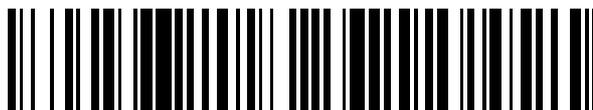


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 306**

51 Int. Cl.:

A61K 8/365 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2012 PCT/EP2012/073860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2012 E 12797837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2785314**

54 Título: **Composición tópica que comprende una asociación de por lo menos un extracto de alga azul con por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales**

30 Prioridad:

28.11.2011 FR 1160853

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

03.05.2018

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**BRUNEL, YVES;
CASTEX-RIZZI, NATHALIE y
DUBOIS, JACQUES**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 666 306 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición tópica que comprende una asociación de por lo menos un extracto de alga azul con por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales.

5 La presente invención se refiere al campo de las algas azules y a su utilización asociada a por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o a una de sus sales en una composición destinada a un uso tópico, de naturaleza farmacéutica o cosmética.

10 Las algas azules (o cianofíceas, o cianobacterias) son unos procariotas fotosintéticos que utilizan la energía luminosa como fuente de energía. Su información genética la lleva una molécula cíclica de ácido desoxirribonucleico y unos plásmidos. La oxidación del agua en oxígeno durante la fotosíntesis es una propiedad que las separa totalmente de los demás procariotas fotosintéticos, las bacterias púrpuras y verdes.

15 El nombre de algas azules se debe a la presencia de ficocianinas. Si se extraen los pigmentos solubles en la acetona (clorofilas y carotenoides) de un cultivo de algas azules, el color azul se vuelve entonces perfectamente visible.

20 Su color resulta de la presencia de estos pigmentos (clorofilas verdes, carotenos rojos y naranjas, xantofilas amarillas, ficocianinas azules y ficoeritrinas rojas) y de mucilago.

25 Las algas azules absorben sobre todo en el azul y en el verde. Estas longitudes de onda son activas para la fotosíntesis. La absorción máxima se realiza en el azul (< 500 nm), lo cual permite que las algas azules aprovechen una mayor energía química de la energía luminosa absorbida.

30 Las algas azules constituyen un grupo genético y morfológicamente muy heterogéneo. Presentan una gran diversidad morfológica. Algunas son unicelulares, esféricas o en forma de bastoncillos y se multiplican por divisiones binarias, otras son filamentosas y se propagan por ruptura del filamento vegetativo o por germinación de los acinetos (esporas).

Esta heterogeneidad les ha permitido colonizar la gran mayoría de los ecosistemas terrestres o acuáticos, incluyendo los entornos extremadamente calientes, salados e hipersalados y alcalinos. Existen formas terrestres, acuáticas, libres y simbióticas.

35 A partir de 1962, una publicación (Lefèvre/Laporte: Cyanostimulines et cicatrization) describía los efectos sorprendentes del jugo de alga azul *Phormidium Uncinatum*, procedente de piscinas termales de Bagnères de Bigorre en Francia, sobre la proliferación celular (FR 1 345 584). Los estudios clínicos demostraban la aceleración de la cicatrización de heridas por emplastes de esta alga (FR2674M).

40 Los ácidos alfa-hidroxiados (AAH) son unos ácidos carboxílicos que tienen una función hidroxilo (-OH) sobre el carbono adyacente del grupo carboxílico. Estos ácidos han encontrado una amplia gama de aplicaciones en la industria cosmética, ya que demostraron no tener peligro para la piel. Debido a su carácter ácido, se utilizan como agente exfoliante para suavizar la piel. Esta propiedad de los ácidos alfa-hidroxiados se utiliza particularmente en cosmética para retrasar la aparición de las arrugas.

45 Los principales AAH que se utilizan actualmente en la industria cosmética son el ácido láctico, el ácido glicólico, y el ácido cítrico, pero existen otros.

50 Los ácidos alfa-hidroxiados comprenden, sin estar limitado a ellos, los compuestos siguientes: el ácido láctico (50-21-5), el ácido glicólico (79-14-1), el ácido cítrico (77-92-9), el ácido málico (6915-15-7), el ácido alfa-hidroxietanoico, el ácido alfa-hidroxi octanoico, el ácido alfa-hidroxicaprílico, los ácidos mixtos de frutas, los triples ácidos de frutas, los tri-alfa-hidroxiácidos de frutas, los complejos de alfa-hidroxi de extractos de plantas, el L-alfa-hidroxiácido y el glicómero de ácidos grasos reticulados.

55 - Ácido láctico:

60 El ácido láctico se utiliza como agente exfoliante (para las pieles sensibles), puede actuar como un agente antibacteriano, entra en la composición de la película hidro-lipídica cutánea y contribuye así al mantenimiento del pH de la piel, evita así las infecciones bacterianas y participa en la hidratación de la piel. El ácido láctico tiene la propiedad de mejorar la absorción de cosméticos tales como las lociones solares.

- Ácido glicólico:

65 Este ácido tiene el peso molecular más bajo en la categoría de los AAH. Es un sólido cristalino, soluble en agua. Se utiliza también ampliamente en diversos productos de cuidado de la piel. La aplicación más corriente de este ácido se refiere a los "peelings" químicos a una concentración del 20 al 70% cuando son recetados y aplicados

por dermatólogos, o hasta un 10% en los productos destinados a uso de los particulares. El ácido glicólico está indicado en el tratamiento del acné, de las arrugas, de la hiper-pigmentación y de la hiperqueratosis. Cuando se utiliza en la queratosis, su mecanismo de acción consiste en debilitar la unión de lípidos en las células muertas de la piel, en disminuir la cohesión intercelular y, al final, en exfoliar la capa córnea.

5 - Ácido cítrico:

10 El ácido cítrico está presente en las frutas como los limones, las naranjas y los pomelos. El ácido cítrico encuentra aplicaciones en numerosos anti-envejecimientos o cremas anti-arrugas. Es asimismo un buen astringente y ayuda en el tratamiento de las manchas desagradables. Mejora también la eficacia de los principios hidratantes para la piel. El ácido cítrico se utiliza también en los productos capilares.

15 Las composiciones según la invención se extienden también a las que contienen otras sales de ácidos orgánicos y en particular a las sales siguientes:

- el acetato (sal de ácido acético)
- el propionato (sal de ácido propiónico)
- el butirato (sal de ácido butírico)
- 20 - el piruvato (sal de ácido pirúvico)
- el formiato (sal de ácido fórmico)
- el tartrato (sal de ácido tártrico)
- el malato (sal de ácido málico)
- el fumarato (sal de ácido fumárico)
- 25 - el sorbato (sal de ácido sórbico)

Los trabajos base de la invención se refieren muy particularmente a la asociación de alga azul y de sales de ácido láctico, pero las algas azules se pueden asociar a cualquier otro ácido alfa-hidroxilado o una de sus sales.

30 El ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propanoico) es un ácido orgánico que juega un papel en diversos procesos bioquímicos. Es un ácido carboxílico hidroxilado, de fórmula química $C_3H_6O_3$. El ácido láctico está presente en la leche, pero también en el vino, algunas frutas y vegetales, y en los músculos. Un lactato es una sal de este ácido.

35 El ácido láctico se presenta también en forma de sales: sal de sodio, de potasio, de magnesio y de calcio. Sus sales están en forma de polvo y son también solubles en medio acuoso. Actúa como agente bacteriostático, en particular sobre bacterias patógenas como la salmonela (o la listeria), pero es sobre todo por sus propiedades humectantes e hidratantes por lo que se utilizan los lactatos en cosmética desde hace mucho tiempo.

40 Además de sus propiedades hidratantes innegables, los lactatos actúan también como buenos tampones que ayudan a estabilizar el pH y ayudan a mantener la estabilidad microbiana de las formulaciones, debido a estas propiedades bacteriostáticas evocadas anteriormente.

45 La piel está formada por tres capas, la hipodermis, la más profunda, la dermis y la epidermis. Esta última es un epitelio malpighiano queratinizado que protege el cuerpo de las agresiones mecánicas, químicas y biológicas, impide las pérdidas hídricas limitando la evaporación del agua contenida en la piel y participa en la foto-protección adsorbiendo una parte de los rayos ultravioletas. Estas funciones vitales se denominan colectivamente "funciones de barrera epidérmicas".

50 La epidermis está constituida principalmente por queratinocitos. Estos proliferan a nivel de la capa basal y después sufren un programa de diferenciación vectorizado para constituir sucesivamente las capas espinosa y después granulosa. Finalmente, durante este proceso de queratinización, las células degeneran y se transforman en corneocitos. La acumulación de los corneocitos forma la capa celular más externa de la epidermis, denominada capa córnea o *stratum corneum*. El *stratum corneum* es el principal responsable de las funciones de barrera epidérmica, debido a su resistencia mecánica, a su estanqueidad y a su contenido.

55 La dermis es un tejido de tipo conjuntivo que forma la piel con la epidermis y la hipodermis. Su grosor es variable según las regiones corporales.

