

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 028**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/99 (2007.01)

A61K 36/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2011 PCT/CA2011/000372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11127559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2011 E 11768299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2558062**

54 Título: **El uso de un extracto celular fotosintético que comprende tilacoides funcionales en composiciones cosméticas**

30 Prioridad:

12.04.2010 CA 2699676

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

07.06.2019

73 Titular/es:

**GROUPE SANTÉ DEVONIAN (100.0%)
360 des Entrepreneurs
Montmagny QC G5V 4T1, CA**

72 Inventor/es:

**BOULET, ANDRE P. y
MAES, PAUL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 716 028 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

El uso de un extracto celular fotosintético que comprende tilacoides funcionales en composiciones cosméticas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones cosméticas y tópicas que contienen una cantidad eficaz de un extracto celular fotosintético que comprende un sistema funcional de tilacoides. Más específicamente, se refiere al uso de extracto celular fotosintético para proteger a la piel contra el daño por radiación ultravioleta A (UVA) y ultravioleta (UVB).
10 Además, se describen composiciones cosméticas que tienen efectos antiarrugas y antienvjecimiento.

Antecedentes de la invención

15 La piel es un órgano complejo con 3 capas principales de tejido: la epidermis, la dermis y la hipodermis. La estructura de la piel, así como sus distintos tipos celulares, su organización y papel se han descrito en numerosas publicaciones. Para entender el impacto en la piel de sustancias tales como los fármacos, los extractos naturales y la radiación ultravioleta, se han desarrollado pruebas que no se realizan en animales y que se utilizan ahora de forma satisfactoria en el estudio del daño/reparación de la piel (Auger 2004; Rouabhia 1997; Van de Sandt 1999).

20 Los antioxidantes previenen significativamente el daño tisular y estimulan la cicatrización. Esto se efectúa a través de numerosos mecanismos que incluyen la prevención/limitación de la peroxidación lipídica, la inflamación y la alteración del ADN celular. Se cree que algunos extractos vegetales tienen fuertes efectos antioxidantes (Thang 2001).

25 Los tilacoides son membranas especializadas que son responsables de la fotosíntesis en los eucariotas (plantas y algas) y procariotas (bacterias). Estos organismos fotosintéticos convierten el CO₂ en material orgánico al reducir este gas a carbohidratos en un complejo conjunto de reacciones. Los electrones para esta reacción de reducción provienen en última instancia del agua, la cual se convierte después en oxígeno y protones. La energía para este proceso es proporcionada por la luz, que es absorbida por pigmentos (principalmente clorofilas y carotenoides).

30 La piel es una interfaz entre el cuerpo y el entorno y está continuamente expuesta a factores endógenos y ambientales que pueden provocar daño y acelerar el envejecimiento de la piel. El estrés oxidativo originado en los radicales libres o las especies reactivas de oxígeno (ERO) se considera un factor contribuyente importante en el proceso de envejecimiento. Las ERO son producidas por reacciones químicas normales en el cuerpo, así como por radiación UV, la polución, el tabaquismo, el estrés y otros factores externos. Se ha demostrado que, durante el envejecimiento,
35 aumentan los niveles de las ERO en la piel mientras disminuyen las defensas antioxidantes. El estrés oxidativo está implicado en el daño de componentes celulares, tales como el ADN, los lípidos de las membranas celulares y las proteínas. Por lo tanto, los antioxidantes aplicados por vía tópica pueden desempeñar un papel clave en la reducción del daño provocado por los radicales libres en la piel.

40 La peroxidación de lípidos es un mecanismo bien establecido de lesión celular tanto en plantas como en animales, y se usa como un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, procedentes de ácidos grasos poliinsaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos. Estos incluyen compuestos carbonílicos reactivos, de los cuales el más abundante es el malondialdehído (MDA). La medición del MDA, por lo tanto, es utilizada extensamente como un indicador de la peroxidación de lípidos (Esterbauer, 1991).

45 Los niveles aumentados de los productos de peroxidación de lípidos se han asociado con una diversidad de enfermedades crónicas tanto en seres humanos como en sistemas modelo. El ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, forma siglada de *thiobarbituric acid reactive substances*) se usa comúnmente para medir el MDA en muestras biológicas. Sin embargo, esta reacción es relativamente inespecífica, dado que puede reaccionar tanto el MDA libre como el unido a proteínas.

50 El método MDA-586 está diseñado para someter a ensayo el MDA libre o, después de una etapa de hidrólisis, el MDA total (es decir, el libre y el conjugado como base de Schiff unido a proteínas). Las condiciones de ensayo sirven para minimizar la interferencia de otros productos de peroxidación de lípidos, tales como los 4-hidroxi-alquenos.

55 La irradiación de UVB (280-320 nm) se absorbe bien en diversas macromoléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ADN, provocando daños directamente al convertir la energía de irradiación en reacciones fotoquímicas. Además, se producen ERO (por ejemplo, radicales de oxígeno y oxígeno singlete), que pueden modificar el ADN celular y otros componentes celulares, conduciendo posiblemente a la fotocarcinogénesis. Además, se ha demostrado que el componente de UVA de la radiación solar (320-400 nm) produce efectos biológicos nocivos en los que el oxígeno singlete desempeña un papel importante. Esto es de particular importancia en el tejido que está expuesto a la radiación UVA, tal como la piel y el ojo.

60 Con frecuencia, la piel está expuesta a la luz solar y se cree que la exposición a los UVA provoca envejecimiento de la piel y cáncer de piel, principalmente a través de la acción del oxígeno singlete. El oxígeno singlete media la regulación génica a través del factor de transcripción proteína activadora 2, activa las proteínas quinasas activadas por estrés o induce en los fibroblastos de la piel un patrón de proteína quinasa activada por mitógenos, así como la

inducción de las quinasas p38 y c-Jun-N terminal.

En el tejido, un número limitado de moléculas absorben débilmente la irradiación UVA. Después de la absorción de la irradiación UVA, estas moléculas (fotosensibilizador endógeno) pasan a su estado de triplete de larga vida que permite transferir energía a las moléculas de oxígeno. La energía transferida conduce a una molécula de oxígeno excitada energéticamente (oxígeno singlete), que es altamente reactiva.

Es bien sabido que el hidroperóxido de t-butilo (tBHP) imita la peroxidación lipídica en la piel (queratinocitos humanos). El tBHP es un peróxido orgánico usado para inducir la producción de radicales libres en varios sistemas biológicos. Los glóbulos rojos expuestos al tBHP experimentan peroxidación lipídica, degradación de la hemoglobina y la estimulación de la derivación de la hexosa monofosfato. La peroxidación lipídica y la degradación de la hemoglobina representan extremos de un espectro del daño oxidativo. El tBHP induce la muerte celular a través de apoptosis o necrosis. El ensayo de hemólisis de eritrocitos es uno de los mejores modelos celulares para evaluar el efecto antioxidativo de un compuesto.

Se ha descrito un extracto de membranas de tilacoides dinámicas e intactas que tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y su uso en combinación con otros compuestos antiinflamatorios, en las publicaciones de patentes de Estados Unidos n.º WO 01/49305 y WO 03/04042, respectivamente. Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del extracto de tilacoide se han demostrado en estudios *in vitro*, *ex vivo*, *in situ* e *in vivo*. Específicamente, se ha demostrado que el extracto de tilacoides captura las especies nocivas de oxígeno reactivo, incluyendo las especies de oxígeno singlete, y que modula las citocinas pro y antiinflamatorias para la atenuación de la inflamación.

También se ha descrito el uso de extractos de tilacoides como eliminadores de ERO, como fotoprotectores, particularmente contra las radiaciones ultravioletas (UV) y como un filtro solar debido a su capacidad para capturar las radiaciones UV y para disipar la energía solar como calor (documento WO 01/49305).

Adicionalmente, el documento US 20070036877 divulga que, *in vivo*, Las aplicaciones tópicas del extracto de tilacoides aplicado directamente al sitio de la lesión, han demostrado prevenir o reducir el daño de la piel inducido por los UV en ratones lampiños.

Existe la necesidad de composiciones cosméticas y tópicas que contengan una cantidad eficaz de un extracto celular fotosintético que comprenda un sistema funcional de tilacoides ("extracto celular fotosintético" o "extracto") y que tenga efectos antiarrugas y antienvjecimiento en la piel de un usuario. Además, existe la necesidad de composiciones cosméticas y tópicas que contengan una cantidad eficaz del extracto celular fotosintético para proporcionar una protección prolongada de la piel contra el daño por los rayos ultravioleta A (UVA) y ultravioleta (UVB).

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en la reivindicación adjunta 1. Realizaciones particulares de la presente invención son como se define en las reivindicaciones adjuntas 2-8.

La presente invención proporciona un nuevo uso para un extracto celular fotosintético, es decir, en una composición cosmética que comprende el extracto celular fotosintético en aplicaciones antienvjecimiento y antioxidantes para aumentar la firmeza y la hidratación de la piel de un usuario y para proteger la piel del usuario contra el daño por UVA y UVB.

Además, se describe el tratamiento cosmético de las arrugas mediante aplicaciones locales o subcutáneas de una composición cosmética que contiene el extracto celular fotosintético.

La invención se refiere al uso de un extracto celular fotosintético contra el daño del tejido y del ADN inducido por radiación UVA o UVB, y a una composición que comprende el extracto celular fotosintético y un excipiente para administración tópica. Los inventores han descubierto una sorprendente sinergia obtenida al combinar el extracto celular fotosintético y un filtro solar para proteger a la piel contra el daño por UVA y UVB.

Adicionalmente, los inventores han descubierto que la adición de un extracto celular fotosintético a una composición tópica prolongará la capacidad de la composición para proteger a la piel del daño por UVA y UVB. Se ha demostrado que una formulación en crema que contiene el extracto protege contra la peroxidación de lípidos por irradiación UV y protege contra la hemólisis de eritrocitos, en comparación con las formulaciones sin el extracto.

El extracto celular fotosintético comprende un complejo antioxidante natural exclusivo que tiene la capacidad de capturar y disipar continuamente la energía nociva generada por las ERO. El extracto es, por lo tanto, capaz de capturar las ERO, de neutralizar las ERO disipando la energía nociva generada por las ERO y de volver a su estado original, listo para repetir el ciclo una y otra vez. Es este dinamismo y capacidad de regeneración lo que le proporciona al extracto su protección antioxidante de larga duración y sin precedentes.

La composición de acuerdo con la invención se puede preparar e incorporarse en todas las formas farmacéuticas utilizadas normalmente para la aplicación tópica. Adicionalmente, la composición puede comprender los aditivos habituales en los campos cosmético y dermatológico, tales como grasas, emulsionantes y coemulsionantes, agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, principios activos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, filtros hidrófilos y lipófilos, colorantes, neutralizantes, agentes de propenetración y polímeros.

El extracto se puede formular en una composición líquida (un extracto no liofilizado), un extracto liofilizado reconstituido en agua, solución salina fisiológica o cualquier otra solución compatible con la administración tópica, en propilenglicol o en una composición sólida.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** ilustra la eficacia del extracto contra el daño tisular inducido por UVB. Se observó el daño después de la exposición a dos niveles de exposición a UVB (10 y 25 kJ/m²) en tejido no tratado (control), tejido tratado con una composición sin extracto (vehículo) y tejido tratado con composiciones que comprenden el extracto al 0,1 % (A) y el 0,01 % (B).

La **Figura 2** ilustra la eficacia del extracto contra el daño tisular inducido por UVA. Se observó el daño después de la exposición a dos niveles de exposición a UVA (250 y 750 kJ/m²) en tejido no tratado (control), tejido tratado con una composición sin extracto (vehículo) y tejido tratado con composiciones que comprenden el extracto al 0,1 % (A) y el 0,01 % (B).

La **Figura 3** ilustra la eficacia del extracto contra el daño la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) inducidos por UVB.

La **Figura 4** ilustra la evaluación de la frecuencia de DPC después del tratamiento con extracto y después irradiación con UVB, donde (1) indica el daño inducido por los UVB según se juzga por el bajo peso molecular de los fragmentos de ADN y (2) indica la protección proporcionada por el extracto, según se juzga por la presencia de ADN de un peso molecular más alto que el mostrado en tejidos no protegidos.

La **Figura 5** ilustra la evaluación de la frecuencia de DPC después del tratamiento con extracto y después la irradiación con UVB. El tejido tratado con el extracto tiene menos daño fotooxidativo que el no protegido, según se juzga por las manchas de ADN de bajo peso molecular.

La **Figura 6** ilustra los efectos sinérgicos del extracto y del filtro solar contra el daño tisular inducido por UVB. Las pieles humanas técnicamente modificadas se protegieron con filtro solar (FPS = 7,5) solo, filtro solar más extracto al 0,01 % o filtro solar más extracto al 0,1 % durante 30 minutos. Los tejidos de control no estaban protegidos. Los tejidos protegidos y no protegidos se expusieron o no a 25 kJ/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, se recogieron biopsias y se tiñeron con tricrómico de Masson. Después, los cortes teñidos se analizaron y fotografiaron utilizando un microscopio óptico a un aumento de 250x.

La **Figura 7** ilustra los efectos sinérgicos del extracto y del filtro solar contra el daño tisular inducido por UVA. Los tejidos técnicamente modificados se protegieron con filtro solar (FPS = 7,5) solo, filtro solar más extracto al 0,01 % o filtro solar más extracto al 0,1 % durante 30 minutos. Los tejidos de control no estaban protegidos. Los tejidos protegidos y no protegidos se expusieron o no a 750 kJ/m² de UVA. Inmediatamente después de la irradiación, se recogieron biopsias y se tiñeron con tricrómico de Masson. Después, los cortes teñidos se analizaron y fotografiaron utilizando un microscopio óptico a un aumento de 250x.

La **Figura 8** ilustra los efectos sinérgicos del extracto y del filtro solar contra los DPC inducidos por UVB. Las pieles humanas técnicamente modificadas se protegieron con filtro solar (FPS = 7,5) solo, filtro solar más extracto al 0,01 % o filtro solar más extracto al 0,1 % durante 30 minutos. Los tejidos de control no estaban protegidos. Los tejidos protegidos y no protegidos se expusieron o no a 25 kJ/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, se recogieron biopsias y se tiñeron utilizando un anticuerpo monoclonal específico anti-DPC. Después, los cortes teñidos se analizaron y fotografiaron utilizando un microscopio de fluorescencia a un aumento de 250x.

La **Figura 9** ilustra los efectos sinérgicos del extracto y del filtro solar contra los DPC inducidos por UVB. Los tejidos técnicamente modificados se protegieron con filtro solar (FPS = 7,5) solo, filtro solar más extracto al 0,01 % o filtro solar más extracto al 0,1 % durante 30 minutos. Los tejidos de control no estaban protegidos. Los tejidos protegidos y no protegidos se expusieron o no a 25 kJ/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, Se extrajo ADN de cada muestra, se trató con T4endo-V y se fraccionó mediante electroforesis (C=Control, V=Vehículo, M= Patrón de peso molecular, PS=Filtro solar).

La **Figura 10** ilustra los efectos sinérgicos del extracto y del filtro solar contra el daño fotooxidativo inducido por UVA. Los tejidos técnicamente modificados se protegieron con filtro solar (FPS = 7,5) solo, filtro solar más extracto al 0,01 % o filtro solar más extracto al 0,1 % durante 30 minutos. Los tejidos de control no estaban protegidos. Los tejidos protegidos y no protegidos se expusieron o no a 750 kJ/m² de UVA. Inmediatamente después de la

irradiación, Se extrajo ADN de cada muestra, se trató con Nth y Fpg, y se fraccionó mediante electroforesis (C=Control, V=Vehículo, M= Patrón de peso molecular, PS=Filtro solar).

