cantidad de extracto de azafrán presente en la fase encapsulada varía del 0,01 al 5% en masa con respecto a la masa total de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla.
- 20 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende del 0,01% al 10% en masa de una suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilla que encapsulan un extracto de azafrán en la glicerina, con respecto a la masa total de dicha composición.
- 25 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el o los oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa responden a la fórmula $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$, en la que n es un número entero inferior a 25 que designa el grado de polimerización.
- 30 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la concentración en oligómeros de ácido hialurónico de peso molecular inferior a 10 kDa varía del 0,01% al 1% en masa con respecto a la masa total de dicha composición.
- 35 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende además uno o varios ingredientes activos seleccionados entre los extractos de plancton, un extracto de maca, un extracto de pétalos de amapola, una combinación de extractos de anchusa, de amapola y de pasiflora, un extracto de semillas de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbatimao, un extracto de kigelia africana, y un extracto de cebada.
- 40 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se presenta en forma de gel, de emulsión, de emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, de aceite corporal, de mascarilla, de pomada, de ungüento o de solución concentrada.
- 45 9. Procedimiento cosmético no terapéutico para los cuidados de la piel, caracterizado por que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Utilización no terapéutica de una composición cosmética tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para los cuidados de la piel.
11. Utilización no terapéutica de una composición cosmética tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para mejorar la firmeza de la piel y reducir las arrugas cutáneas.