60 Su carácter conjuntivo viene de su composición:

65 Contiene macromoléculas de tipo proteico, en particular fibras de colágeno, elastina y fibronectina que confiere a la piel flexibilidad, elasticidad y asentamiento. Estas fibras proteicas hacen de ella una verdadera base para la epidermis cuyo envejecimiento es el origen de la aparición de las arrugas y otros signos del envejecimiento cutáneo.

La dermis está también constituida por mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos, proteínas que, como una

esponja, captarán el agua en la dermis y actuarán así como depósito de hidratación.

Finalmente, la dermis contiene diversas células incluyendo los fibroblastos y las células del sistema inmunitario.

- 5 La dermis está irrigada por la sangre a través de un importante sistema vascular. Se encarga de la nutrición de la epidermis por difusión.

Además de su función nutritiva, la dermis también desempeña un papel primordial en la termorregulación y en la cicatrización gracias a numerosos intercambios que existen entre la dermis y la epidermis. Las relaciones entre estos dos constituyentes de nuestra piel se han podido demostrar a través de la presencia de receptores epidérmicos en la dermis, tal como CD44 y los numerosos fenómenos de regulación y de interacción que existen entre estos dos tejidos.

15 La piel es el elemento del cuerpo humano que está más en contacto con el entorno exterior.

A pesar de los trabajos realizados hasta la fecha, el envejecimiento cutáneo aún es poco conocido.

El envejecimiento cutáneo está determinado por unos factores genéticos y medioambientales.

- 20 Se distinguen 2 tipos de envejecimiento:

El envejecimiento intrínseco o cronológico corresponde a los cambios inevitables relacionados con la edad; la menopausia o más precisamente la carencia de estrógenos acelera el envejecimiento cutáneo cronológico. Afecta tanto a la piel como a los otros órganos.

25 Corresponde a las modificaciones observadas en las zonas protegidas del sol en todos los individuos, pero con unas variaciones entre las personas que están determinadas genéticamente.

Este tipo de envejecimiento se caracteriza por:

- 30
- una sequedad de la piel frecuentemente origen de picores
 - una reducción de la elasticidad cutánea
 - una disminución del grosor cutáneo (atrofia de la dermis y de la epidermis)
 - pequeñas arrugas y finas arrugas
- 35
- reducción de la vascularización de la dermis y disminución de la actividad metabólica.

Una fragilidad cutánea y capilar origen de equimosis y heridas al menor traumatismo.

40 Con el envejecimiento, se observa una reducción de la sudoración y de la hidratación cutánea debido a una reducción del número de folículos pilosos y de las glándulas anexas de la piel.

45 El envejecimiento extrínseco está relacionado con los factores ambientales, en particular el sol. El término envejecimiento actínico o heliodermia corresponde a unas modificaciones características de la piel relacionadas con la exposición solar crónica y reside en las zonas foto-expuestas.

En las zonas de la piel expuestas al sol (cara, dorso de las manos, antebrazo), aparecen manchas pigmentadas, arrugas y rojeces.

50 Si los daños se intensifican, se observa un espesamiento de la epidermis y la piel aparece amarillenta, más seca, las arrugas se profundizan; la piel presenta una pigmentación irregular con unas manchas marrones y blancas.

Pueden existir también unas cicatrices blanquecinas en forma de estrella (pseudo-cicatriz estelar) en particular sobre los antebrazos tras traumatismos mínimos.

- 55 Otros factores intervienen: el tabaco, el consumo de alcohol y una mala alimentación.

El envejecimiento cutáneo resulta de fenómenos complejos determinados genéticamente y por factores ambientales que conducen a anomalías del genoma y de la organización celular y tisular.

60 El elemento determinante del envejecimiento cutáneo parece ser la producción de especies reactivas del oxígeno que conduce a un estrés oxidativo.

65 Varios estudios se interesaron por el envejecimiento cutáneo. Durante el envejecimiento cutáneo, se constata una alteración de la dermis y de la epidermis: disminución de la síntesis de colágeno, alteración de las fibras elásticas, disminución del ácido hialurónico y de la vascularización de la dermis.

De manera sorprendente e inesperada, la solicitante ha mostrado que una composición que contiene una asociación de por lo menos un extracto de alga azul y de por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales permitía la prevención de los signos de envejecimiento y más particularmente el envejecimiento cutáneo.

5 Por envejecimiento cutáneo, se entiende en particular una pérdida de elasticidad de los tejidos (pérdida de la propiedad para recuperar su estado inicial después del estiramiento), un cambio de textura de la piel (engrosamiento o adelgazamiento), la disminución de la síntesis del colágeno, la producción de especies reactivas del oxígeno que conduce a un estrés oxidativo y, en la superficie, sequedad de la piel, aparición de anomalías superficiales (arrugas, manchas marrones, pequeños vasos, reducción de la vascularización y de la circulación de la dermis, etc.).

10 Esta prevención se ha podido demostrar a través de la estimulación de la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (también denominado VEGF) que favorece así la revascularización de la dermis y por lo tanto la estimulación de la producción natural de fibras de colágeno y de ácido hialurónico, degradando la inhibición de enzimas la matriz extracelular (MMPs), y una actividad antioxidante sobre los fibroblastos.

15 La solicitante ha demostrado también que una composición que contiene una asociación de por lo menos un extracto de alga azul y de por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales permitía la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo a través de la hidratación de la epidermis, para la mejora de cualquier forma de sequedad cutánea; para el refuerzo de las funciones de barrera de la epidermis favoreciendo la cicatrización y la regeneración de la epidermis.

20 Este efecto ha podido ser demostrado a través de la estimulación de la migración y de la proliferación de los queratinocitos, de la vascularización por la producción de VEGF y de la síntesis de ácido hialurónico.

25 Por hidratación de la epidermis, se entiende la mejora o el mantenimiento del equilibrio en agua de la epidermis.

30 Por mejora de cualquier forma de sequedad cutánea, se entiende cualquier mejora de la hidratación de la epidermis, caracterizada en particular por una falta de agua en la capa córnea, una película hidrolipídica situada en la superficie demasiado fina y que ya no protege la piel, la falta de sebo.

Este efecto se ha podido demostrar a través de la estimulación de la producción de ácido hialurónico y de su receptor, el CD44.

35 El objeto de la presente invención se refiere por lo tanto a una composición tópica, farmacéutica o cosmética, que contiene por lo menos un extracto de alga azul y por lo menos un ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales en asociación con por lo menos un excipiente aceptable para la aplicación tópica sobre piel, los faneros y las mucosas.

40 Preferentemente, la presente invención se referirá a una composición tópica que contiene por lo menos un extracto de alga azul y por lo menos una sal de lactato en asociación con por lo menos un excipiente que permite su aplicación tópica, en particular un excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable.

45 En un modo particular de la invención, el alga azul utilizada será de tipo *Phormidium sp.*

Preferentemente, la sal de ácido orgánico biológico soluble en medio acuoso se podrá seleccionar de entre: una sal de magnesio y/o una sal de calcio y/o una sal de sodio.

50 Preferentemente, la sal de ácido orgánico biológico soluble en medio acuoso utilizada contendrá por lo menos una sal que sea una sal de magnesio.

Preferentemente, la sal de ácido orgánico biológico soluble en medio acuoso utilizada contendrá por lo menos una sal que sea una sal de calcio.

55 En un modo particular de la invención la composición según la invención comprenderá una asociación de sal de magnesio y de sal de calcio.

60 Preferentemente, la composición según la invención comprenderá una asociación que va de 1/2 de lactato de magnesio y 1/2 de lactato de calcio a una asociación de 1/4 de lactato de magnesio y de 3/4 de lactato de calcio, es decir una relación de 1 por 1 a 1 por 3 en peso.

Más preferentemente la composición según la invención comprenderá una asociación de 2/3 de lactato de magnesio y de 1/3 de lactato de calcio, es decir una relación de 2 por 1 en peso.

65 Preferentemente, el extracto de alga azul presente en la composición representará entre el 0,001% y el 0,1% en peso del peso total de la composición.