5 La **Figura 11** ilustra la eficacia del extracto en la reparación el daño tisular inducido por UVB. Los tejidos técnicamente modificados se expusieron a 150 J/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se cubrieron o no con vehículo o con el extracto a dos concentraciones: el 0,01 % y el 0,1 %. Tres horas más tarde, Se recogieron biopsias y se tiñeron con tricrómico de Masson, y se observaron utilizando un microscopio óptico a un aumento de 250x.

10 La **Figura 12** ilustra la eficacia del extracto en la reparación el daño tisular inducido por UVA. Los tejidos técnicamente modificados se expusieron a 250 kJ/m² de UVA. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se cubrieron o no con vehículo, o el extracto a dos concentraciones: el 0,01 % y el 0,1 %. Tres horas más tarde, Se recogieron biopsias y se tiñeron con tricrómico de Masson, y se observaron utilizando un microscopio óptico a un aumento de 250x.

15 La **Figura 13** ilustra la eficacia del extracto en la reparación de la formación de DPC inducidos por UVB. Los tejidos técnicamente modificados se expusieron a 150 J/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se cubrieron o no con vehículo, o el extracto a dos concentraciones: el 0,01 % y el 0,1 %. Tres horas más tarde, se recogieron biopsias y se tiñeron utilizando un anticuerpo monoclonal anti DPC, y se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia a un aumento de 250x.

20 La **Figura 14** ilustra la eficacia del extracto en la reparación de los DPC inducidos por UVB. Los tejidos técnicamente modificados se expusieron a 150 J/m² de UVB. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se cubrieron o no con vehículo, o el extracto a dos concentraciones: el 0,01 % y el 0,1 %. Tres horas más tarde, Se extrajo ADN de cada muestra, se trató con T4endo-V y se fraccionó mediante electroforesis (C=Control, V=Vehículo, M= Patrón de peso molecular).

25 La **Figura 15** ilustra la eficacia del extracto en la reparación el daño fotooxidativo inducido por UVA. Los tejidos técnicamente modificados se expusieron a 250 kJ/m² de UVA. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se cubrieron o no con vehículo, o el extracto a dos concentraciones: el 0,01 % y el 0,1 %. Tres horas más tarde, Se extrajo ADN de cada muestra, se trató con Nth y Fpg, y se fraccionó mediante electroforesis (C=Control, V=Vehículo, M= Patrón de peso molecular).

30 La **Figura 16** ilustra el porcentaje de mejora en la hidratación en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación al día 0, medido por Corneometer®.

35 La **Figura 17** ilustra la evolución de la Ue (extensibilidad) en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

40 La **Figura 18** ilustra la evolución de la Uf (amplitud máx.) en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

45 La **Figura 19** ilustra la evolución de la R9 (fatigabilidad) en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

La **Figura 20** ilustra la evolución de Ur/Ue (firmeza) en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

La **Figura 21** ilustra la superficie de arrugas en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

50 La **Figura 22** ilustra la evolución de la longitud total de las arrugas en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

La **Figura 23** ilustra la evolución de la media de la longitud de las arrugas en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

55 La **Figura 24** ilustra el número total de arrugas en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

La **Figura 25** ilustra la evolución del número de arrugas de clase 1 en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

60 La **Figura 26** ilustra la evolución del número de arrugas de clase 2 en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

65 La **Figura 27** ilustra la evolución del número de arrugas de clase 3 en el día 1, el día 7 y el día 28, en comparación con el día 0.

Figura 28: ilustra pocillos de irradiación que muestran los ácidos grasos y la formulación en crema mezclados (1:1) e irradiados durante 10 minutos.

Figura 29a: ilustra el factor de protección de las formulaciones en crema contra la peroxidación lipídica provocada por la irradiación UV (10 minutos); después de 1 hora de incubación (verde y azul) y 2 horas de incubación (verde oscuro y rojo) a 45 °C. (Abreviaturas: PBO, crema placebo; PGD2, PurGenesis día (extracto al 0,01 %); PGN2, PurGenesis noche (extracto al 0,015 %); PGE1, PurGenesis ojo (extracto al 0,02 %); EA, Elisabeth Arden Prevage; LM, La Mer.) Concentración final: ácidos grasos al 10 % (v/v); formulaciones en crema: 10 % (p/v).

Figura 29b: ilustra el factor de protección de las formulaciones en crema contra la peroxidación lipídica provocada por la irradiación UV (10 minutos); después de 1 hora de incubación (verde y azul) y 2 horas de incubación (verde oscuro y rojo) a 45 °C. El efecto prooxidante está restringido al 100 %. (Abreviaturas: PBO, crema placebo; PGD2, PurGenesis día (extracto al 0,01 %); PGN2, PurGenesis noche (extracto al 0,015 %); PGE1, PurGenesis ojo (extracto al 0,02 %); EA, Elisabeth Arden Prevage; LM, La Mer.) Concentración final: ácidos grasos al 10 % (v/v); formulaciones en crema al 10 % (p/v).

Figura 29c: ilustra el factor de protección de las formulaciones en crema contra la peroxidación lipídica provocada por la irradiación UV (10 minutos); después de 1 hora de incubación (verde y azul) y 2 horas de incubación (verde oscuro y rojo) a 45 °C. (Abreviaturas: PBO, crema placebo; PGD2, PurGenesis día (extracto al 0,01 %); EA, Elisabeth Arden Prevage; LM, La Mer.) Concentración final: ácidos grasos al 10 % (v/v); formulaciones en crema al 10 % (p/v).

Figura 29d: ilustra el factor de protección de las formulaciones en crema contra la peroxidación lipídica provocada por la irradiación UV (10 minutos); después de 1 hora de incubación (verde y azul) y 2 horas de incubación (verde oscuro y rojo) a 45 °C. El efecto prooxidante está restringido al 300 %. PBO, crema placebo; PGD2, PurGenesis día (extracto al 0,01 %); PGN2, PurGenesis noche (extracto al 0,015 %); PGE1, PurGenesis ojo (extracto al 0,02 %); EA, Elisabeth Arden Prevage; LM, La Mer. Concentración final: ácidos grasos, al 10 % (v/v); formulaciones en crema al 10 % (p/v).

Figura 29e: ilustra el factor de protección de las formulaciones en crema contra la peroxidación lipídica provocada por la irradiación UV (10 minutos); después de 1 hora de incubación (verde y azul) y 2 horas de incubación (verde oscuro y rojo) a 45 °C. El efecto prooxidante está restringido al 200 %. PBO, crema placebo; PGD2, PurGenesis día (extracto al 0,01 %); PGN2, PurGenesis noche (extracto al 0,015 %); PGE1, PurGenesis ojo (extracto al 0,02 %); EA, Elisabeth Arden Prevage; LM, La Mer. Concentración final: ácidos grasos, al 10 % (v/v); formulaciones en crema al 10 % (p/v).

Figura 30: ilustra la hemólisis de eritrocitos bovinos provocada por el tBHP (2 mM) con y sin formulaciones cosméticas.

Figura 31: ilustra la I50 de hemólisis; tiempo de incubación relativo para provocar el 50 % de daño celular.

Figura 32: ilustra el factor de protección relativo de tres formulaciones cosméticas (concentración de extracto al 0,01 %, 0,015 % y 0,02 %).

Figura 33: ilustra la comparación del factor de protección contra la hemólisis de eritrocitos bovinos para las tres formulaciones cosméticas (concentración de extracto al 0,01 %, 0,015 % y 0,02 %), después de 125 y 225 minutos de incubación.

Figura 34: ilustra el control (sin tBHP): Triplicados más control de crema.

Descripción detallada

USO DE EXTRACTO PARA PROTEGER LA PIEL CONTRA EL DAÑO POR RAYOS UVA Y UVB

En conformidad con la presente invención, se desarrollaron dos composiciones tópicas: una que comprende el 0,01 % del extracto y otra que comprende el 0,1% del extracto.

Usando fuentes artificiales de radiación UVA y UVB, y composiciones tópicas que comprenden las dos concentraciones de extracto, y una composición tópica que no contenía ningún extracto, los inventores evaluaron los cambios morfológicos, la formación de DPC y el daño del ADN en piel humana técnicamente diseñada genética (EHS, forma siglada de *engineered human skin*) en comparación con EHS no desprotegida (control).

El análisis morfológico indicó que el extracto proporciona protección de la EHS contra daños estructurales por los UVA.

Los inventores descubrieron adicionalmente que, cuando se añaden a una loción de filtro solar comercial, el extracto celular fotosintético reduce el daño del ADN inducido por los UVA/UVB en la EHS.

Las composiciones que contienen las dos concentraciones del extracto demostraron mejoras obvias en la reparación del daño estructural y del ADN de la EHS inducido tanto por UVB como por UVA. Los inventores descubrieron, por lo tanto, que el extracto estimula la reparación del daño fotooxidativo del ADN inducido por los UVA.

- 5 Además, se mostró que la adición de una baja concentración del extracto (0,01 %) al filtro solar convencional demostró un aumento sorprendentemente significativo de la protección contra el daño del ADN inducido por los UV.

Eficacia del extracto contra el daño tisular de EHS inducido por los UVB

- 10 Los inventores compararon la EHS tratada con composiciones tópicas que comprenden extracto al 0,1 %, extracto al 0,01 % y sin extracto (vehículo) con la EHS no tratada (control). La EHS se expuso a UVB a 10 y 25 kJ/m². Como se muestra en la **Figura 1**, los distintos estratos (germinativo, granuloso, espinoso y córneo) de la EHS expuestos a UVB fueron menos distinguibles entre sí en comparación con los tejidos no expuestos a UVB. A medida que la dosis de UVB se aumentaba de 10 a 25 kJ/m², hubo un aumento en la desorganización epidérmica determinado por el engrosamiento del estrato córneo y la reducción del número de capas de células epidérmicas (**Figuras 1a y 1e**). En estos tejidos irradiados también se indujeron queratinocitos morfológicamente diferenciados (células grandes con núcleos tenues, citoplasma grande y la presencia de vacuolas). Se observaron cambios comparables en la EHS tratada con vehículo (**Figuras 1b y 1f**). La EHS protegida con extracto mostró una ligera reducción de daño tisular o celular (**Figuras 1c, 1d, 1g y 1h**). Sin embargo, las distintas capas epidérmicas de la EHS tanto protegida como no protegida permanecieron visibles.

Estos análisis histológicos sugieren que las composiciones que contienen el extracto en ambas concentraciones (0,01 % y 0,1 %) no actuaron como protectoras eficaces de la estructura tisular contra dosis elevadas de irradiación UVB (10 - 25 kJ/m²).

25

Eficacia del extracto contra el daño tisular de EHS inducido por los UVA

- Los inventores compararon la EHS tratada con composiciones tópicas que comprenden extracto al 0,1 %, extracto al 0,01 % y sin extracto (vehículo) con la EHS no tratada (control). La EHS se expuso a UVA a 750 y 250 kJ/m². Como se muestra en la **Figura 2**, los distintos estratos (germinativo, granuloso, espinoso y córneo) de la EHS expuestos a UVA estaban completamente desorganizados y eran menos distinguibles entre sí en comparación con los tejidos no expuestos a UVA. La desorganización del tejido, determinada por el engrosamiento del estrato córneo y la reducción en el número de capas de células epidérmicas (**Figuras 1a y 1e**), fue mayor después de la exposición a 750 kJ/m² en comparación con 250 kJ/m². Morfológicamente, los inventores no pudieron identificar células en la epidermis irradiada con UVA. Se observaron cambios comparables en la EHS tratada con vehículo (**Figuras 1d y 1f**) pero en un grado menor. A la inversa, la EHS protegida con extracto mostró una reducción significativa de daño tisular o celular inducido por UVA. Las distintas capas epidérmicas de la EHS protegida permanecieron visibles. (**Figuras 1c, 1d, 1g y 1h**) para ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %). Estos análisis histológicos revelaron que las composiciones que comprendían el extracto protegieron a la estructura tisular contra el daño por UVA.

40

Eficacia del extracto contra el daño del ADN de EHS inducido por los UVB.

- Usando micrografía de inmunofluorescencia, los inventores evaluaron el efecto del extracto en la formación y distribución de DPC después de la exposición a UVB. Como se muestra en la **Figura 3**, dos dosis de UVB, 10 kJ/m² y 25 kJ/m², indujeron DPC en la mayoría de las células epidérmicas en la EHS no protegida (control) (**Figuras 3b y 3f**). Los núcleos positivos para DPC se distribuyeron en todo el grosor de la epidermis, con una mayor proporción de núcleos teñidos con DPC en la capa basal. La aplicación del tratamiento con vehículo no previno la aparición de células positivas para DPC (**Figuras 3c y 3g**). Aunque el número de células teñidas para DPC es ligeramente mayor en el tejido no protegido (**Figuras 3b, 3f, 3c y 3g**) en comparación con el tejido protegido con extracto (**Figuras 3d, 3h, 3e y 3i**), la prevención de la formación de DPC no fue significativa.

50

Los inventores también midieron la frecuencia de los DPC utilizando electroforesis en gel neutro con glioxal. Los efectos de los UVB en la frecuencia global de los DPC en la epidermis de la EHS se muestran en la **Figura 4**, donde los fragmentos de ADN de bajo peso molecular indican el daño inducido por UVB. El análisis de la distribución de la movilidad de los fragmentos de ADN mostró que estaban presentes fragmentos de ADN mucho más pequeños en todos los tejidos tratados. Después de la exposición a 10 kJ/m² de UVB, según lo revelan las manchas de ADN, las composiciones que comprendían las dos concentraciones de extracto previnieron ligeramente el daño del ADN durante la irradiación, aunque no se observó protección por el extracto a una irradiación de 25 kJ/m².

55

- 60 Estos resultados indican que el extracto a ambas concentraciones (0,01 % y 0,1 %) no protegió significativamente las células de la EHS contra el daño del ADN inducido por la radiación con UVB a 10 y 25 kJ/m².

Eficacia del extracto contra el daño celular de la EHS inducido por los UVA.

- 65 Los inventores también midieron los efectos de los UVA en la frecuencia de los DPC utilizando electroforesis en gel neutro con glioxal. Los resultados obtenidos de la electroforesis en gel neutro con glioxal de ADN digerido con Fpg y

endo III (**Figura 5**) no demostraron de forma concluyente una eficacia significativa del extracto a ninguna concentración en la protección de células de la EHS contra el daño del ADN durante la irradiación con UVA a 250 y 750 kJ/m².

USO DEL EXTRACTO MÁS FILTRO SOLAR

Los parámetros histológicos evaluados indican que la adición del extracto al filtro solar (PS) no reduce el efecto protector del filtro solar contra los rayos UVA y UVB, y no tiene un efecto fotosensible sobre el tejido de la EHS. Pero la adición del extracto a un filtro solar comercial demuestra un aumento sorprendentemente significativo en la protección contra el daño del ADN por rayos UVA y UVB, en comparación con el filtro solar solo.

Los resultados demuestran una sinergia entre el filtro solar comercial y el extracto: la adición del extracto al filtro solar aumenta significativamente la protección del ADN celular contra el daño inducido por los UVB y mejora significativamente su capacidad protectora contra el daño fotooxidativo inducido por los UVA. En general, la adición del extracto al filtro solar protegió significativamente contra el daño del ADN inducido por los UVA.

Eficacia del extracto más filtro solar (PS-extracto) contra el daño tisular de EHS inducido por los UVB

Como se muestra en la **Figura 6**, la exposición a UVB a 25 kJ/m² induce desorganización tisular. Los distintos estratos (germinativo, granuloso, espinoso y córneo) de la EHS expuestos a UVB fueron menos distinguibles entre sí en comparación con los tejidos no expuestos a UVB. Morfológicamente, los queratinocitos diferenciados (células grandes con núcleos tenues, citoplasma grande y presencia de vacuolas) presentes en los tejidos irradiados confirmaron el efecto dañino de los UVB (a 25 kJ/m²). Las **figuras 6f, 6g y 6h** ilustran que los efectos de la exposición a UVB se previnieron mediante filtro solar solo y mediante la mezcla de FS-extracto. De hecho, las distintas capas epidérmicas de la EHS protegida permanecieron visibles (**Figuras 6g y 6h**) para ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %) mezcladas con el filtro solar. En tejidos no irradiados, la mezcla de FS-extracto de no indujo cambios estructurales en los tejidos técnicamente diseñados (**Figuras 6c y 6d**).