- Según un modo de realización ventajoso de la invención, la o las sales de ácido alfa-hidroxiado presentes en la composición representan, juntas o cada una considerada por separado, entre el 0,001% y el 0,01% en peso del peso total de la composición.
- 5 Según un modo de realización ventajoso de la invención, la composición comprende del 0,001 al 0,01% de una sal de magnesio de ácido alfa-hidroxiado, (preferentemente el lactato de magnesio) y del 0,001 al 0,01% de una sal de calcio de ácido alfa-hidroxiado, (preferentemente el lactato de calcio).
- 10 En un modo de realización preferida la composición según la invención se presentará preferentemente en forma de un producto de cuidado y/o de maquillaje de la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las pestañas, de las cejas, del cabello, del cuero cabelludo, de las uñas o de las mucosas; de un producto solar o autobronceador; de un producto capilar, en particular de coloración, de acondicionamiento y/o de cuidado del cabello.
- 15 Preferentemente, la composición según la invención comprenderá por lo menos una fase líquida, que puede comprender por lo menos un compuesto seleccionado de entre los aceites y/o los disolventes de origen mineral, animal, vegetal o sintético, carbonados, hidrocarbonados, fluorados y/o siliconados, suero, volátiles o no volátiles, solos o en mezcla.
- 20 En un modo de realización preferido la composición según la invención se utilizará en la prevención de todos los signos relacionados con el envejecimiento del organismo, en particular los que afectan la piel y/o los anexos cutáneos y/o las mucosas.
- 25 Preferentemente la composición según la invención se utilizará en la prevención de los signos de envejecimiento cutáneo.
- Preferentemente, la composición según la invención se utiliza para favorecer la producción de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) para su utilización para la revascularización de la dermis y la mejora del flujo sanguíneo en los vasos.
- 30 Preferentemente la composición según la invención se utiliza para favorecer la producción natural de fibras de elastina.
- 35 Preferentemente, la composición según la invención se utiliza para favorecer la producción natural de colágeno.
- Preferentemente, la composición según la invención se utiliza para favorecer la producción natural de ácido hialurónico.
- 40 Preferentemente, la composición según la invención se utiliza por sus propiedades antioxidantes.
- Preferentemente la composición según la invención se utilizará en la prevención y la reparación de las afecciones de la mucosa bucal.
- 45 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación según la invención, que comprende las etapas siguientes:
- 1- Obtención de la biomasa de alga azul:
 - 50 - La biomasa se recolecta después de una duración de cultivo de 10 a 20 días en condiciones de temperatura y de luminosidad adecuadas,
 - 2- Obtención del extracto de alga azul:
 - 55 - La biomasa se lava y después se tritura finamente. La fracción acuosa se separa de los restos celulares por centrifugación o filtración,
 - 3- La solución así obtenida se adiciona:
 - 60 - con ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales
 - con maltodextrina que sirve de soporte
 - 4- El pH de las muestras se lleva a pH=6,5 utilizando NaOH (0,1 N),
 - 65 5- El producto seco se obtiene por eliminación del agua mediante una técnica apropiada, que podrá ser, por ejemplo: un procedimiento de liofilización, de atomización o de secado bajo estufa ventilada a baja temperatura.

Determinación de la actividad antioxidante y de las concentraciones utilizadas:

5 Con el fin de determinar si el lactato de Mg^{2+} (y/o el lactato de Ca^{2+}) presentaban una actividad específica (y más particularmente una actividad antioxidante, "SOD-likes"), se han realizado varias soluciones de sales de lactato (lactato de Na^+ ; lactato de Ca^{2+} y lactato de Mg^{2+}), a concentraciones diferentes.

Para cada concentración y para cada sal, se han determinado el pH así como la actividad "SOD-like".

10 Se han realizado unas soluciones madre (4,0 mg/ml) de sales de lactato a partir de los productos siguientes:

- lactato de Magnesio - L (FLUKA, p. m.=202,45 g/mol)
- lactato de Calcio - L (SIGMA, p. m.=109,1 g/mol)
- lactato de Sodio - D/L (SIGMA, p. m.=101,2 g/mol)

15 Cada concentración se ha realizado por diluciones sucesivas con agua destilada de pH=6,2.

Las mediciones de actividad "SOD-like" se efectúan con la ayuda de un kit de medición "kit SOD525" comercializado por la compañía OXIS INTERNATIONAL - BIOXYTECH.

20 La solicitante ha realizado cada medición de la actividad antioxidante por triplicado.

Tabla 1

Soluciones en bruto	Lactato de Mg^{2+} USOD/ml	Lactato de Ca^{2+} USOD/ml	Lactato de Na^+ USOD/ml
0,167 mg/ml	0,14	0	0
0,333 mg/ml	0,09	0	0
0,667 mg/ml	0,09	0	0
1,333 mg/ml	0,69	0,21	0
2,0 mg/ml	1,27	0,38	0,18
2,66 mg/ml	1,74	0,61	0,23
4,0 mg/ml	2,52	1,11	0,32

25 Los resultados obtenidos muestran que el lactato de Mg^{2+} presenta una actividad "SOD-like" significativa a partir de una concentración de 3 mg/1,5 ml (es decir 2 mg/ml). Con esta concentración, se mide una actividad de 1,27 USOD/ml.

30 Para unas concentraciones superiores a 2 mg/ml, la actividad "SOD-like" medida aumenta a 1,74 USOD/ml y 2,52 USOD/ml para unas concentraciones respectivas de 2,66 mg/ml y 4 mg/ml.

35 Por debajo de esta concentración (0,167 mg/ml; 0,333 mg/ml; 0,667 mg/ml; 1,333 mg/ml), la actividad "SOD-like" medida no es significativa (respectivamente 0,14 USOD/ml; 0,09 USOD/ml; 0,09 USOD/ml y 0,69 USOD/ml) teniendo en cuenta el umbral de detección del método utilizado.

En lo que se refiere al lactato de Ca^{2+} , los resultados obtenidos muestran que esta sal presenta una actividad "SOD-like" significativa (1,11 USOD/ml) para una concentración de 4,0 mg/ml.

40 Por debajo de esta concentración (0,167 mg/ml; 0,333 mg/ml; 0,667 mg/ml; 1,333 mg/ml; 2,0 mg/ml y 2,66 mg/ml), la actividad "SOD-like" medida no es significativa (respectivamente 0 USOD/ml; 0 USOD/ml y 0 USOD/ml; 0,21 USOD/ml; 0,38 USOD/ml y 0,61 USOD/ml).

45 Finalmente, en lo que se refiere al lactato de Na^+ , los resultados obtenidos muestran que esta sal no presenta actividad "SOD-like" significativa, sea cual sea la concentración (0 USOD/ml; 0 USOD/ml; 0 USOD/ml; 0,21 USOD/ml; 0,38 USOD/ml y 0,61 USOD/ml para unas concentraciones respectivas de 0,167 mg/ml; 0,333 mg/ml; 0,667 mg/ml; 1,333 mg/ml y 2,0 mg/ml).

50 En lo que se refiere al lactato de Mg^{2+} , los resultados muestran que la dilución con agua destilada (pH=6,2) provoca una acidificación progresiva de las soluciones (de pH= 8,21 a pH=6,44).

Para el lactato de Ca^{2+} , los resultados obtenidos muestran que la dilución con agua destilada (pH=6,2) provoca también una acidificación progresiva de las soluciones (de pH=6,86 a pH=6,2).

55 Finalmente, los resultados obtenidos con el lactato de Na^+ muestran que la dilución con agua destilada (pH=6,2) provoca una alcalinización progresiva de las soluciones (de pH=5,27 a pH=5,58).

Tabla 2

Soluciones en bruto	Lactato de Mg ²⁺ pH	Lactato de Ca ²⁺ pH	Lactato de Na ⁺ pH
0,167 mg/ml	6,44	6,20	5,58
0,333 mg/ml	6,64	6,33	5,54
0,667 mg/ml	6,88	6,44	5,49
1,333 mg/ml	7,05	6,64	5,47
2,0 mg/ml	7,44	6,68	5,46
2,66 mg/ml	7,53	6,74	5,37
4,0 mg/ml	8,21	6,86	5,27

5 Comparando los resultados obtenidos en la medición de la actividad "SOD-like" y en la medición del pH de las soluciones ensayadas (véase la tabla 1 y la tabla 2), la solicitante ha podido establecer que:

- el lactato de Mg²⁺ parece ser el más activo de las 3 sales ensayadas, ya que presenta una actividad significativa (1,27 USOD/ml) para una concentración de 3 mg/ml, mientras que a esta misma concentración, ninguna de las otras sales (lactato de Ca²⁺ y lactato de Na⁺) presenta una actividad "SOD-like" equivalente (0,38 USOD/ml y 0,18 USOD/ml).
- las actividades "SOD-like" son prácticamente todas significativas (>1) para unos valores de pH próximos y/o superiores a pH=7,0. En efecto, en lo que se refiere al lactato de Mg²⁺, los valores significativos de la actividad, "SOD-like" (1,27 USOD/ml; 1,74 USOD/ml y 2,52 USOD/ml) corresponden a unos valores respectivos de pH de pH=7,44; pH=7,53 y pH=8,21.

En lo que se refiere al lactato de Ca²⁺, un solo valor significativo de la actividad "SOD-like" (1,11 USOD/ml) corresponde a un valor de pH de pH=6,86. Finalmente, en lo que se refiere al lactato de Na⁺, no se observa ningún valor significativo de la actividad "SOD-like" dado el carácter tan ácido de esta sal.

La solicitante ha puesto por lo tanto en evidencia que el lactato de Mg²⁺ presenta la actividad "SOD-like" más fuerte de entre las 3 sales de lactato ensayadas. Sin embargo, teniendo en cuenta el hecho de que parece existir una correlación estrecha entre la actividad "SOD-like" y el pH, se han efectuado unas mediciones complementarias de la actividad "SOD-like" de las tres sales, para unos valores de pH idénticos.

El pH de las muestras se llevó a pH=6,5 utilizando NaOH (0,1N)

Tabla 3

Soluciones en bruto	Lactato de Mg ²⁺ pH=6,0 (USOD/ml)	Lactato de Mg ²⁺ pH=7,0 (USOD/ml)	Lactato de Mg ²⁺ pH=7,4 (USOD/ml)	Lactato de Mg ²⁺ pH=8,0 (USOD/ml)
0,167 mg/ml	0	0	0	0
0,333 mg/ml	0	0	0	0
0,667 mg/ml	0,21	0,32	0,25	0
1,333 mg/ml	0,6	0,61	0,48	0,41
2,0 mg/ml	2,62	2,64	1,7	1,41
2,66 mg/ml	3,95	3,94	3,64	3,63
4,0 mg/ml	7,21	7,32	6,87	6,23

La solicitante ha decidido por lo tanto efectuar unas mediciones de actividades "SOD-like" de estas dos sales, a las mismas concentraciones, y para unos valores de pH idénticos (pH=6,0; pH=7,0; pH=7,4 y pH= 8,0).

35 Las soluciones madre (4,0 mg/ml) de sales de lactato de magnesio y de calcio son las mismas que las descritas anteriormente.

Los resultados obtenidos (tabla 3) parecen demostrar que para una misma concentración en sal de lactato de Mg²⁺, las actividades "SOD-like" medidas varían linealmente en función del pH. Este resultado confirma por lo tanto la influencia del pH sobre la actividad "SOD-like".

Además, los resultados muestran que la sal de lactato de Mg²⁺ (sean cuales sean las concentraciones) presenta una actividad "SOD-like" óptima para un valor de pH=7,0. La actividad "SOD-like" de la sal de lactato de Mg²⁺ que corresponde al pH biológico (pH=7,4) es ligeramente inferior a la actividad "SOD-like" óptima.

Finalmente, los resultados confirman los resultados obtenidos anteriormente en cuanto al umbral de concentración mínimo 2,5 mg/1,5 ml (es decir 1,67 mg/ml) necesario en sal de lactato de Mg²⁺, para obtener una

actividad "SOD-like" significativa.

La solicitante ha decidido efectuar las mismas mediciones a pH=6; pH=7,0 y pH=7,5 para el lactato de Ca²⁺.

5 Tabla 4

Soluciones en bruto	Lactato de Ca ²⁺ pH=6,0 (USOD/ml)	Lactato de Ca ²⁺ pH=7,0 (USOD/ml)	Lactato de Ca ²⁺ pH=7,5 (USOD/ml)
0,167 mg/ml	0	0	0
0,333 mg/ml	0	0	0
0,667 mg/ml	0	0	0
1,333 mg/ml	0,72	0,65	0,57
2,0 mg/ml	0,93	0,93	0,8
2,66 mg/ml	2,69	2,68	2,12
4,0 mg/ml	3,5	2,93	2,57

10 Los resultados obtenidos (tabla 4) demuestran que para una misma concentración en sal de lactato de Ca²⁺, las actividades "SOD-like" medidas varían linealmente en función del pH. Este resultado confirma por lo tanto la influencia del pH sobre la actividad "SOD-like" de la sal de lactato de Ca²⁺, como para la sal de lactato de Mg²⁺.

Además, los resultados muestran que la sal de lactato de Ca²⁺ (sean cuales sean las concentraciones) presenta una actividad "SOD-like" óptima para un valor de pH igual a pH=6,0.

15 Los resultados obtenidos parecen demostrar que el pH desempeña un papel en la actividad "SOD-like" de las sales de lactato de Mg²⁺ y de lactato de Ca²⁺. Para estas dos sales, la actividad "SOD-like" máxima parece estar determinada para un valor de pH comprendido entre pH=6,0 y pH=7,0.

20 La Solicitante ha decidido realizar unas mediciones de actividades "SOD-like" sobre unas mezclas de las dos sales de lactato de Mg²⁺ y lactato de Ca²⁺, con el fin de poner en evidencia una eventual sinergia. Las mediciones se realizaron para un valor de pH=6,5 que corresponde a una actividad "SOD-like" máxima y que constituye el valor utilizado generalmente en las aplicaciones en dermo-cosmética.

25 Las soluciones madre (4,0 mg/ml) de sales de lactato de magnesio y de calcio son las mismas que las descritas anteriormente.

Tabla 5

Soluciones en bruto Lactato de Mg ²⁺ /Ca ²⁺ (proporción 3/1)	Lactato de Mg ²⁺ /Ca ²⁺ pH=6,5 (USOD/ml)	Lactato de Mg ²⁺ +Lactato de Ca ²⁺ pH=6,5 (USOD/ml)
0,25 mg/0,083 mg/ml	0,08	0
0,5 mg/0,167 mg/ml	0,3	0,1
1,0 mg/0,33 mg/ml	1,08	0,4
2,0 mg/0,667 mg/ml	3,53	2,62
4,0 mg/1,33 mg/ml	7,57	7,93

30 Tabla 6

Soluciones en bruto Lactato de Mg ²⁺ /Ca ²⁺ (Proporción 1/1)	Lactato de Mg ²⁺ /Ca ²⁺ pH=6,5 (USOD/ml)	Lactato de Mg ²⁺ +Lactato de Ca ²⁺ pH=6,5 (USOD/ml)
0,167 mg/0,167 mg/ml	0	0
0,33 mg/0,33 mg/ml	0	0
0,667 mg/0,667 mg/ml	0	0
1,0 mg/1,0 mg/ml	1,48	0,7
2,0 mg/2,0 mg/ml	4,68	3,55

35 Los resultados obtenidos en este experimento (tabla 5 y tabla 6) muestran que las actividades "SOD-like" medidas sobre las mezclas de sales de lactato de Mg²⁺/Ca²⁺ (1^{as} columna de las tablas 5 y 6) son globalmente todas superiores a la suma de las actividades de las dos sales consideradas separadamente (2^{as} columna de las tablas 5 y 6).

40 Además, comparando los resultados obtenidos sobre las diferentes mezclas, parece que la proporción de tipo 3/1 (Mg²⁺/Ca²⁺) (tabla 5) es más eficaz que la proporción de tipo 1/1 (Mg²⁺/Ca²⁺) (tabla 6).

En efecto, incluso si existe una sinergia para las proporciones de tipo 1/1, las actividades obtenidas en la proporción 3/1 son superiores a las obtenidas en las proporciones 1/1 para unas concentraciones totales equivalentes (ej.: 0,3 USOD/ml y 1,08 USOD/ml frente a 0 USOD/ml y 0 USOD/ml para unas concentraciones totales respectivas de 0,667 mg/ml y 1,333 mg/ml en sales). Este resultado está en acuerdo con los experimentos anteriores que mostraban que la sal de lactato de Mg^{2+} presentaba una actividad "SOD-like" superior a la de la sal de lactato de Ca^{2+} .

Además, es importante señalar que una actividad de 1,08 USOD/ml se obtiene para la mezcla 1 mg lactato de Mg^{2+} /0,33 mg lactato Ca^{2+} /ml.

Medición de la actividad "SOD-like" de los lactatos asociados a algas azules:

Los lotes n° 007 y PF (1, 2, 3, 4 y 5) son unos lotes preparados según las especificaciones de los laboratorios PIERRE FABRE a partir de lotes de *Phormidium sp.*

Obtención de la biomasa:

La biomasa se recoge después de un tiempo de cultivo de 10 a 20 días en condiciones de temperatura y de luminosidad adecuadas.

Obtención del extracto de algas azules:

Se lava la biomasa y después se tritura finamente. La fracción acuosa se separa de los restos celulares por centrifugación o filtración.

La solución así obtenida se adiciona:

- con ácido alfa-hidroxiado o una de sus sales
- con maltodextrina que sirve de soporte

El pH de las muestras se ha llevado a pH=6,5 utilizando NaOH (0,1N)

El producto seco se obtiene por eliminación del agua mediante una técnica apropiada, que podrá ser, por ejemplo: un procedimiento de liofilización, de atomización o de secado bajo estufa ventilada a baja temperatura.

La adición con sales se ha realizado por adición de las sales de lactato de magnesio y de calcio utilizadas anteriormente.

La actividad "SOD-like" de las muestras se ha determinado con el mismo kit y según el mismo método que anteriormente. Resultado de la actividad "SOD-like" para unas asociaciones que contienen el extracto de *Phormidium* y la mezcla de sales de lactatos.