Eficacia de FS-extracto contra el daño tisular de EHS inducido por los UVA

Los resultados presentados en la **Figura 7** muestran que la exposición de tejidos no protegidos a 750 kJ/m² de UVA induce desorganización tisular. En los tejidos irradiados, no hubo diferenciación de estratos (germinativo, granuloso, espinoso y córneo) presente en el tejido no protegido (**Figura 7a**), excepto el estrato córneo. El estrato córneo era muy grueso, lo que confirmó la necrosis celular y tisular debida a la irradiación con UVA. El examen de la **Figuras 7g y 7h** revela que los efectos de la exposición a UVA se previnieron mediante filtro solar solo y mediante la mezcla de FS-extracto. De hecho, las distintas capas epidérmicas de la EHS protegida permanecieron visibles (**Figuras 7f, 7g y 7h**) para ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %) mezcladas con el filtro solar. En tejidos no irradiados, la mezcla de FS-extracto de no indujo cambios estructurales en los tejidos técnicamente diseñados (**Figuras 7c y 7d**).

Eficacia de FS-extracto contra el daño del ADN de EHS inducido por los UVB

Usando micrografía de inmunofluorescencia, los inventores también evaluaron el efecto de FS-extracto en la formación y distribución de DPC después de la exposición a UVB. Como se muestra en la **Figura 8**, la exposición a UVB (25 kJ/m²) indujo DPC en las células epidérmicas en la EHS no protegida (control) (**Figura 8e**). Los núcleos positivos para DPC se distribuyeron en todo el grosor de la epidermis, con una mayor proporción de núcleos teñidos con DPC en la capa basal. La aplicación de filtro solar y FS-extracto a ambas concentraciones (0,01 % y 0,1 %) previno la formación de DPC en las células irradiadas. Para evaluar el efecto sinérgico entre el extracto y el filtro solar, se realizó una evaluación utilizando electroforesis en gel neutro con glioxal. Los efectos de los UVB (25 kJ/m²) en la frecuencia global de los DPC en la epidermis de la EHS se muestran en la **Figura 9**. El análisis de la distribución de la movilidad de los fragmentos de ADN demostró que estaban significativamente presentes fragmentos de ADN mucho más pequeños en la EHS no protegida y en la protegida con filtro solar. Sin embargo, cuando los tejidos se protegieron con una mezcla de FS-extracto (0,01 % y 0,1 %) y se expusieron a UVB, hubo una reducción significativa de la frecuencia de DPC, según se juzgó por la presencia de manchas de ADN a alto peso molecular.

Eficacia de FS-extracto contra el daño del ADN de EHS inducido por los UVA

Dado que se sabe que la irradiación con UVA produce una cantidad significativa de daño fotooxidativo, se realizó una evaluación utilizando electroforesis en gel neutro con glioxal con ADN digerido con Fpg y endo III. El análisis de la distribución de la movilidad de los fragmentos de ADN mostró que estaban significativamente presentes fragmentos de ADN mucho más pequeños en los tejidos no protegidos (**Figura 10**). En el tejido protegido con filtro solar solo, se previno el daño fotooxidativo según se juzga por la ubicación de la mancha de ADN a alto peso molecular. En tejido protegido con FS-extracto (0,01 %), la mancha de ADN estuvo presente esencialmente a un peso molecular más alto, en comparación con los tejidos no protegidos y protegidos con filtro solar.

Estos resultados ilustran que la adición del extracto a la loción de filtro solar mejora significativamente su capacidad protectora contra el daño fotooxidativo inducido por UVA. En general, la adición del extracto al filtro solar protegió significativamente contra el daño del ADN inducido por los UVA.

USO DEL EXTRACTO PARA REPARAR EL DAÑO TISULAR Y DEL ADN INDUCIDO POR UV

Las composiciones que comprendían ambas concentraciones del extracto (0,01 % y 0,1 %) demostraron mejoras obvias en la reparación del daño estructural y del ADN de la EHS inducido tanto por UVB como por UVA. Los inventores han demostrado que el extracto repara el daño tisular inducido por los UVB, estimula muy significativamente la reparación de los DPC inducidos por los UVB y estimula la reparación del daño fotooxidativo del ADN inducido por los UVA.

Eficacia del extracto en la reparación del daño tisular de EHS inducido por los UVB.

Como se muestra en la **Figura 11**, la desorganización tisular inducida por la exposición a 150 J/m² de UVB no se reparó 3 horas después de la irradiación. Los distintos estratos (germinativo, granuloso, espinoso y córneo) de la EHS expuesta a los UVB no fueron fácilmente distinguibles entre sí y revelaron una ausencia completa de la capa basal. Esto sugirió que las células en este tejido irradiado estaban altamente afectadas por la irradiación con UVB y no podían reparar el daño inducido por los UVB. Lo mismo puede decirse de los tejidos tratados con vehículo, que revelaron queratinocitos diferenciados (células grandes con núcleos tenues, citoplasma grande y presencia de vacuolas). La **Figura 11** demuestra que todos los efectos secundarios de los UVB se repararon en los tejidos tratados con composiciones que comprendían el extracto. De hecho, las distintas capas epidérmicas de la EHS protegida permanecieron visibles para ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %).

Eficacia del extracto en la reparación del daño tisular de EHS inducido por los UVA.

La **Figura 12** ilustra que la desorganización tisular por exposición a 250 kJ/m² de UVA en tejidos no protegidos (control) y protegidos con vehículo no se reparó 3 horas después, como demuestra la ausencia de la capa basal y el engrosamiento del estrato córneo. El daño inducido por UVA se reparó en tejidos tratados con las composiciones que comprendían ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %), específicamente en la capa basal. Estos análisis histológicos sugieren que el extracto estimula el proceso de reparación en tejidos dañados por UVA.

Eficacia del extracto en la reparación del daño del ADN de EHS inducido por los UVB.

Usando micrografía de inmunofluorescencia, se evaluó el efecto del extracto sobre la reparación de DPC inducidos por UVB. Como se muestra en la **Figura 13**, el número de células positivas para DPC fue muy alto en el tejido no protegido en comparación con los tejidos tratados con vehículo. A la inversa, no hubo células positivas para DPC después de las tres horas de incubación en los tejidos tratados con composiciones que comprendían ambas concentraciones de extracto (0,01 % y 0,1 %), indicando una reparación significativamente alta (total) de los DPC inducidos por UVB. El efecto del extracto sobre el proceso de reparación de DPC se confirmó mediante análisis por electroforesis en gel neutro con glioxal. De hecho, la **Figura 14** revela que la mancha de ADN de los tejidos tratados con extracto se localizó en un peso molecular alto, en comparación con el tejido no tratado (control) y tratado con vehículo.

Eficacia del extracto en la reparación del daño celular de EHS inducido por los UVA.

La eficacia de la reparación del extracto también se evaluó frente a la irradiación con UVA utilizando electroforesis en gel neutro con glioxal de ADN digerido con Fpg y endo III. Como se muestra en la **Figura 15**, el análisis de la distribución de la movilidad de los fragmentos de ADN reveló fragmentos de ADN mucho más pequeños en los tejidos no tratado (control) y tratado con vehículo que en la EHS tratada con extracto. De hecho, en el tejido protegido con composiciones que comprenden el extracto (0,01 % y 0,1 %), la mancha de ADN estaba esencialmente presente en un peso molecular más alto.

EFICACIA COSMÉTICA (HIDRATACIÓN, ELASTICIDAD Y EFECTOS ANTIPERFILOMETRÍA) (no de la invención)

Se desarrollaron composiciones cosméticas que comprendían tres concentraciones distintas del extracto (0,01 %, 0,015 % y 0,02 %) y se compararon con cremas cosméticas disponibles en el mercado. Los parámetros utilizados fueron la hidratación, la elasticidad y los efectos antiperfilometría sobre la piel.

Los datos de hidratación, obtenidos en la frente, la sien, el área debajo de los ojos, las mejillas y el área de la barbilla de cada sujeto, en el día 1, el día 7 y el día 28, se proporcionan en la **Figura 16**. Las mejoras fueron significativas frente al día 0 en los tres puntos de medición para el Grupo A y el Grupo B, y en el Día 28 para el Grupo C. La composición cosmética se asoció con el nivel más alto de hidratación de la piel estadísticamente significativo del 17 % (frente al 15 % y al 6 %) en el día 28.

La **Figura 17** ilustra la evolución de la Ue, que representa la inmediata extensibilidad o facilidad de deformación de la piel. Una reducción de la Ue significa una mejora en la firmeza, medida por la resistencia de la piel a la deformación. El parámetro Ue se redujo a lo largo del tiempo para el grupo de tratamiento A del 5 % en el día 1, del 7 % en el día 7 y del 26 % en el día 28. La reducción en el día 1 y el día 7 fue significativa con $p < 0,05$, mientras que la reducción en el día 28 fue significativa a $p < 0,01$. Los grupos de tratamiento B y C también demostraron reducciones del parámetro

Ue, especialmente del 27 % para el grupo B y del 26 % para el grupo C en el día 28. Estas reducciones fueron estadísticamente significativas a $p < 0,01$.

5 La **Figura 18** ilustra la evolución de la Uf, que representa la amplitud máxima o la deformación de la piel, un parámetro que aumenta con la edad. El grupo de tratamiento A demostró una disminución significativa (a $p < 0,05$) de la deformación máxima, del -5 % en el día 1 frente a los grupos de tratamiento B y C, que no vieron una mejora en este parámetro de elasticidad en el mismo momento de la medición. En el día 7, la deformación máxima de la piel mejoró significativamente (a $p < 0,05$) en el grupo de tratamiento A y el grupo de tratamiento B (6 % frente al 8 %), mientras que la mejora observada con el grupo C de tratamiento no fue estadísticamente significativa. En el día 28, los tres grupos de tratamiento demostraron una mejora de la deformación máxima de la piel de la siguiente manera: del 25 % para el grupo A, del 28 % para el grupo B y del 27 % para el grupo C. Estas mejoras fueron estadísticamente significativas a $p < 0,01$.

15 La fatigabilidad de la piel es un parámetro que generalmente aumenta con la edad. Como se observa en la **Figura 19**, no se observaron cambios significativos debido a los tratamientos para los Grupos A, B y C para la fatigabilidad de la piel en el día 1 y el día 7. Sin embargo, en el día 28, se observó una disminución de la fatigabilidad de la piel para los tres grupos de tratamiento, pero solo la mejora observada en el grupo de tratamiento A fue estadísticamente significativa (a $p < 0,05$).

20 Ur/Ue representa la elasticidad o firmeza neta, que disminuye con la edad y se considera el parámetro más importante en el estudio de la elasticidad de la piel. En los días 1 y 7, como se muestra en la **Figura 20**, no se observaron cambios significativos para este parámetro como resultado de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con la composición cosmética reivindicada demostró un aumento estadísticamente significativo del 5 % en firmeza en el día 28 ($p < 0,05$).

25 Como se muestra en las **Figuras 21, 22 y 23**, la composición cosmética mostró mejoras estadísticamente significativas en los siguientes parámetros de arrugas en comparación con el valor inicial, tan pronto como el día 1 del tratamiento, lo que aumentó en magnitud con el tratamiento y se mantuvo significativo en el día 28: superficie de arrugas -12 % en el día 1 y -17 % en el día 28 ($p < 0,01$, cada uno) (**Figura 21**); longitud total de arrugas -11 % en el día 1 y -13 % en el día 28 ($p < 0,01$, cada uno) (**Figura 22**); y media de la longitud de arrugas -5 % en el día 1 y -11 % en el día 28 ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) (**Figura 23**). También se observó con la composición cosmética una mejora significativa del -7 % ($p < 0,01$) en el número total de arrugas en el día 1, como se observa en la **Figura 24**. Por el contrario, el tratamiento con las otras dos líneas de productos de prestigio mejoró los parámetros de arrugas, pero las mejoras fueron solo del 18 al 47 % de la magnitud de las mejoras observadas para la composición cosmética y no fueron estadísticamente significativas en comparación con el valor inicial.

35 Con respecto a la clase de la arrugas, y como se muestra en las **Figuras 25, 26 y 27**, la composición cosmética redujo no significativamente el número de arrugas de clase 3 (profundas) en el -7 % tan pronto como el día 1 y fue el único tratamiento que produjo una reducción significativa del -13 % ($p < 0,05$) a partir del valor inicial en las arrugas de clase 3 en el día 28 del tratamiento y una reducción significativa del -9 % ($p < 0,01$) en las arrugas de clase 2 (moderadas) en el día 1 de tratamiento.

Las otras dos líneas de productos de prestigio comparativas aumentaron las arrugas clase 3 en el día 28 en +7 % y +5 %, respectivamente.

45 No se observaron resultados significativos en la reducción del número de arrugas de clase 1 (finas) para ninguno de los tres tratamientos. El análisis estadístico de la profundidad de las arrugas no reveló una reducción significativa a lo largo del tiempo para ninguno de los tres tratamientos.

EFECTO SINÉRGICO CON SPILANTHOL (no de la invención)

50 Spilanthol es un extracto de *Acmella oleracea* que se sabe que inhibe las contracciones en los músculos subcutáneos y se usa como un producto antiarrugas. El uso del spilanthol con el extracto celular fotosintético provoca un efecto sinérgico en una composición cosmética antiarrugas.

55 Ejemplo 1

Preparación de piel humana técnicamente diseñada. Los donantes de piel eran mujeres sanas, de 15 a 20 años. Los queratinocitos y los fibroblastos se aislaron de biopsias de piel humana normal no expuestas a rayos UV después de cirugías de reducción mamaria, como se describió anteriormente. Las pieles humanas técnicamente diseñadas (EHS) se produjeron mezclando colágeno de tipo I y tipo III de piel de ternera (2 mg/ml, Sigma) con fibroblastos humanos normales ($1,5 \times 10^6$ células/ml) para producir la dermis. Los tejidos se cultivaron en medio complementado con suero de ternera fetal al 5 % durante 4 días y después se sembraron con queratinocitos ($9 \times 10^4/\text{cm}^2$) para obtener la EHS. Las EHS se cultivaron en condiciones sumergidas durante siete días y después se elevaron a una interfaz de aire-líquido durante cinco días más para permitir la diferenciación de la epidermis en los distintos estratos. Cada serie se realizó utilizando queratinocitos y fibroblastos aislados de la misma biopsia de piel.

Tratamiento con extracto e irradiación con UV. Se analizaron dos concentraciones del extracto (A=0,1 % y B=0,01 %). El vehículo del extracto solo (a la misma concentración encontrada en los tratamientos con extracto) sirvió como el primer control. El tejido normal no tratado sirvió como el segundo control. Se aplicaron volúmenes de 60 μ l de extracto o de su vehículo en sobre el estrato córneo de las EHS 30 min antes de la irradiación. Se analizaron tres condiciones experimentales (no tratadas, tratadas con vehículo o tratadas con extracto). Antes de la irradiación, el medio de cultivo se reemplazó por el medio de irradiación (DME complementado con extracto de hipófisis bovina), sin rojo fenol ni hidrocortisona, para evitar la formación de sustancias tóxicas inducidas por los UV procedentes del medio. Las placas de Petri que contenían las EHS se colocaron en hielo y se descubrieron para permitir la exposición directa de las EHS a los rayos UV. Se usaron tres dosis de UVA (0, 250 y 750 kJ/m²) y tres dosis de UVB (0, 10 y 25 kJ/m²) para irradiar las EHS tratadas y no tratadas. La fuente de UVA fue una luz de neón BLB de 45 cm (número BL-18, UV de 15 W, Ateliers Albert Inc., Montreal, QC) con un espectro de emisión que contenía un pico a aproximadamente 360 nm. La fuente de UVB fue una lámpara FS20T12/UVB/BP (Philips, Somerset, NJ) con un espectro de emisión que contenía un pico a aproximadamente entre 290 y 320 nm. Todas las dosis administradas se controlaron utilizando un radiómetro YSI Kettering 65A (Yellow Spring Instruments, OH).

Análisis histológicos e inmunohistoquímicos después de la exposición a los UV. Inmediatamente después de la irradiación, se tomaron biopsias de cada EHS. Se fijaron con solución de Bouin y después se incluyeron en parafina o se incluyeron directamente a las temperaturas de corte óptimas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se tiñeron con tricómico de Masson cortes finos (4 μ m) de las biopsias incluidas en parafina para evaluar la estructura del tejido, como se describe en otra parte. Para la evaluación de DPC, solo se utilizaron tejidos irradiados con UVB. Con este fin, se incubaron cortes finos de criostato (4 μ m) de biopsias congeladas irradiadas con UVB durante 45 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para DPC (Biomedical Technologies, Stoughton, CA). El anticuerpo para DPC reacciona de forma específica con los dímeros de timidina inducidos por UV en ADN bicatenario o monocatenario. Después, se incubaron los cortes con inmunoglobulina de cabra antirratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Chemicon, Temecula, Calif), diluida 1:100, durante 30 min a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron extensamente con solución salina tamponada con fosfato entre las incubaciones. Se montaron con cubreobjetos en medio de montaje de glicerol al 50 % y se observaron utilizando microscopía de epifluorescencia y se fotografiaron.

Análisis moleculares después de la exposición a la radiación de UV solar. Inmediatamente después de la irradiación, se aislaron células epidérmicas como se describe anteriormente. Después de la homogeneización, las células se centrifugaron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 2 ml de NaCl 0,15 M; EDTA 0,005 M, pH 7,8 y 2 ml de Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0; NaCl 0,02 M; EDTA 0,02 M pH 7,8; SDS al 1 %. El ADN se purificó como se describe anteriormente y se utilizó para evaluar la frecuencia global de los fotoproductos de DPC, que son específicos para la radiación con UVB, y el daño fotooxidativo que es específico para la radiación con UVA.

Para escindir específicamente los DPC, se disolvieron 10 μ g de ADN irradiado con UV en 50 μ l de H₂O. Se añadió la siguiente solución a cada muestra de ADN: 50 μ l de una solución que contiene 10 μ l de tampón doble 10x (doble tampón 10x: Tris-HCl 500 mM a pH 7,6, NaCl 500 mM y EDTA 10 mM), 0,1 μ l de DTT 1 M, 2 μ l de BSA 5 mg/ml, una cantidad saturante de endonucleasa T₄ tipo V, y se completó con H₂O hasta un volumen final de 50 μ l. La reacción se realizó a 37 °C durante 1 h. Para escindir específicamente el daño fotooxidativo, se disolvieron 10 μ g de ADN irradiado con UV en 50 μ l de agua y 50 μ l de tampón de proteína Nth 2x (tris-HCl 100 mM pH 7,6, KCl 200 mM, EDTA 2 mM, ditiotreitól 0,2 mM, seroalbúmina bovina 200 μ g/ml). Se añadieron las enzimas (nth y fpg) a 5 μ l de tampón de dilución (tris-HCl 50 mM pH 7,6, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 0,1 mM, seroalbúmina bovina 500 μ g/ml, glicerol al 10 % (v/v)), el volumen de digestión total fue de 105 μ l. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 60 min. Después de la precipitación con etanol, el ADN digerido se resuspendió a una concentración final de 1 μ g/ μ l.

La frecuencia global para cada clase de fotoproducto se determinó con electroforesis en gel de agarosa neutro de ADN genómico desnaturalizado con glioxal/dimetilsulfóxido, como se describió anteriormente. Brevemente, 5 μ g/10 μ l de ADN tratado se disolvieron en agua destilada y se añadieron 2 μ l de fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0, 3,5 μ l de glioxal 6 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 10 μ l de dimetilsulfóxido. Las muestras de ADN se incubaron a 50 °C durante 1 h. Antes de la carga, se añadieron 3,8 μ l de tampón de carga (fosfato sódico 10 mM, pH 7,0; glicerol al 50 %; xileno cianol FF al 0,25 %). Los geles se procesaron en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, tampón de corrida a 3-4 voltios/cm con circulación de tampón constante. Los geles se tiñeron durante 2 h en una solución de tinción de gel de ácidos nucleicos SYBR® Gold 1 X (S-11494) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) en TAE pH 8,0 y se fotografiaron. La frecuencia total de aductos se estimó después de la conversión enzimática de fotoproductos de ADN a roturas monocatenarias. La migración de los fragmentos de ADN a través del gel de agarosa permite su separación de acuerdo con su peso molecular - cuanto más pequeño es el fragmento, mayor es la distancia de migración. Willis *et al.* han demostrado que cuando una molécula de ADN escindida aleatoriamente se fracciona en gel, la movilidad de cada fragmento es proporcional al logaritmo del peso molecular en la mitad del intervalo de movilidad. Por lo tanto, es posible calcular la masa aproximada de cada mancha de ADN estimando el peso molecular en la intensidad más alta del colorante de tinción de ADN. Los números obtenidos se dividieron por 2 (dado que cada fragmento contiene un fotoproducto en cada extremo) y se expresaron como número de lesiones por megabase (Mb).

65 Ejemplo 2

Preparación de piel humana técnicamente diseñada. Los donantes de piel eran mujeres sanas, de 15 a 20 años. Los queratinocitos y los fibroblastos se aislaron de biopsias de piel humana normal no expuestas a rayos UV después de cirugías de reducción mamaria, como se describió anteriormente. Las pieles humanas técnicamente diseñadas se produjeron como se describe anteriormente.

5 **Tratamiento con filtro solar más extracto e irradiación con UV.** Se mezclaron dos concentraciones del extracto v/v (0,01 % y 0,1 %) por separado con filtro solar de FPS 15 (FS). Después de mezclar con el extracto (0,01 % y 0,1 %), el filtro solar obtenido tenía un FPS de 7,5. El vehículo (filtro solar con un FPS de 7,5) sirvió como control. El tejido normal no protegido sirvió como un segundo control. Se aplicaron volúmenes de 60 µl de FS-extracto o de FS-vehículo sobre el estrato córneo de las EHS durante 30 minutos antes de la irradiación. Los procedimientos de irradiación son los mismos que los descritos anteriormente. Se usaron dos dosis de UVA (0 y 750 kJ/m²) y dos dosis de UVB (0 y 25 kJ/m²) para irradiar las EHS protegidas y no protegidas.

15 **Análisis histológicos e inmunohistoquímicos después de la exposición a los UV.** Inmediatamente después de la irradiación, se tomaron biopsias de cada EHS. Se fijaron con solución de Bouin y se incluyeron en parafina o se incluyeron directamente a la temperatura de corte óptima, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los análisis histológicos (tinción tricrómica de Masson) e inmunofluorescencia (los DPC) se realizaron como se describe anteriormente. Para la evaluación de DPC, solo se utilizó tejido irradiado con UVB.

20 **Análisis moleculares después de la exposición a UV.** Inmediatamente después de la irradiación, se aislaron las células epidérmicas y se usaron para extraer ADN. El ADN purificado se utilizó para evaluar la frecuencia global de los fotoproductos de DPC, que son específicos para la radiación con UVB, y el daño fotooxidativo que es específico para la radiación con UVA. Con este fin, los inventores utilizaron las distintas etapas descritas anteriormente.

25 Ejemplo 3

Preparación de piel humana técnicamente diseñada. Los donantes de piel eran mujeres sanas, de 15 a 20 años. Los queratinocitos y los fibroblastos se aislaron de biopsias de piel humana normal no expuestas a rayos UV después de cirugías de reducción mamaria, como se describió anteriormente. Las pieles humanas técnicamente diseñadas se produjeron como se describe anteriormente.

30 **Exposición de los tejidos a los UV seguido del tratamiento con el extracto.** Después de su producción, la EHS se expuso a fuentes de ultravioleta (UVA o UVB). Se usó una dosis (250 kJ/m²) de UVA y una dosis (150 J/m²) de UVB para irradiar la EHS desprotegida. Los procedimientos de irradiación son los mismos que los descritos anteriormente en la sección 1.2. Inmediatamente después de la irradiación, los tejidos se trataron con el extracto. Se aplicaron volúmenes de 60 µl del extracto o de su vehículo sobre el estrato córneo de las EHS durante 3 horas antes del análisis.

40 **Análisis histológicos e inmunohistoquímicos.** Después del período de incubación, se tomaron biopsias de cada EHS. Se fijaron con solución de Bouin y se incluyeron en parafina o se incluyeron directamente a la temperatura de corte óptima, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los análisis histológicos (tinción tricrómica de Masson) e inmunofluorescencia (los DPC) se realizaron como se describe anteriormente. Para la evaluación de DPC, solo se utilizaron tejidos irradiados con UVB.

45 **Análisis moleculares después de la exposición a UV.** Después del período de incubación, se aislaron las células epidérmicas y se usaron para extraer ADN. El ADN purificado se utilizó para evaluar la frecuencia global de los fotoproductos de DPC, que son específicos para la radiación con UVB, y el daño fotooxidativo que es específico para la radiación con UVA.

50 Ejemplo 4 (no de la invención)

En un estudio comparativo de eficacia cosmética (diseño en grupos paralelos, con enmascaramiento único, monocéntrico) de 72 voluntarias sanas de 35 a 72 años (edad media 54,6 años), la eficacia de la presente composición cosmética se comparó con la de dos de las principales marcas comerciales de productos antienvjecimiento durante un período de uso de 28 días. Los parámetros de eficacia incluyeron: el efecto sobre el aspecto de la piel, la hidratación, la elasticidad y la perfilometría (efecto antiarrugas).

60 A cada voluntario se le proporcionaron tres formulaciones de la presente composición cosmética, que comprendían extracto al 0,01 %, al 0,015 % y al 0,02 %, en combinación con ingredientes no activos, junto con instrucciones de aplicación, para usarse durante un periodo de 28 días. Las mediciones se hicieron en el día 0, el día 1, el día 7 y el día 28. La hidratación se evaluó utilizando un Corneometer®, la elasticidad se evaluó utilizando un Cutometer® y las mediciones de perfilometría se hicieron de réplicas de silicona de las zonas del contorno de los ojos utilizando el sistema de imágenes Visia-CR. La verificación del uso del producto se determinó pesando las muestras del producto.

65 En la primera visita (día 0 o D0), los voluntarios recibieron al azar los envases de uno de los tres tratamientos de prueba (crema de día, loción para los ojos y crema de noche), una hoja de seguimiento que debía completarse después

de cada aplicación y un cuestionario de autoevaluación a completar después de 28 días de tratamiento.

Los voluntarios recibieron instrucciones de aplicar, cada mañana, después de haberse lavado la cara y las manos (con sus productos de limpieza habituales) una cantidad suficiente de loción para ojos para cubrir el área del contorno de ojos, incluida la zona de patas de gallo de su rostro. Después de que la loción para ojos hubiera penetrado bien, los voluntarios tuvieron que aplicar la crema de día, en cantidades suficientes para cubrir toda la cara, evitando el contorno de los ojos.

Adicionalmente, los voluntarios recibieron instrucciones de aplicar, cada noche, suficiente crema de noche como para cubrir toda la cara, evitando el contorno de los ojos.

Durante el estudio se prohibió el uso de todos los demás productos para el cuidado de la piel (excepto los productos de limpieza y maquillaje habituales). No se permitieron cambios con respecto a la marca de su limpiador facial o productos de maquillaje habituales durante la semana anterior al comienzo del estudio ni durante el estudio.

En el día 0, se tomaron doce fotografías digitales de la cara (frente completo, perfil derecho y perfil izquierdo, en cuatro modos de obtención de imágenes distintos: convencional, polarización cruzada, por UV y polarización paralela), utilizando el sistema de obtención de imágenes Visia-CR. Posteriormente, el estudio se realizó en una sala de laboratorio con temperatura controlada ($22\text{ °C} \pm 3$) y humedad relativa ($30\% \pm 5$). Después de 15 minutos de estabilización en la sala controlada, se hicieron mediciones de la hidratación utilizando Corneometer®, mediciones de la elasticidad utilizando Cutometer® y de la perfilometría con impresiones en silicona de las zonas del contorno de ojos antes del tratamiento.

Las mediciones tomadas en el D0 se repitieron en el D1, el D7 y el D28, del mismo modo descrito anteriormente. En el D1, D7 y D28, los voluntarios tuvieron que devolver sus cuadernos de seguimiento diarios cumplimentados. También debían devolver al laboratorio los envases de muestra con la parte no utilizada de los productos de prueba. La parte no utilizada de los envases de muestra y los cuadernos de seguimiento diarios (diarios de uso) se destinaron a verificar el cumplimiento del protocolo de los voluntarios.

Hidratación. La humedad epidérmica del estrato córneo se puede evaluar mediante métodos de análisis instrumentales *in vivo* no invasivos basados en las propiedades eléctricas de la piel, la capacitancia eléctrica. El estrato córneo es un cuerpo dieléctrico y todos los cambios en su estado de hidratación se reflejan en los cambios en la capacitancia eléctrica, expresados en unidades arbitrarias por el Corneometer®.

Elasticidad. El aspecto de la piel está relacionado con y está altamente afectado por sus propiedades elásticas. La elasticidad de la piel está sujeta a cambios con el uso de productos cosméticos. Los cambios en las propiedades mecánicas y viscoelásticas de la piel reflejan la elasticidad de la piel. Los parámetros relacionados con la elasticidad se midieron mediante Cutometer® SEM 575 (Courage y Khazaka, Alemania). El instrumento está equipado con una sonda (apertura de 2 mm de diámetro) que incluye una succión controlada (vacío de 40 kPa) de la piel con cuatro repeticiones de 1 segundo. Se hicieron dos mediciones desde la mitad de cada mejilla.

Los resultados en cada sitio de medición se expresan como los siguientes parámetros:

- U_e = "extensibilidad" o "deformación elástica inmediata" debida a la aplicación de vacío
- U_f = "amplitud total" o "amplitud máxima" de la piel ($U_e + U_v$)
- U_r = "tonicidad"
- U_r/U_e = "elasticidad neta" o "elasticidad pura" o firmeza

Por último, después de aspiraciones, el Cutometer® proporciona una medida de la "fatigabilidad" de la piel.

Efecto antiarrugas. Las impresiones (negativos de la superficie de la piel) de las zonas del contorno del ojo se obtuvieron aplicando polímero de silicona sobre el área de "patas de gallo" de la zona del contorno del ojo, mientras el voluntario mantenía una posición erguida pero sentado. El polímero de silicona utilizado para este estudio consistió en Silflo® (material de impresión dental de silicona de Flexico-Developments Ltd., Potters Bar, Inglaterra).

Las impresiones de las patas de gallo se analizaron mediante un sistema de procesamiento de imágenes digital informatizado acoplado al programa informático Quantirides® (diseñado por Monoderm, Mónaco) para obtener la topografía de la piel. Esta técnica tradicional se basa en la medición de las sombras proyectadas cuando se inclina una luz incidente a un ángulo de 35° sobre la réplica.