Tabla 7

Identificación de los lotes	Concentración en mezcla activa 2/3 lactato de Mg^{2+} y 1/3 lactato de Ca^{2+}	Actividad "SOD-like"
PF1	0,45%	4,5 U
PF2	0,30%	4 U
PF3	0,23%	2,1 U
PF4	0,15%	1 U
PF5	0%	0,6 U

Los resultados presentados en la tabla 7 representan las diferentes actividades "SOD-like" medidas para la mezcla de sales de lactato de Mg^{2+}/Ca^{2+} en proporción 2/3 de lactato de Mg^{2+} y 1/3 de lactato de Ca^{2+} .

Se constata que la concentración óptima se obtiene para una concentración de la mezcla activa del 0,30% (lote JCB2).

Además, comparando estos resultados con los obtenidos anteriormente sobre las diferentes mezclas, parece que la proporción de tipo 2/1 (Mg^{2+}/Ca^{2+}) (tabla 7) es más eficaz que las proporciones de tipo 1/1 y 3/1 (Mg^{2+}/Ca^{2+}).

Tabla 8

Muestras	Actividad "SOD-like"
Lote 007 (Ph=6,2: lote inicial)	0,81 U

Muestras	Actividad "SOD-like"
Lote 007 (pH=6,5)	1,07 U
Lote 007 (pH=6,5 + 0,5 mg/ml lactato de Mg ²⁺)	1,21 U
Lote 007 (pH=6,5 + 1,0 mg/ml lactato de Mg ²⁺)	1,93 U
Lote 007 (pH=6,5 + 1,5 mg/ml lactato de Mg ²⁺)	3,57 U
Lote 007 (pH=6,5 + 2,0 mg/ml lactato de Mg ²⁺)	4,29 U
Lote 007 (pH=6,5 + 5,0 mg/ml lactato de Mg ²⁺)	4,4 U

Los resultados obtenidos cuando tiene lugar la sobrecarga del lote 007 con el lactato de Mg²⁺ (Tabla 8) parecen mostrar que cuando el pH del lote 007 (actividad, "SOD-like" inicial: 0,81 USOD525/ml) es llevado a pH=6,5, la actividad aumenta hasta un valor significativo de 1,07 USOD525/ml.

5

Además, los resultados obtenidos parecen demostrar que la adición de lactato de Mg²⁺ en el extracto inicial aumenta significativamente su actividad "SOD-like". En efecto, añadiendo respectivamente 0,5 mg/ml de lactato de Mg²⁺; 1,0 mg/ml de lactato de Mg²⁺; 1,5 mg/ml de lactato de Mg²⁺; 2,0 mg/ml de lactato de Mg²⁺ y 5,0 mg/ml de lactato de Mg²⁺, la actividad "SOD-like" aumenta respectivamente a 1,21 USOD525/ml 1,93 USOD525/ml, 3,57 USOD525/ml, 4,29 USOD525/ml y 4,4 USOD525/ml.

10

Finalmente, es importante señalar que la actividad "SOD-like" del extracto parece alcanzar un máximo (4,29 USOD525/ml) a partir de una concentración de 2,0 mg/ml de lactato de Mg²⁺.

15 Tabla 9

Muestras	Actividad "SOD-like"
Lote 007 (Ph=6,2: lote inicial)	0,81 U
Lote 007 (pH=6,5)	1,07 U
Lote 007 (pH=6,5 + 0,5 mg/ml lactato de Ca ²⁺)	1,11 U
Lote 007 (pH=6,5 + 1,0 mg/ml lactato de Ca ²⁺)	1,52 U
Lote 007 (pH=6,5 + 1,5 mg/ml lactato de Ca ²⁺)	1,77 U
Lote 007 (pH=6,5 + 2,0 mg/ml lactato de Ca ²⁺)	2,14 U
Lote 007 (pH=6,5 + 5,0 mg/ml lactato de Ca ²⁺)	3,83 U

Los resultados obtenidos (tabla 9) muestran que la adición de lactato de Ca²⁺ en el extracto inicial, aumenta significativamente su actividad "SOD-like".

20

En efecto, añadiendo respectivamente 0,5 mg/ml de lactato de Ca²⁺; 1,0 mg/ml de lactato de Ca²⁺; 1,5 mg/ml de lactato de Ca²⁺; 2,0 mg/ml de lactato de Ca²⁺ y 5,0 mg/ml de lactato de Ca²⁺, la actividad "SOD-like" aumenta respectivamente a 1,11 USOD525/ml; 1,52 USOD525/ml, 1,77 USOD525/ml, 2,14 USOD525/ml y 3,83 USOD525/ml.

25

Finalmente, durante el experimento, no parece que la actividad "SOD-like" del extracto haya alcanzado un máximo (3,83 USOD525/ml) ya que aumenta regularmente a medida que se añade lactato de Ca²⁺.

Los resultados obtenidos en el experimento de sobrecarga del lote 007 con el lactato de Mg²⁺ parecen mostrar que es interesante llevar el pH del extracto 007 a pH=6,5 con el fin de aumentar su actividad "SOD-like".

30

Además, la adición de lactato de Mg²⁺ parece aumentar significativamente la actividad "SOD-like" del extracto (hasta 4,29 USOD525/ml para 2 mg/ml). Es importante señalar que en el caso del lactato de Mg²⁺, este aumento de la actividad "SOD-like" parece exponencial y parece alcanzar un nivel máximo de actividad a partir de 2 mg/ml.

35

Finalmente, en comparación con los resultados presentados anteriormente, la adición de lactato de Mg²⁺, a razón de 2 mg/ml, permite un aumento de la actividad del extracto de 3,22 USOD525/ml (teniendo en cuenta que su actividad inicial es 1,07 USOD525/ml), mientras que la actividad obtenida con 2 mg/ml de lactato de Mg²⁺ solo, era aproximadamente de 2,6 USOD525/ml.

40

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación de la migración celular de los queratinocitos (en IF) después de la migración durante 24h de Queratinocitos HaCaT.

45

Figura 2: Representación de la expresión de VEGF segregado por los queratinocitos HaCaT después de la migración durante 24h.

Figura 3: Representación de la expresión del ácido hialurónico segregado por los queratinocitos HaCaT

50

después de la migración durante 24h por determinación colorimétrica.

Figura 4: Revelación con inmunomarcado del efecto de la "asociación" sobre la expresión del receptor CD44 sobre unos queratinocitos HaCaT incubados durante 24h. El CD 44 se visualiza por una fluorescencia verde y el núcleo de las células por una fluorescencia azul (coloración DAPI).

Figura 5: Representación de la actividad anti-radicalaria de diferentes extractos de algas azules incubadas durante 24 horas frente a la lipoperoxidación inducida por un estrés químico de 1 hora sobre fibroblastos L929.

Figura 6: Representación de la expresión de la elastina y del colágeno I (ARNm) sobre fibroblastos hechos senescentes por un estrés oxidativo (H₂O₂) después de 72 horas. La "asociación" se preincuba durante 16 horas.

Figura 7: Representación de la expresión de las metaloproteinasas matriciales (MMP-1, MMP-3 y MMP-12) (ARNm) sobre fibroblastos hechos senescentes por replicación la "asociación" se preincuba durante 72 horas.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Los ensayos se han realizado con una asociación, denominada en lo sucesivo "la asociación", compuesta por un extracto de algas azules de tipo *Phormidium sp.* para 1/3 en peso y de una mezcla de lactato de magnesio y de lactato de calcio (en una relación de 2 por 1) para 2/3 en peso.

Ejemplo 1: Estudio de la inducción de la migración de los queratinocitos

La migración de los queratinocitos, constituyentes principales de la epidermis, desempeña un papel primordial en la reparación tisular y la cicatrización. Con el fin de determinar los efectos de la "asociación" sobre la migración de los queratinocitos, la solicitante ha utilizado como modelo celular unos Queratinocitos HaCaT.

Después de la migración durante 24h de los Queratinocitos con unos Kit Oris Cell Migration Assay (96 pocillos), la solicitante ha efectuado una dosificación midiendo la intensidad de fluorescencia (IF).

La inducción de la migración de los queratinocitos se ha evaluado con un control según:

- sales de Lactatos solas 2000 µg/ml
- extractos de algas azules solos 110 µg/ml
- "la asociación" = 200 µg/ml sales lactatos + 110 µg/ml algas azules

Control positivo:

- TGF1β1 5 ng/ml

Los resultados de la migración se representan en la figura 1.

Figura 1: Representación de la migración celular de los queratinocitos (en IF) después de la migración durante 24h de Queratinocitos HaCaT.

Se distingue muy claramente la inducción de la migración de los queratinocitos en comparación con TGF beta 5 ng/ml. Los extractos de algas azules solos o las sales de lactato solas inducen una migración moderada (respectivamente +33% y +37%) visible en la figura 1.

"La asociación" revela una verdadera sinergia con una inducción de la migración de los queratinocitos a +78%.