Los parámetros analizados fueron el área total de la piel arrugada, el número y la media de la profundidad de las depresiones debidas al relieve cutáneo y la profundidad de las arrugas medias y profundas. Las arrugas se diferenciaron por la profundidad (clase 1 para $0-55\ \mu\text{m}$; clase 2 para $55-100\ \mu\text{m}$ y clase 3 para $110-800\ \mu\text{m}$), antes y después del tratamiento para demostrar mejor la eficacia de un producto dado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición cosmética tópica que comprende: una cantidad eficaz de un extracto celular fotosintético, en donde el extracto comprende tilacoides funcionales, en combinación con otro filtro solar y un transportador aceptable, en donde la cantidad eficaz del extracto es aproximadamente del 0,01 % a aproximadamente el 0,1 % basándose en el peso total de la composición, para su uso para proporcionar protección prolongada a la piel contra el daño oxidativo inducido por la radiación ultravioleta (UV).
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el transportador se selecciona del grupo que consiste en grasas, emulsionantes, coemulsionantes, agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, principios activos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, filtros hidrófilos y lipófilos, colorantes, neutralizantes, agentes de propenetración y polímeros.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el extracto no está liofilizado y se formula en una composición líquida.
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el extracto es un extracto liofilizado reconstituido en agua, en solución salina fisiológica o cualquier otra solución compatible con la administración tópica, en propilenglicol o en una composición sólida.
- 25 5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende adicionalmente la mejora del aspecto estético de la piel, seleccionándose dicha mejora del grupo que consiste en: la disminución del número y la profundidad de las arrugas en la piel, el aumento de la elasticidad de la piel, el aumento de la hidratación de la piel y una combinación de los mismos.
- 30 6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende adicionalmente el tratamiento de la piel dañada por radiación ultravioleta (UV).
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la radiación UV es radiación UVA o UVB.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el daño oxidativo es peroxidación lipídica, hemólisis de eritrocitos o daño del ADN.

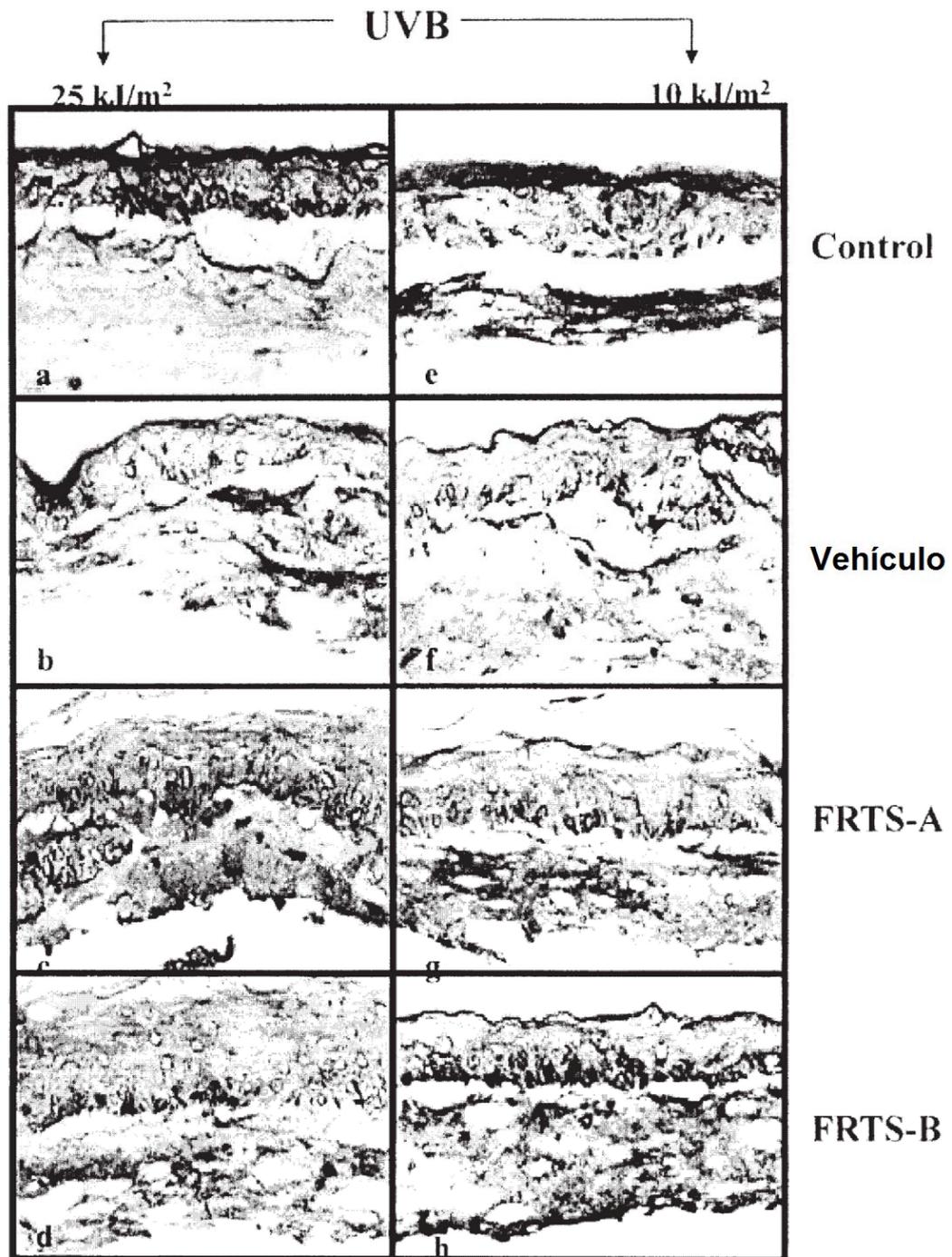


Figura 1

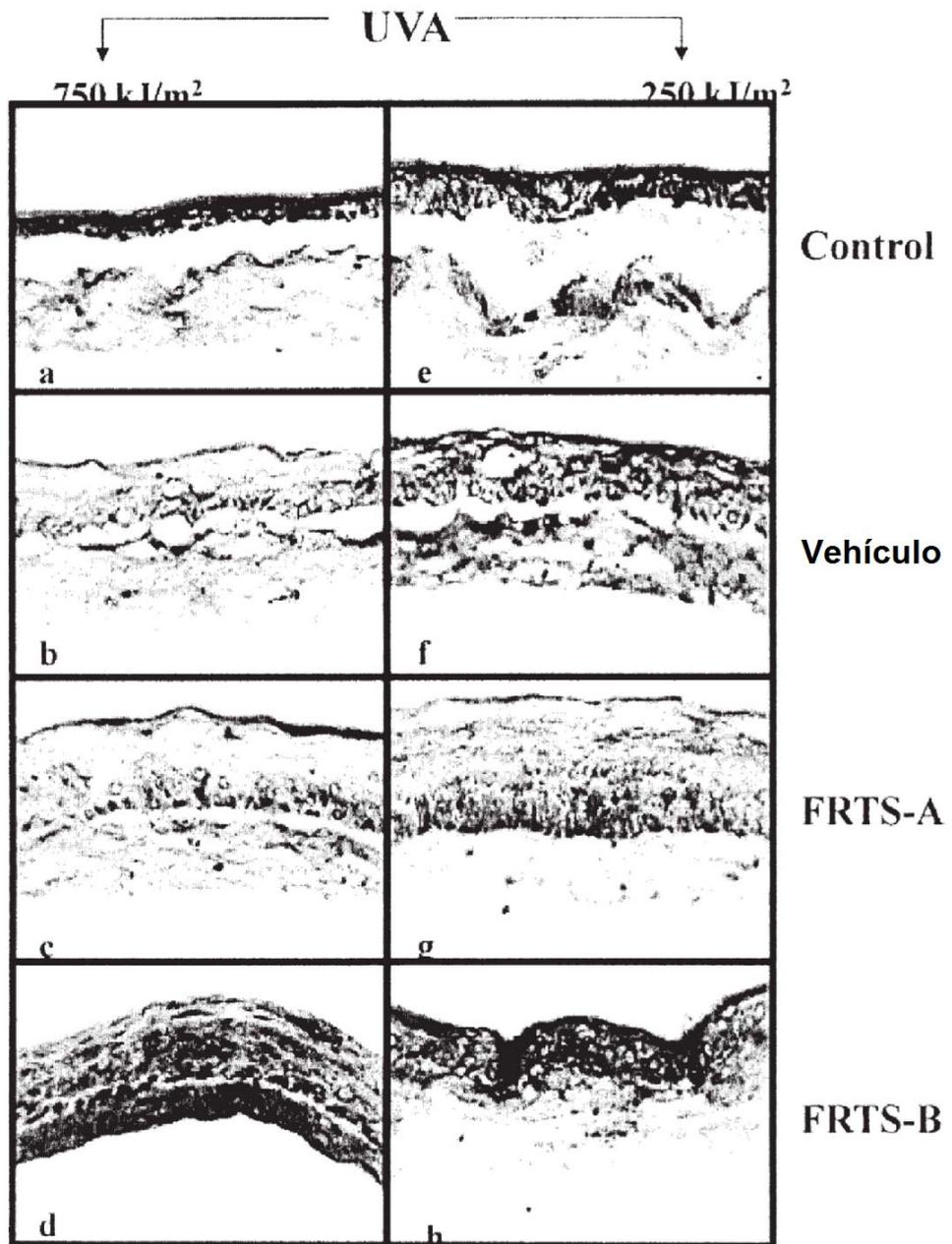


Figura 2

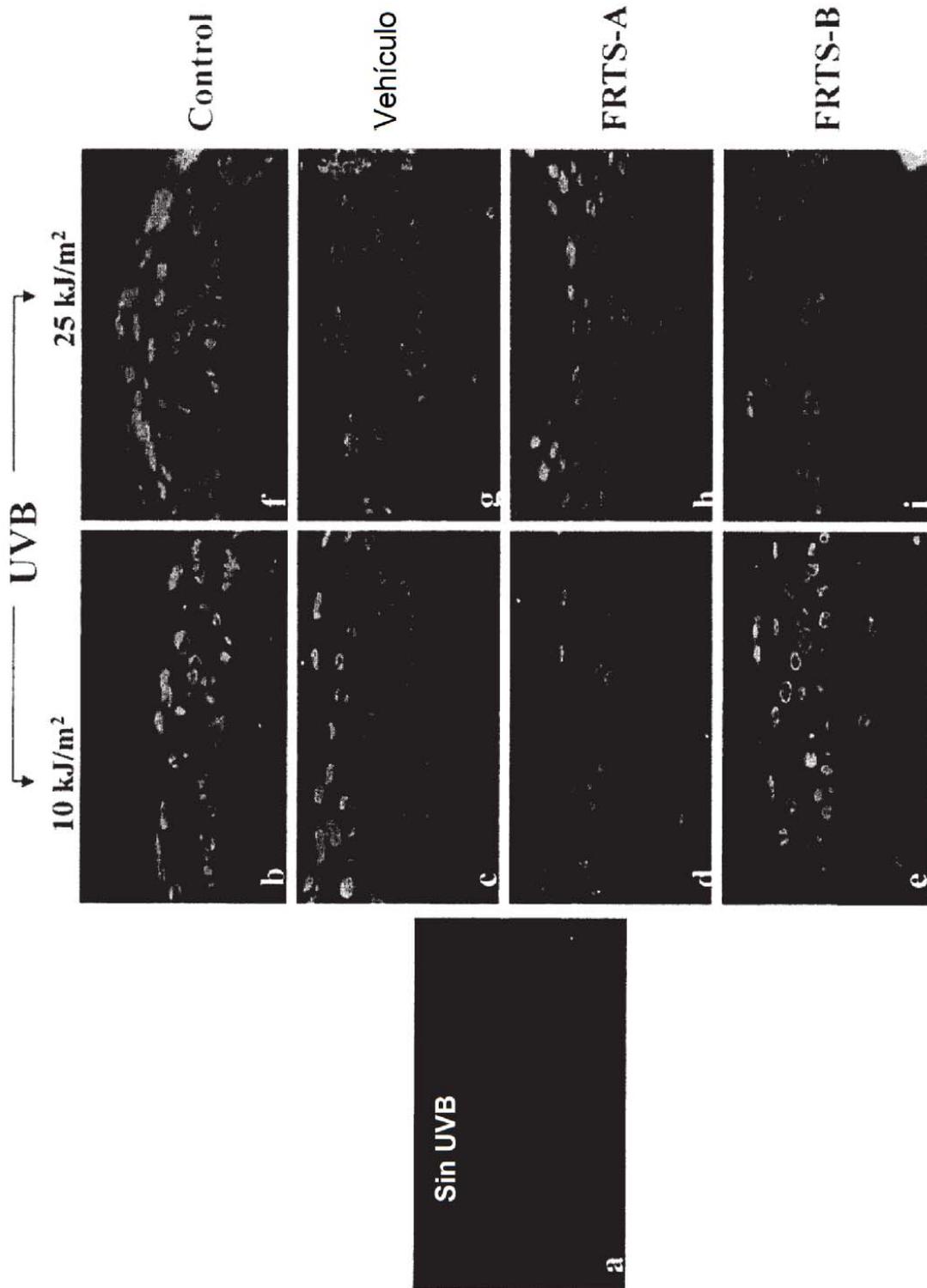


Figura 3

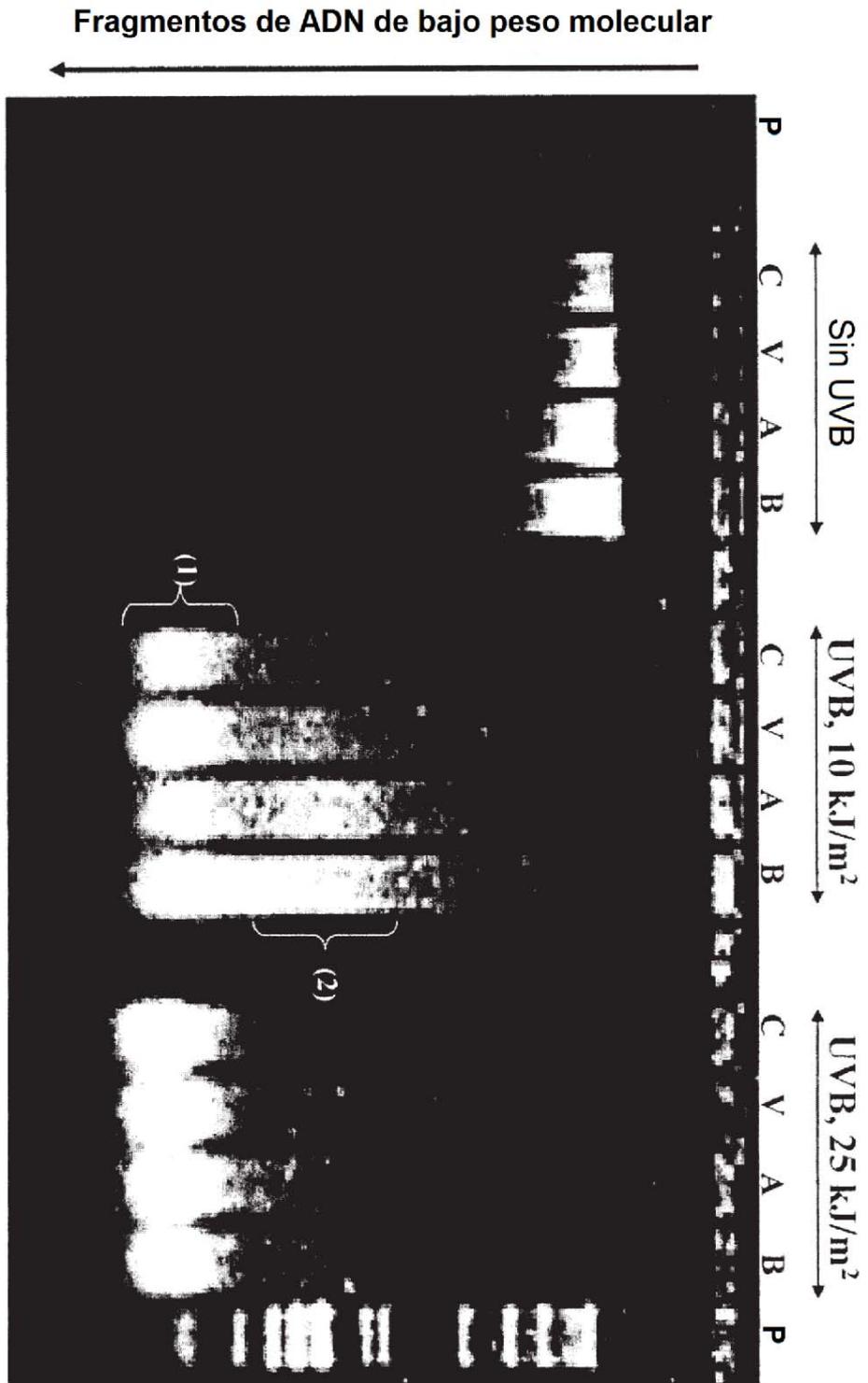


Figura 4

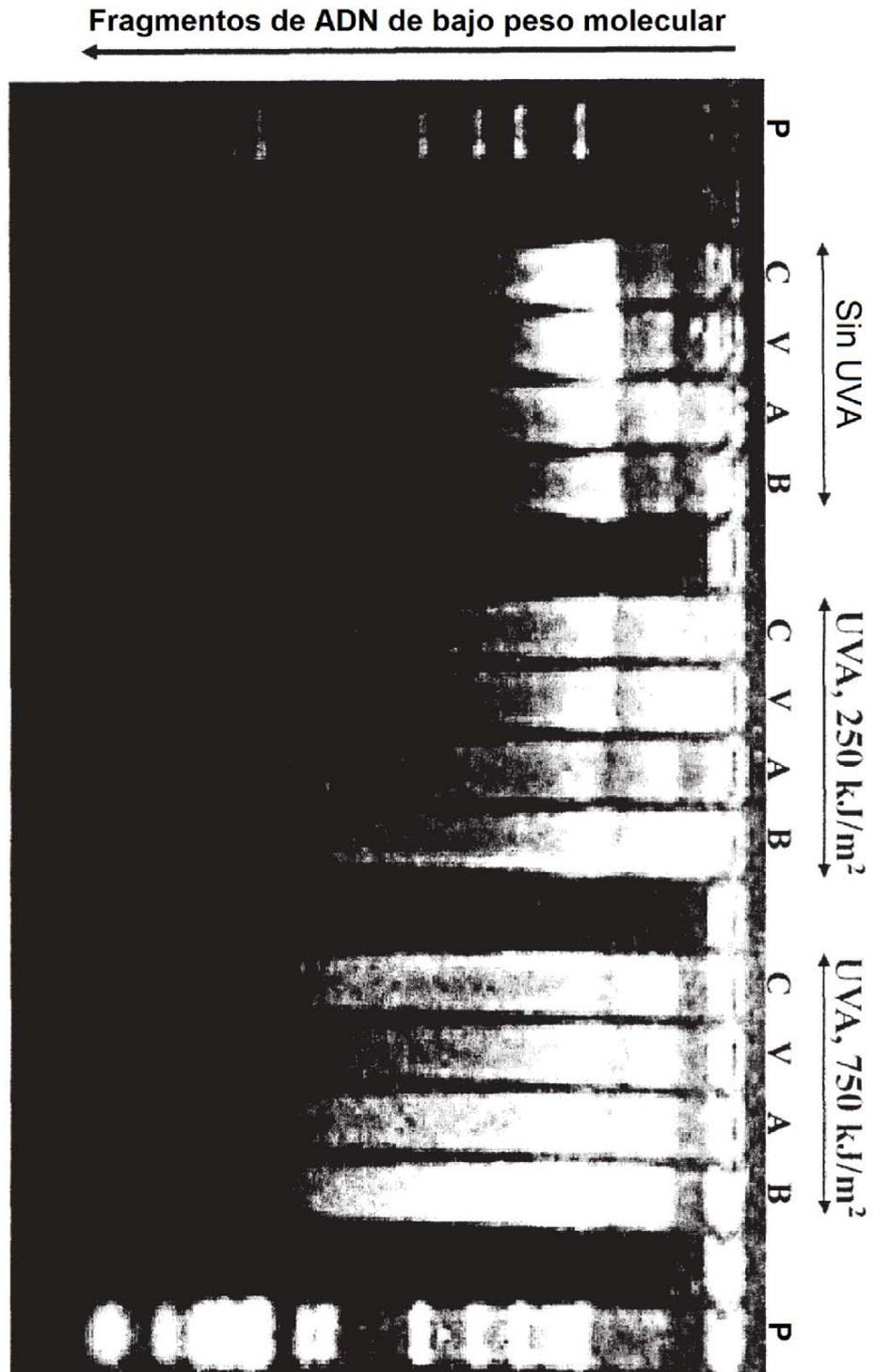


Figura 5

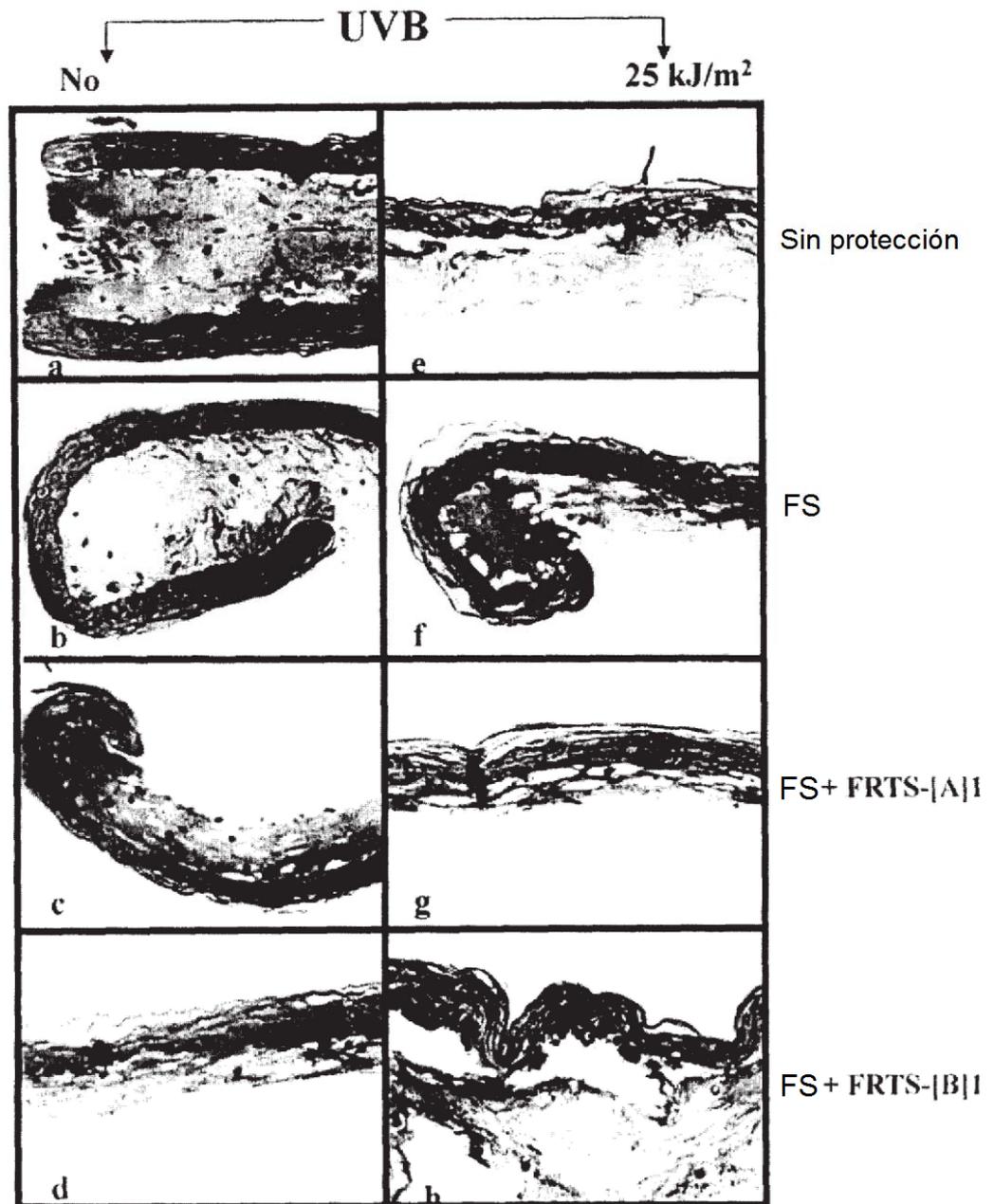


Figura 6

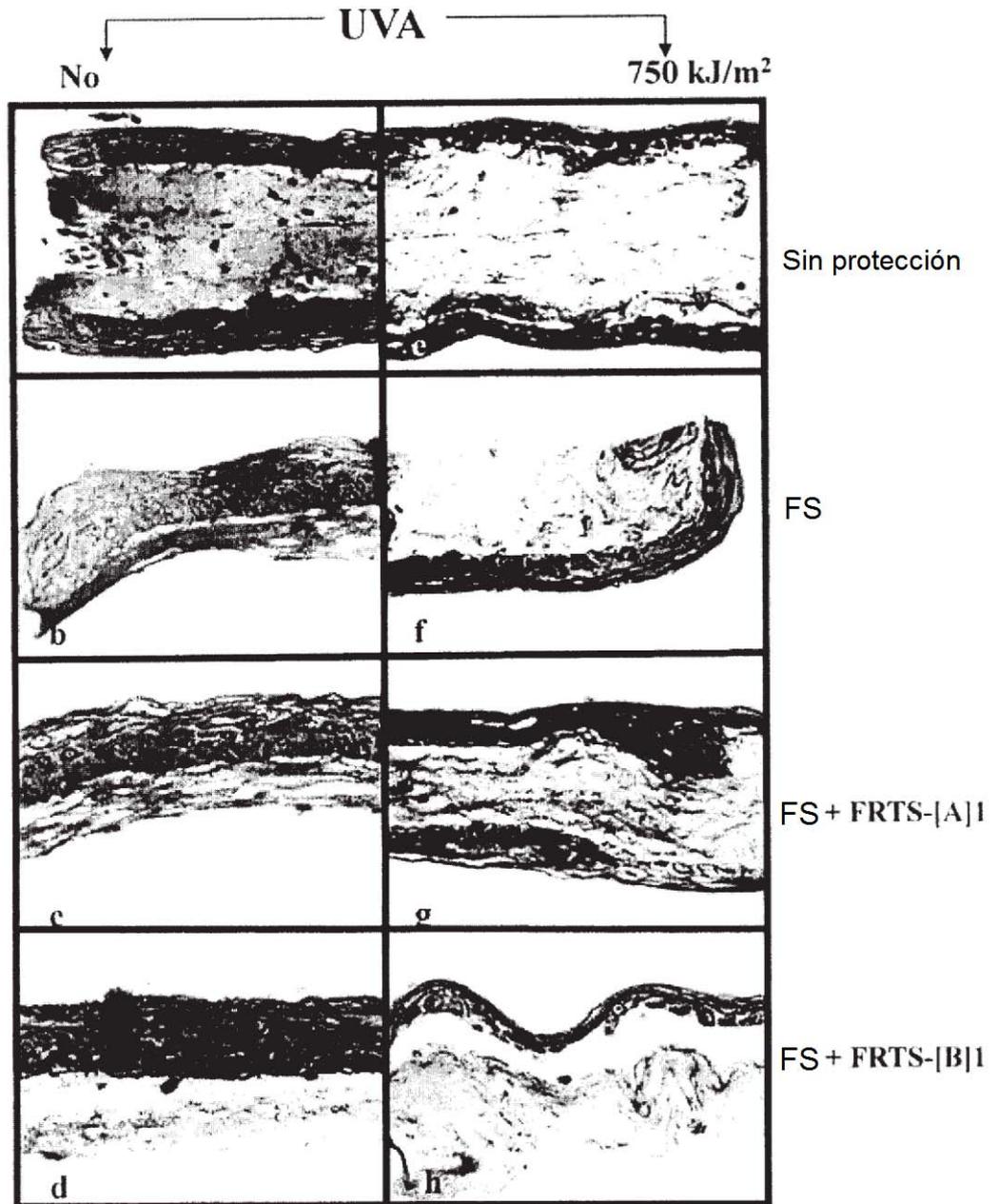


Figura 7

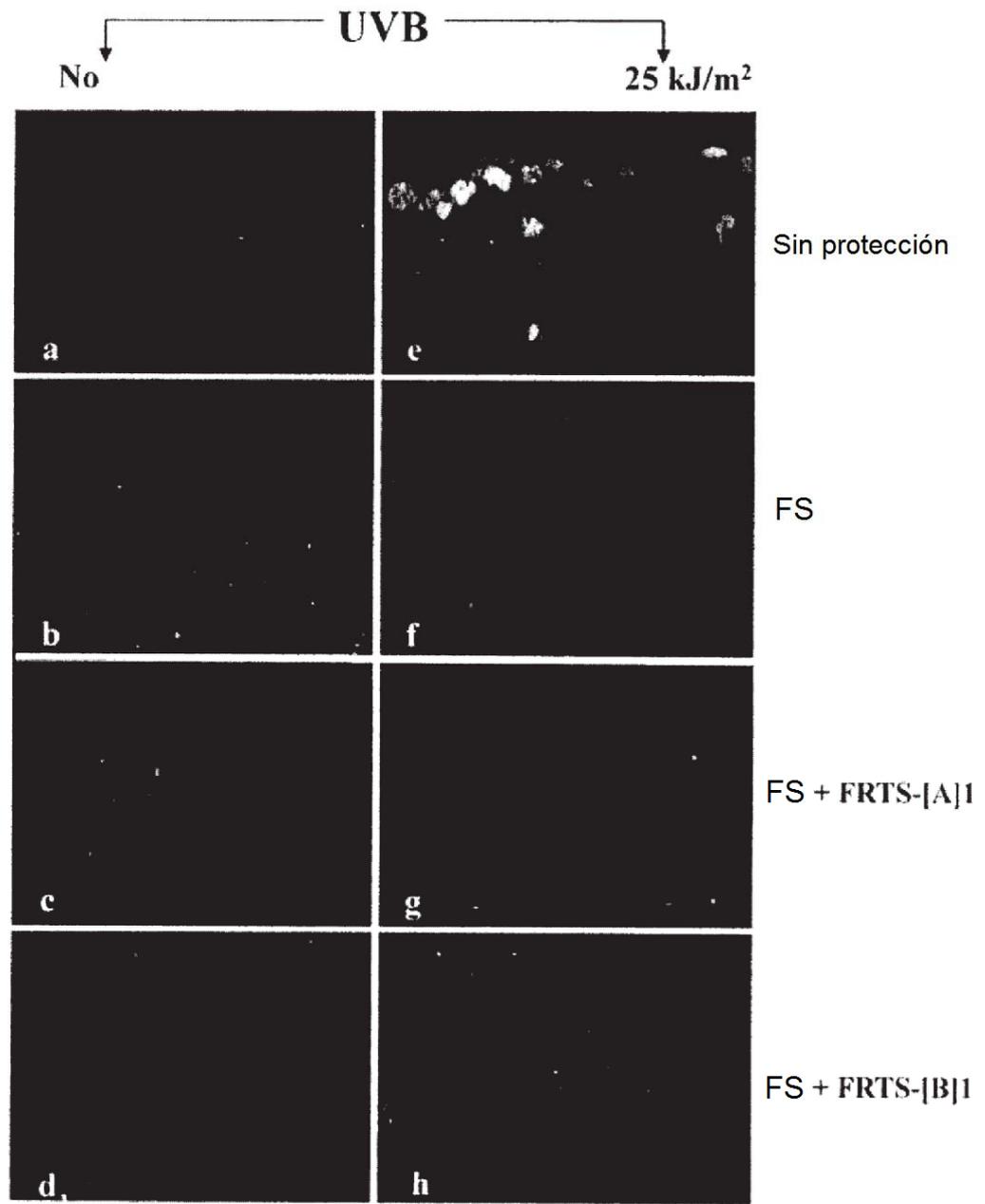


Figura 8

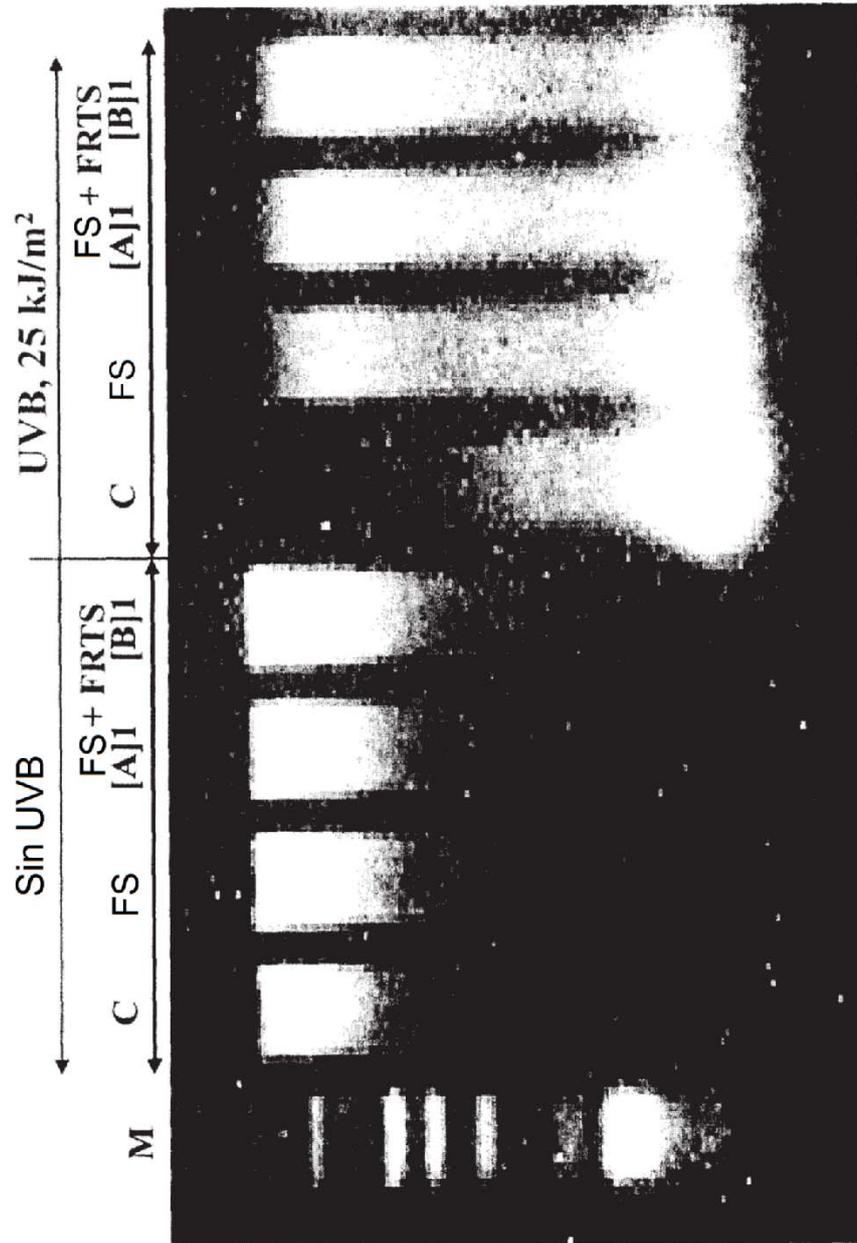