Ejemplo 2: Producción de factores segregados por los queratinocitos: VEGF

El VEGF (por Vascular Endothelial Growth Factor o Factor de crecimiento endotelial vascular) desempeña varias funciones biológicas importantes. Par ejemplo, limita la proliferación de las células endoteliales, activa la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y aumenta la permeabilidad vascular. Con ello, el VEGF segregado por los queratinocitos contribuye al mantenimiento de una piel sana mediante aportación de elementos nutritivos a las células y favorece la cicatrización.

La angiogénesis es un mecanismo de neovascularización que empieza a partir de una red capilar preexistente. Es particularmente importante e indispensable durante numerosos procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario, la implantación de la placenta o la reparación tisular.

Con el fin de efectuar la dosificación de la liberación de VEGF por los queratinocitos en cultivo, el solicitante ha determinado, mediante técnica ELISA, la cantidad del Factor de crecimiento endotelial vascular segregado presente en los sobrenadantes de los experimentos de migración sobre queratinocitos HaCaT como se describe en el ejemplo 1.

Los resultados de estas mediciones son visibles en la figura 2.

Figura 2: Representación de la expresión de VEGF segregado por los queratinocitos HaCaT después de la migración durante 24h.

Parece que la inducción de la secreción de VEGF es principalmente el resultado de las algas azules. En efecto, la cantidad de VEGF medida con el extracto de algas azules solas (+117%) y la "asociación" (+91%) es considerablemente más elevada que con el control positivo que ha dado el mejor resultado EGF (67%).

Las algas azules, gracias a la inducción de la secreción de VEGF favorecen por lo tanto la revascularización de los tejidos y la regeneración de estos. La composición según la invención contribuye así al mantenimiento de una piel sana, favorece la cicatrización y ayuda al relleno de las arrugas.

Ejemplo 3: Producción de ácido hialurónico (AH) y de su receptor, el CD44 sobre los queratinocitos

El antígeno CD44 representa una familia de glicoproteínas transmembranarias de tipo I. La función de CD44 como receptor del ácido hialurónico, un componente crucial de la matriz extracelular, es bien conocido. El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano, repartido ampliamente entre los tejidos conjuntivos, epiteliales y nerviosos pero que se encuentran en todos los tejidos. Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Contribuye de manera significativa a la proliferación y a la migración de las células.

Con el fin de efectuar la dosificación de la liberación del ácido hialurónico por los queratinocitos en cultivo, la solicitante ha dosificado la cantidad de AH segregado presente en los sobrenadantes en un experimento de migración sobre queratinocitos HaCaT como se ha descrito en el ejemplo 1.

El ácido hialurónico se mide después por ELISA competitivo analizado en colorimetría y expresado en ng/ml en comparación con un control no estimulado y un control positivo (EGF). Los resultados de estas mediciones son visibles en la figura 3.

Figura 3: Representación de la expresión del ácido hialurónico segregado por los queratinocitos HaCaT después de la migración durante 24h por dosificación colorimétrica.

Parece que la inducción de la liberación de ácido hialurónico es más importante con los extractos de algas azules solos (un 92%) que con las sales de lactatos solos (un 34%).

La asociación algas azules/sales de lactatos $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ según la invención presenta, por su parte, un efecto adicional con respecto a los extractos solos con el 115% de aumento del ácido hialurónico medido en el sobrenadante con respecto al control.

Con el fin de evaluar la expresión del receptor membranario CD44 por los queratinocitos en cultivo, la solicitante ha efectuado un inmunomarcado con la ayuda de un anticuerpo anti-CD44 después de 24 horas de incubación en presencia de "la asociación" en comparación con un control neutro (figura 4).

Figura 4: Revelación con inmunomarcado del efecto de "la asociación" sobre la expresión del receptor CD44 sobre unos queratinocitos HaCaT incubados durante 24h. El C44 se visualiza mediante una fluorescencia verde y el núcleo de las células por una fluorescencia azul (coloración DAPI).

Este resultado muestra que "la asociación" induce una expresión del receptor CD44 superior a la expresión basal.

Los efectos de "la asociación" sobre la inducción de la expresión del ácido hialurónico y de su receptor CD44, son interesantes para favorecer el relleno de las arrugas en una indicación anti-edad, la hidratación y la regeneración tisular.

Ejemplo 4: Actividad antioxidante sobre fibroblastos

La membrana plásmica constituye la principal y primera diana de los radicales libres oxigenados (RLO). Es el sitio de una mayor peroxidación debido a su riqueza en lípidos. Para medir la peroxidación de los lípidos membranarios, la Solicitante ha realizado una dosificación *in vitro* de los complejos entre los productos de oxidaciones lipídicas y el ácido tiobarbitúrico. Estos complejos se denominan TBARS (por Thiobarbituric Acid Reactive Substances) y dan su nombre al ensayo: Ensayo de los TBARS.

Con el fin de reproducir los efectos de un estrés oxidativo químico, la Solicitante ha tratado, durante 1 hora, una línea de fibroblastos, L929, mediante un complejo compuesto por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y por hierro (Fe²⁺/Fe³⁺) reconstituyendo así la reacción de Fenton, fuente de RLO y más particularmente de radical hidroxilo (OH°): $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + OH^- + Fe^{3+}$.

Este modelo ha permitido evaluar la actividad antiradicalaria de diferentes extractos de algas azules, y analizar su poder protector frente a la lipoperoxidación inducida por un estrés químico.

La solicitante ha determinado la actividad antioxidante de las diferentes asociaciones según la invención después de 24 horas de incubación midiendo la protección de las diferentes composiciones contra la peroxidación lipídica en comparación con la protección aportada por la vitamina E como control positivo.

Los resultados se presentan en la figura 5.

Figura 5: Representación de la actividad anti-radicalaria de diferentes extractos de algas azules incubados durante 24 horas frente a la lipoperoxidación inducida por un estrés químico de 1 hora sobre fibroblastos L929.

La solicitante ha podido demostrar que el extracto de algas azules solo no tenía ninguna actividad medible, mientras que las sales de lactatos solas presentaban una baja actividad (un 16%).

"La asociación" revela una verdadera sinergia con un porcentaje de protección del 56% próximo del obtenido con la vitamina E (un 70%).

La asociación algas azules/sales de lactatos según la invención presenta por lo tanto una buena actividad antioxidante.

Ejemplo 6: Síntesis de elastina y de colágeno I sobre fibroblastos

El colágeno de tipo I es un colágeno de tipo fibrilar mayor. Está presente en la piel, los huesos, los tendones, la córnea y los órganos internos. El colágeno I representa el 90% del colágeno que contiene el cuerpo humano. Está constituido por tres cadenas polipeptídicas enrolladas en hélice en una parte de la molécula.

La elastina es una proteína fibrosa rica en prolina. Las fibras elásticas que dan a la piel su elasticidad están constituidas por un núcleo de elastina rodeado por un manguito de microfibrillas.

Figura 6: Representación de la expresión de la elastina y del colágeno I (ARNm) sobre fibroblastos hechos senescentes por un estrés oxidativo (H₂O₂) después de 72 horas. "La asociación" se pre-incuba durante 16 horas.

Los efectos de "la asociación" sobre la inducción de la síntesis de elastina y de colágeno I sobre los fibroblastos, permiten por lo tanto favorecer el relleno de las arrugas en una indicación anti-edad.

Ejemplo 7: Inhibición de MMP-1, MMP-3, MMP-12

Las metaloproteinasas matriciales o MMP (del inglés *Matrix metalloproteinase*) son unas enzimas que degradan los constituyentes de la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, en particular de la piel.

Estas metaloproteinasas son unas enzimas de zinc que tienen una actividad endopeptidásica, es decir que hidrolizan las proteínas. La mayoría de las metaloproteinasas son segregadas por las células en el espacio extracelular. Existen numerosos tipos (una treintena aproximadamente) de los cuales:

- La colagenasa intersticial o MMP1: sintetizada por los fibroblastos o los polinucleares, degrada los colágenos fibrilares I, II y III.
- La estromelina o MMP3: que degrada los constituyentes de la lámina basal y la elastina.
- La MMP12, principalmente expresada por los macrófagos que desempeña un papel en los fenómenos de inflamación y de cicatrización.

Figura 7: Representación de la expresión de las metaloproteinasas matriciales (MMP-1, MMP-3 y MMP-12) (ARNm) sobre fibroblastos hechos senescentes por replicación. "La asociación" se pre-incuba durante 72 horas.

"La asociación" revela una verdadera inhibición de la síntesis de las metaloproteinasas matriciales (MMP-1, MMP-3 y MMP-12) en los fibroblastos senescentes. Ralentizando la degradación de los constituyentes de la matriz extracelular, la asociación según la invención muestra su capacidad para luchar contra el envejecimiento

cutáneo.