Figura 9

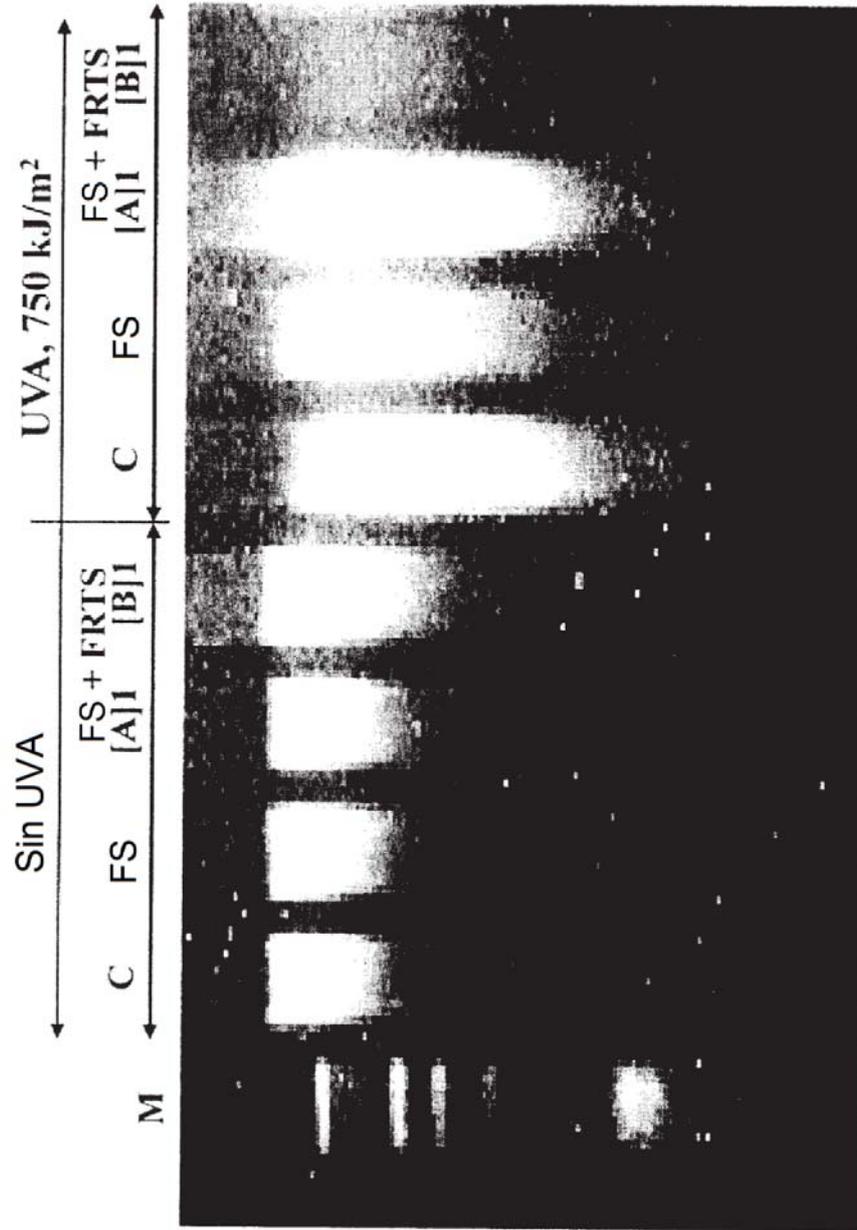


Figura 10

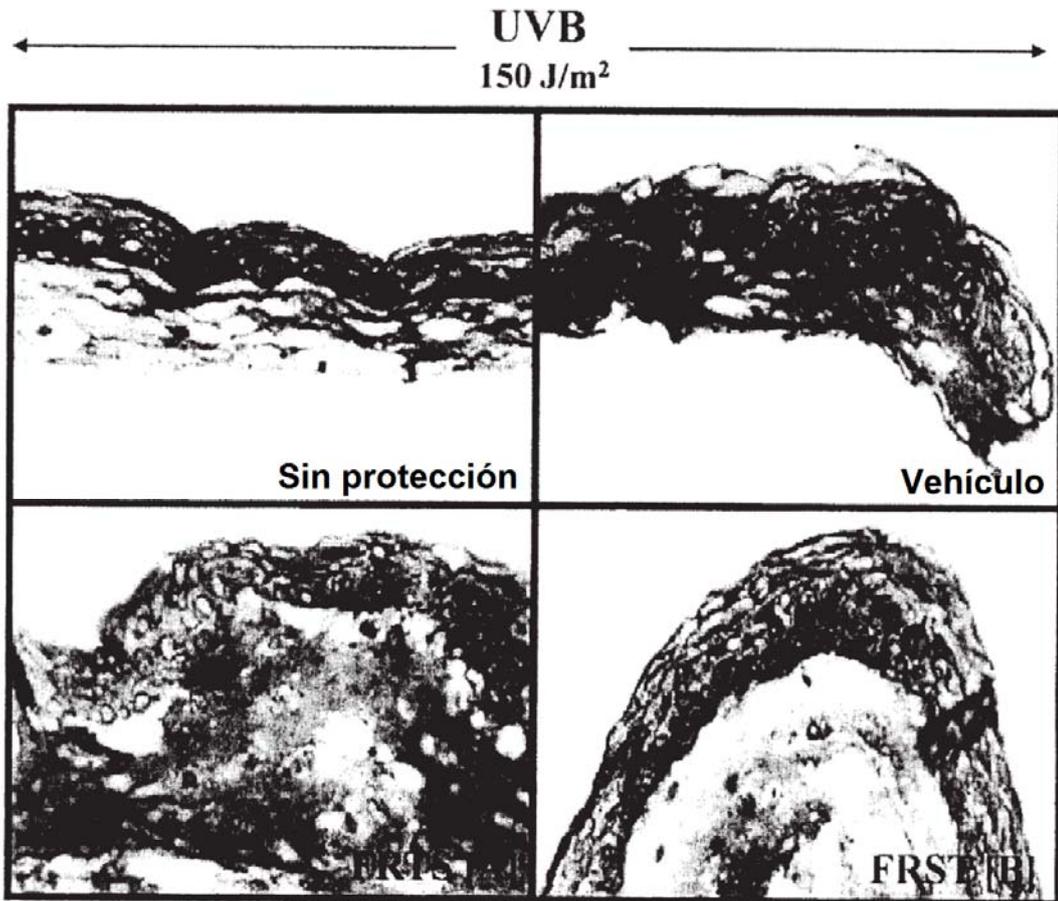


Figura 11

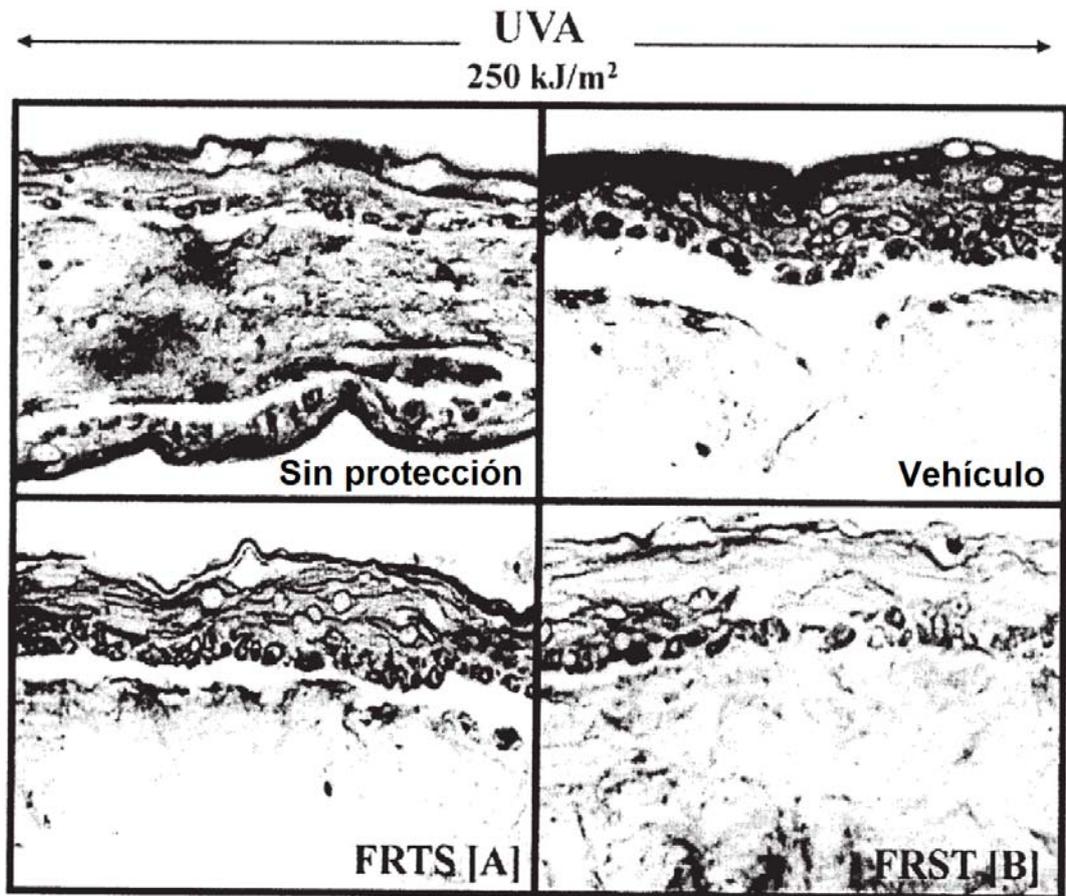


Figura 12

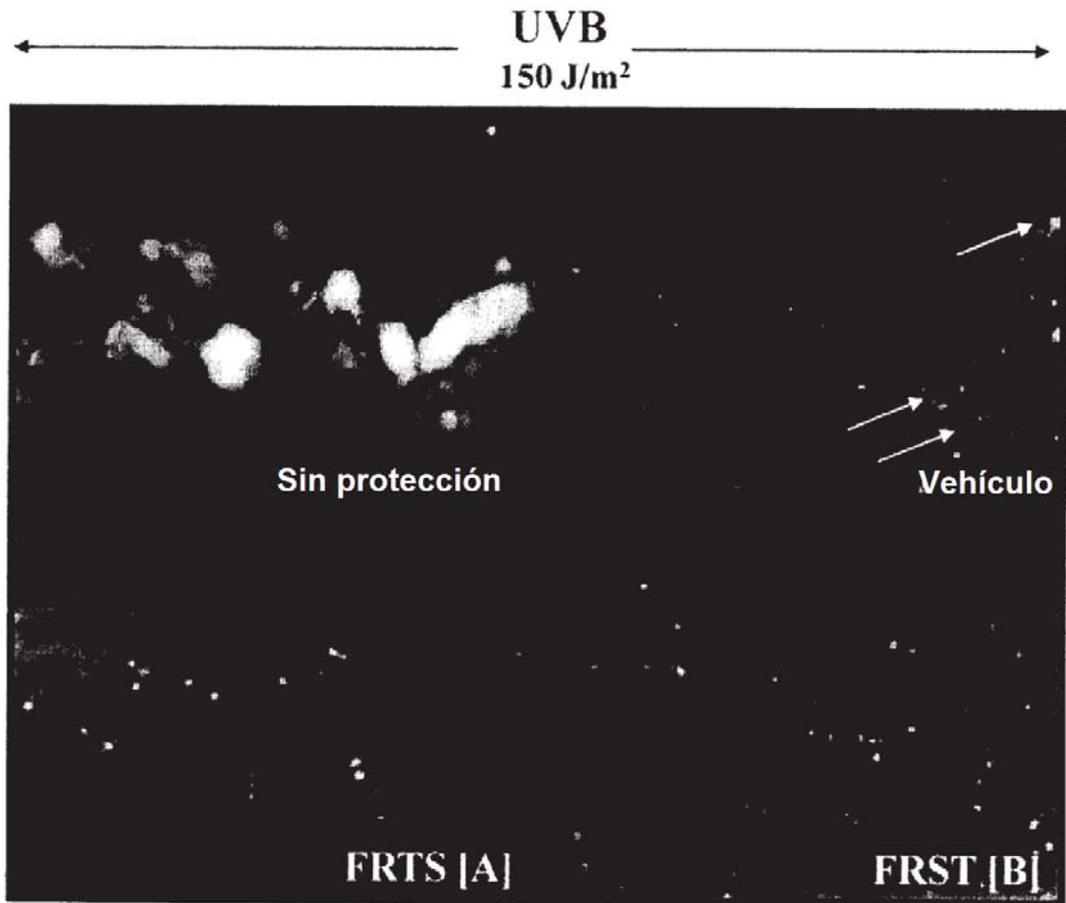


Figura 13

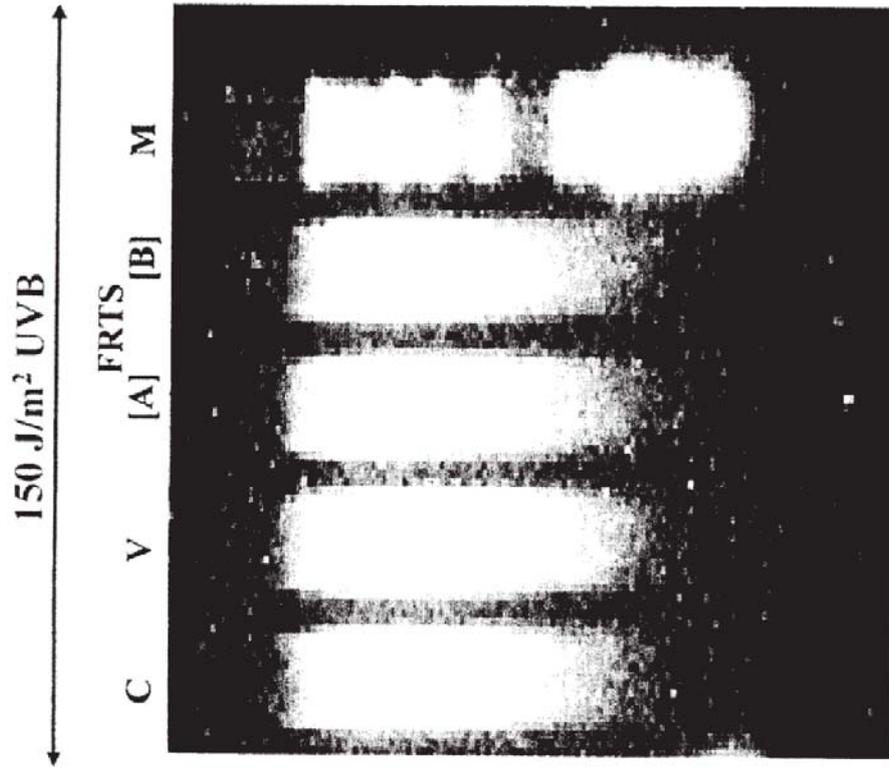


Figura 14

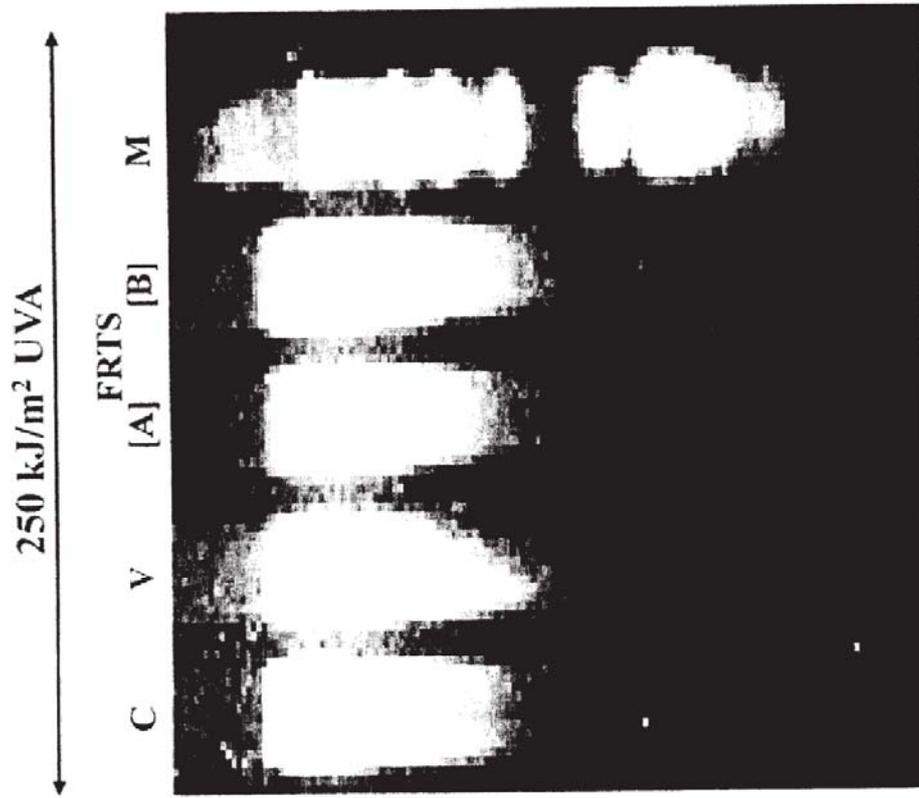
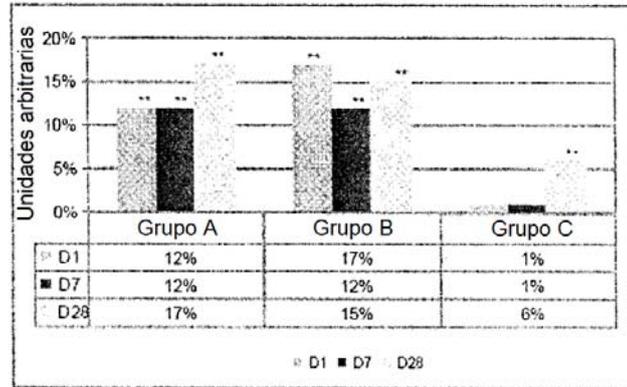


Figure 15

Figura 16



(Significación estadística, ** = p<0,01)