Ejemplo 8: Ejemplos de composiciones cosméticas según la invención

5 Fórmula 1:

	- agua	40 - 65%
	- tribehénina PEG-20 ésteres	2 - 7%
	- neopentanoato de isodecilo	2 - 9%
10	- glicerina	0,5 - 10%
	- PEG-8	0,5 - 8%
	- dimeticona	0,5 - 5%
	- palmitato glicol	1 - 6%
	- alcohol cetílico	0,5 - 3%
15	- BHT	0,01 - 0,03%
	- EDTA disódico	0,05 - 0,25%
	- lecitina hidrogenada	0,25 - 0,8%
	- conservante	0,5 - 3%
	- perfume	0,2 - 0,5%
20	- goma xantana	0,1 - 0,4%

con

	- lactato de calcio	0,001 - 0,1%
25	- lactato de magnesio	0,001 - 0,1%
	- maltodextrina	0,1 - 1%
	- <i>phormidium uncinatum</i>	0,001 - 0,1%

Fórmula 2:

30	- agua	40 - 85%
	- neopentanoato de isodecilo	2 - 9%
	- glicerina	0,5 - 10%
	- alcohol de cacahuete	0,5 - 3%
35	- alcohol behénico	0,3 - 2%
	- EDTA disódico	0,05 - 0,25%
	- estearato de glicerilo	0,5 - 4%
	- lecitina hidrogenada	0,25 - 0,8%
	- conservante	0,5 - 3%
40	- perfume	0,2 - 0,5%
	- mica	0,001 - 1%
	- metacrilato de polimetilo	0,01 - 0,9%
	- óxido de estaño	0,001 - 0,65%
	- dióxido de titanio	0,01 - 0,9%
45	- goma xantana	0,1 - 0,4%

con

	- lactato de calcio	0,001 - 0,1%
50	- lactato de magnesio	0,001 - 0,1%
	- maltodextrina	0,1 - 1%
	- <i>phormidium uncinatum</i>	0,001 - 0,1%

De manera no limitativa, se podrán utilizar en particular solos o en mezcla:

55

Como emulsionantes:

60 tribehénina PEG- 20 ésteres, lecitina hidrogenada, alcohol cetearílico, cetearilo glicósido, estearato de glicerilo, PEG100 estearato, potasio cetil fosfato, sodio estearoil glutamato, alcohol araquidílico, glucósido araquidílico, alcohol cetílico.

Como emolientes:

65 neopentanoato de isodecilo, carbonato de dicaprililo, ppg-15 esteariléter, alquil C12-15-benzoato, isododecano, isohexadecano.

ES 2 666 306 T3

Como humectantes:

glicerina, PEG-8, metil gluceth-20, butilenglicol, sorbitol, dipropilenglicol, PEG-4, PEG-12.

5 Como agentes de textura:

dimeticona, palmitato de glicol, alcohol behenílico, monoestearato de glicerol, metacrilato de polimetilo, nylon 12.

10 Como antioxidantes:

BHT, tocoferol, acetato de tocoferilo.

Como conservantes:

15

EDTA disódico, EDTA tetrasódico, diccinato etilendiamina trisódico.

Como gelificantes:

20

Goma xantana, goma Gellan, silicato de magnesio aluminio, copolímeros de acrilatos, hidroxietilcelulosa, polímero carboxivinílico.

Como colorantes:

25

mica, óxido de estaño, dióxido de titanio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición tópica, caracterizada por que contiene por lo menos un extracto de alga azul y por lo menos una sal de ácido alfa-hidroxiado soluble en medio acuoso, seleccionada de entre las sales de magnesio, de calcio y de sodio, así como sus mezclas, en asociación con por lo menos un excipiente aceptable para la aplicación tópica.
- 10 2. Composición tópica según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de ácido alfa-hidroxiado es un lactato.
- 15 3. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que el alga azul es de tipo *Phormidium sp.*
- 20 4. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que contiene por lo menos una sal de magnesio.
- 25 5. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que contiene por lo menos una sal de calcio.
- 30 6. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que comprende una asociación de sal de magnesio y de sal de calcio.
- 35 7. Composición tópica según la reivindicación 6, caracterizada por que comprende una asociación que va de 1/2 de lactato de magnesio y 1/2 de lactato de calcio a una asociación de 1/4 de lactato de magnesio y de 3/4 de lactato de calcio es decir una relación de 1 por 1 a 1 por 3 en peso total de la composición.
- 40 8. Composición tópica según la reivindicación 7, caracterizada por que comprende una asociación de sal de magnesio y de sal de calcio en una proporción de 2/3 / 1/3 es decir una relación de 2 por 1 en peso.
- 45 9. Composición tópica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el extracto de alga azul presente en la composición representa entre el 0,001% y el 0,01% en peso, del peso total de la composición.
- 50 10. Composición tópica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la o las sales de ácido alfa-hidroxiado presentes en la composición representan, juntas o cada una considerada separadamente, entre el 0,001% y el 0,01% en peso, del peso total de la composición.
- 55 11. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que se presenta en forma de un producto de cuidado y/o de maquillaje de la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las pestañas, de las cejas, del cabello, del cuero cabelludo, de las uñas o de las mucosas; de un producto solar o autobronceador; de un producto capilar, en particular de coloración, de acondicionamiento y/o de cuidado del cabello.
- 60 12. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que comprende por lo menos una fase líquida que comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre los aceites y/o disolventes de origen mineral, animal, vegetal o sintético, carbonados, hidrocarbonados, fluorados, y/o siliconados, suero, volátiles o no volátiles, solos o en mezcla.
- 65 13. Utilización cosmética de una composición tópica, según una de las reivindicaciones 1 a 12, en la prevención y/o el tratamiento de todos los signos relacionados con el envejecimiento del organismo, en particular los que afectan a la piel y/o a los anexos cutáneos y/o a las mucosas.
14. Utilización cosmética según la reivindicación 13, en la prevención de los signos de envejecimiento cutáneo.
15. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 10 para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de las afecciones de la mucosa bucal.
16. Procedimiento de tratamiento cosmético de las materias queratínicas, en particular de la piel del cuerpo o de la cara, de los labios, de las uñas, del cabello, de las pestañas y/o de las mucosas, que comprende la aplicación sobre dichas materias de una composición cosmética tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 10.
17. Procedimiento de preparación de composiciones según las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
 - 1- Obtención de la biomasa de alga azul:

ES 2 666 306 T3

- La biomasa se recolecta después de una duración de cultivo de 10 a 20 días en condiciones de temperatura y de luminosidad adecuadas,
- 5
- 2- Obtención del extracto de alga azul:
- La biomasa se lava y después se tritura finamente. La fracción acuosa se separa de los restos celulares por centrifugación o filtración,
- 10
- 3- La solución así obtenida se adiciona:
- con ácido alfa-hidroxilado o una de sus sales
 - con maltodextrina que sirve de soporte
- 15
- 4- El pH de las muestras se lleva a pH=6,5 utilizando NaOH (0,1 N),
- 5- El producto seco se obtiene por eliminación del agua mediante una técnica apropiada, que podrá ser, por ejemplo: un procedimiento de liofilización, de atomización o de secado bajo estufa ventilada a baja temperatura.

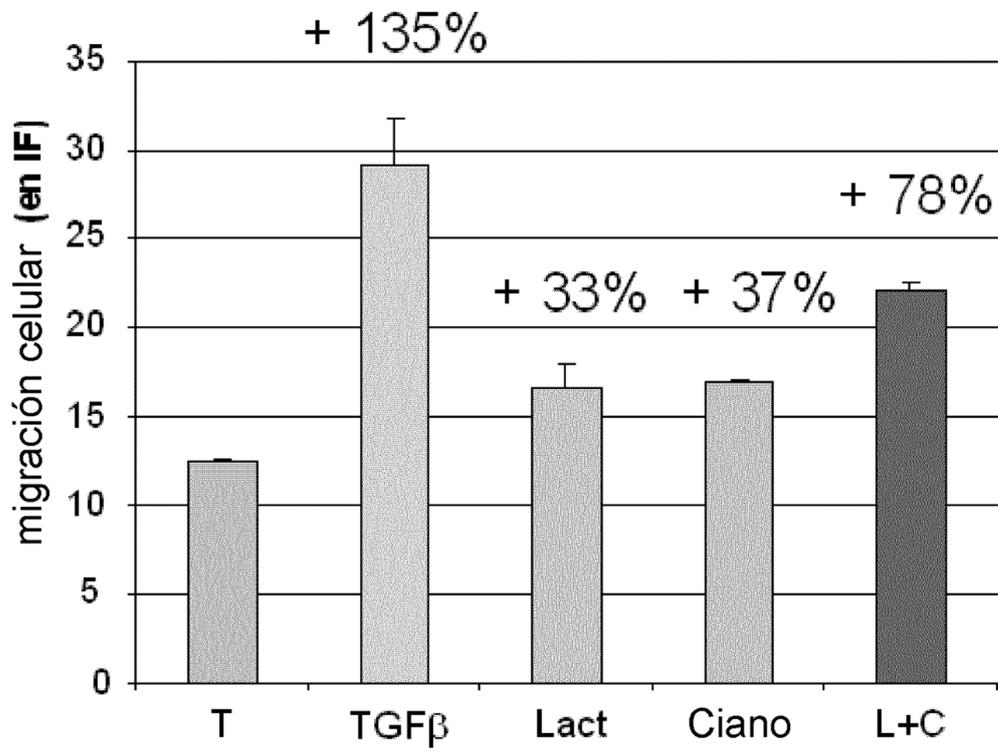


Figura 1

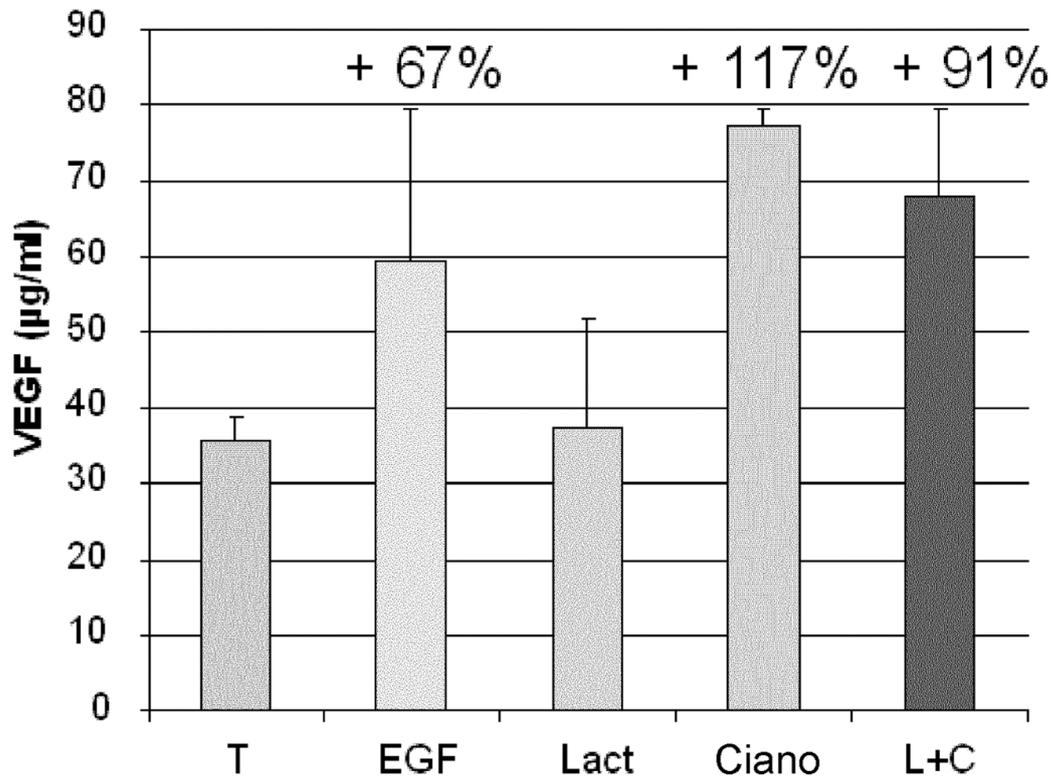


Figura 2

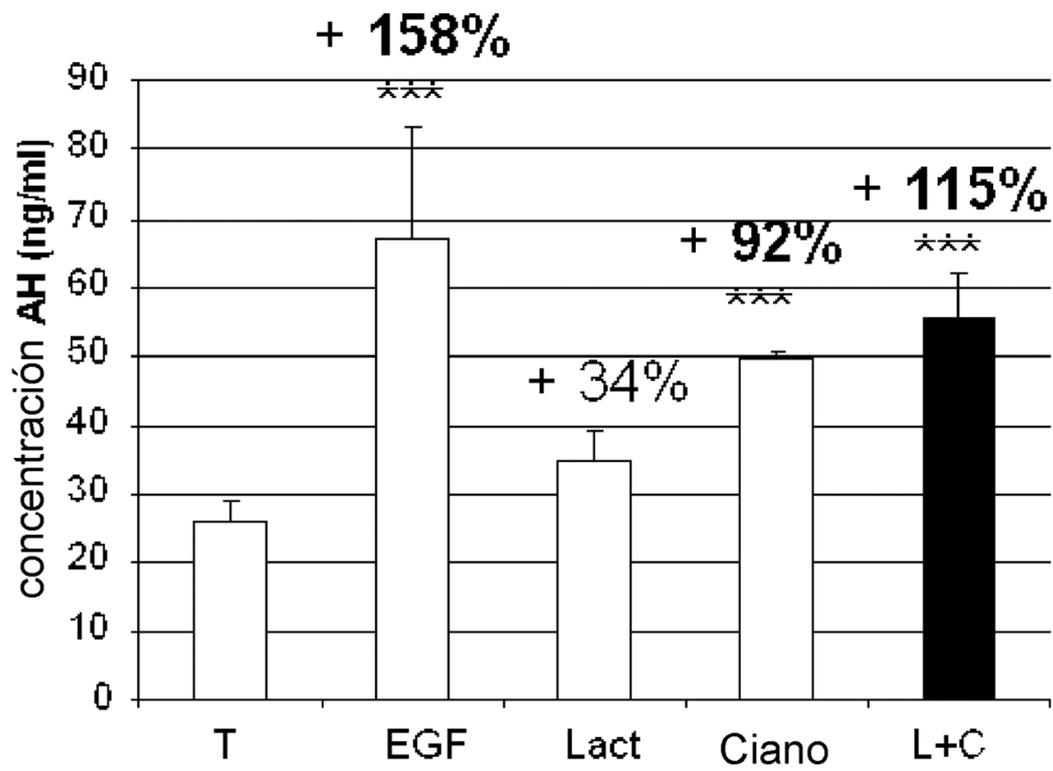


Figura 3

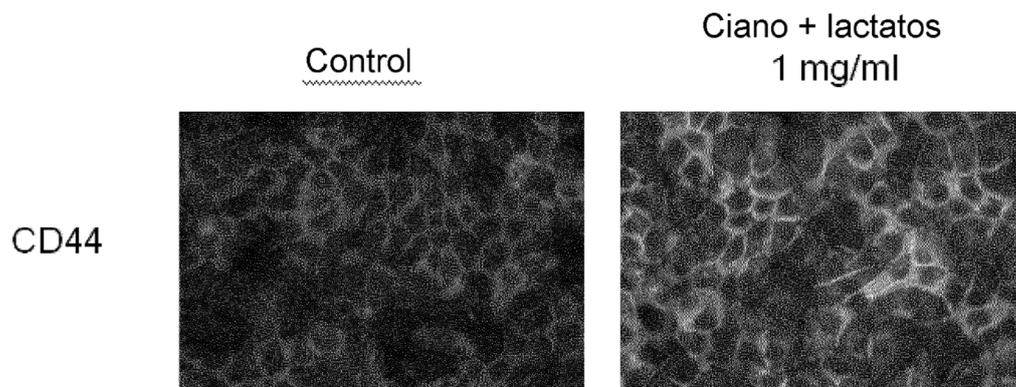


Figura 4

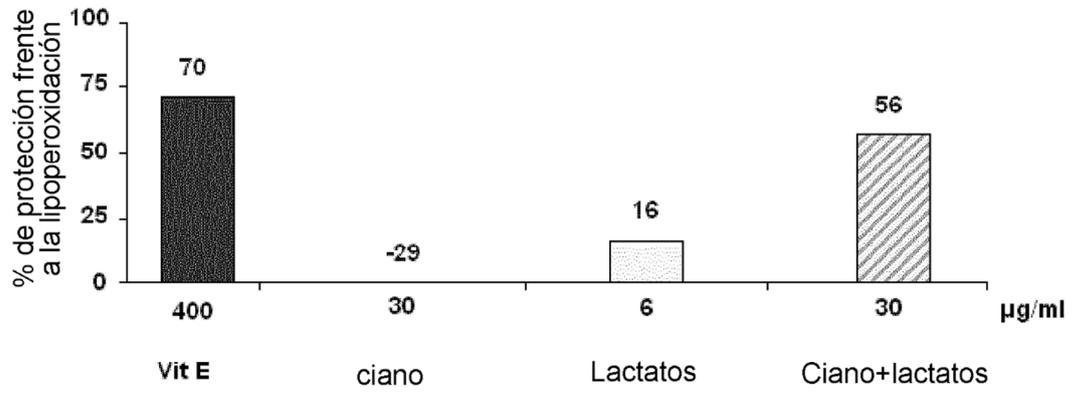


Figura 5

	Ciano + Lactatos	
	50 µg/ml	100 µg/ml
Colágeno I	+196 %	+ 25%
Elastina	+177 %	+37 %

Figura 6

		MMP-1	MMP-3	MMP-12
Control P7	Fibroblastos jóvenes	100	100	100
Control P17	Fibroblastos maduros	2128%	551%	1374%
Control P17: lact+Ciano (10µg/ml)	Fibroblastos maduros	-55%	-49%	-46%

Figura 7