Figura 17

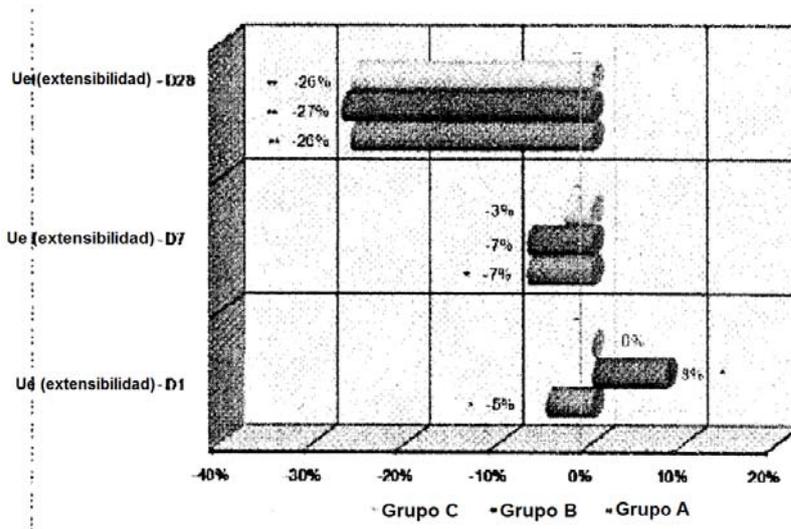


Figura 18

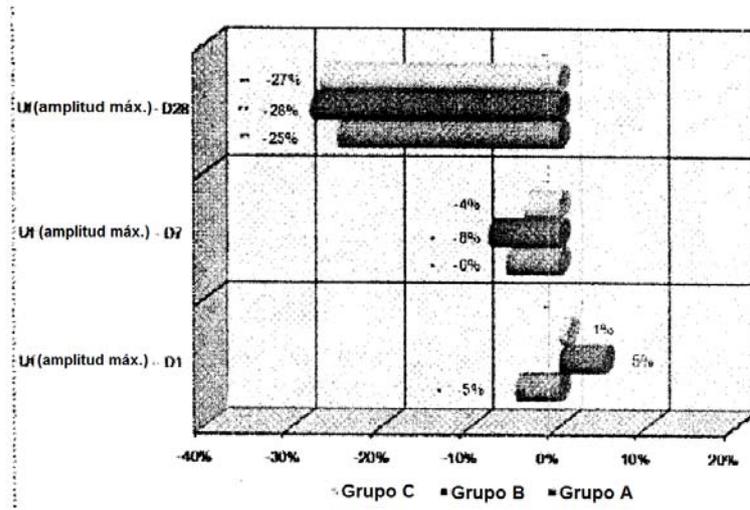


Figura 19

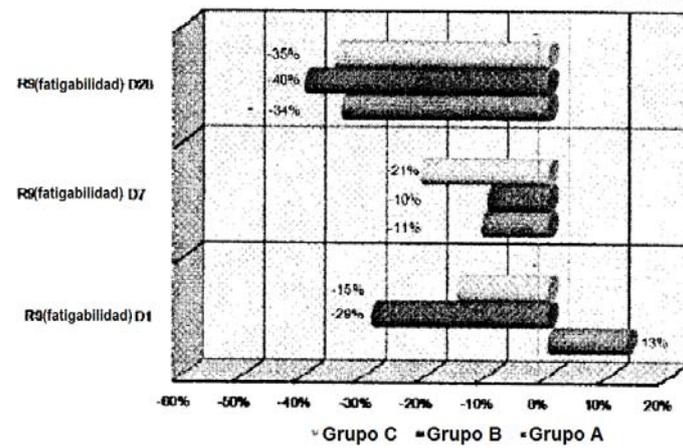


Figura 20

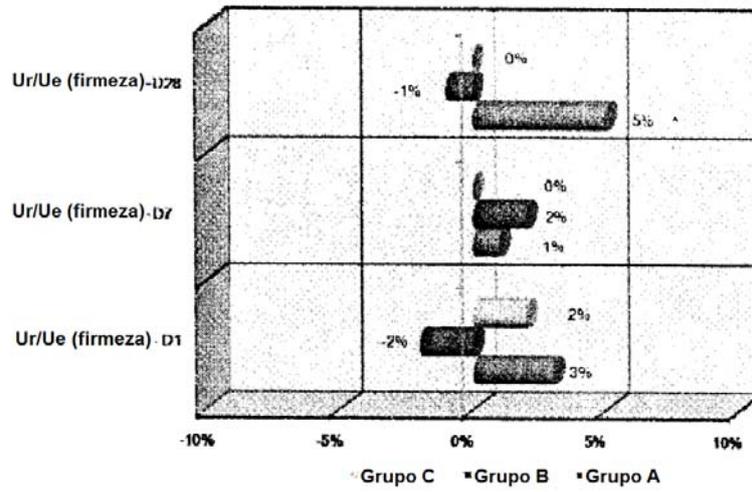


Figura 21

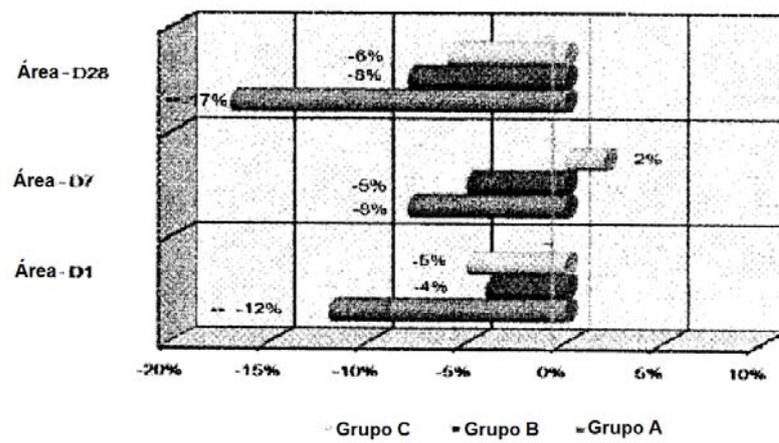


Figura 22

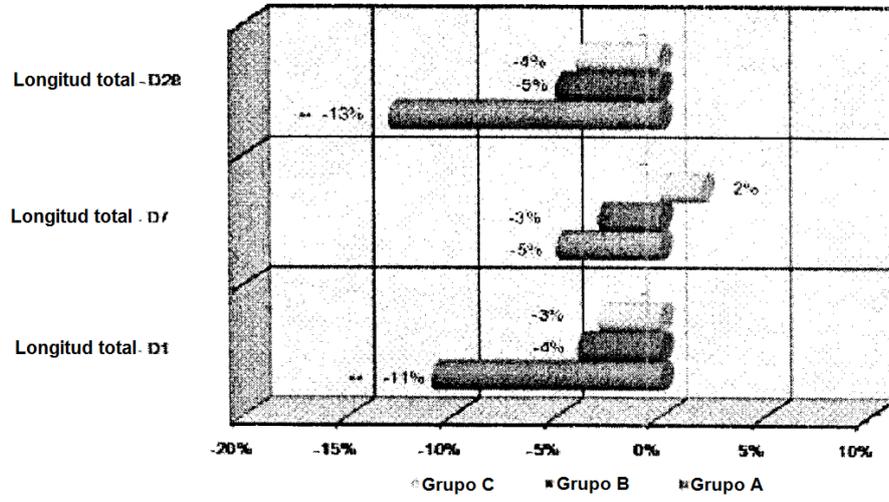


Figura 23

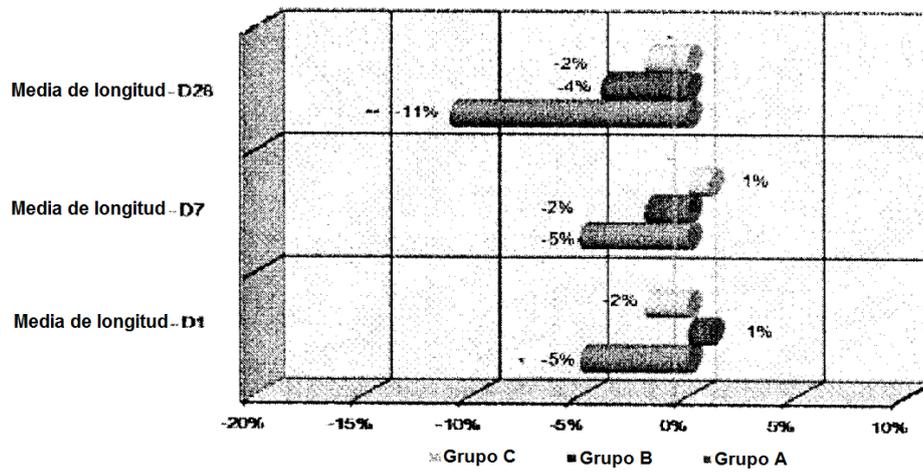


Figura 24

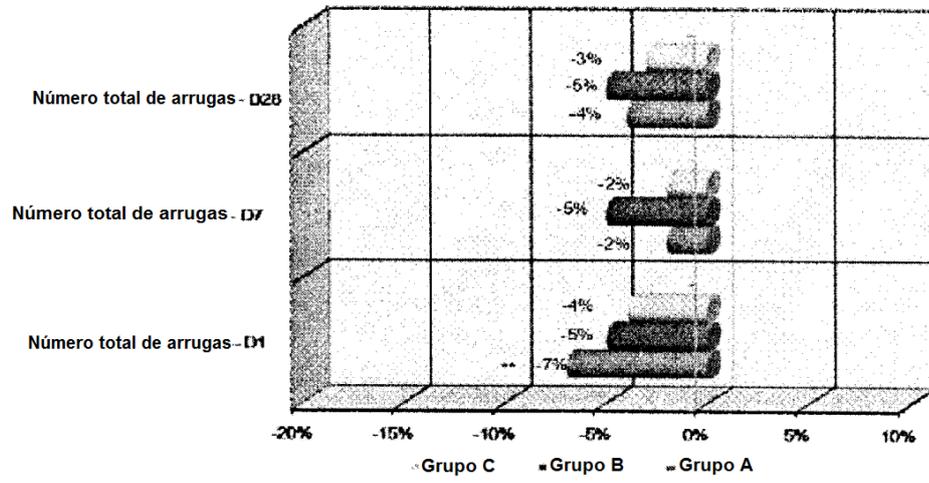


Figura 25

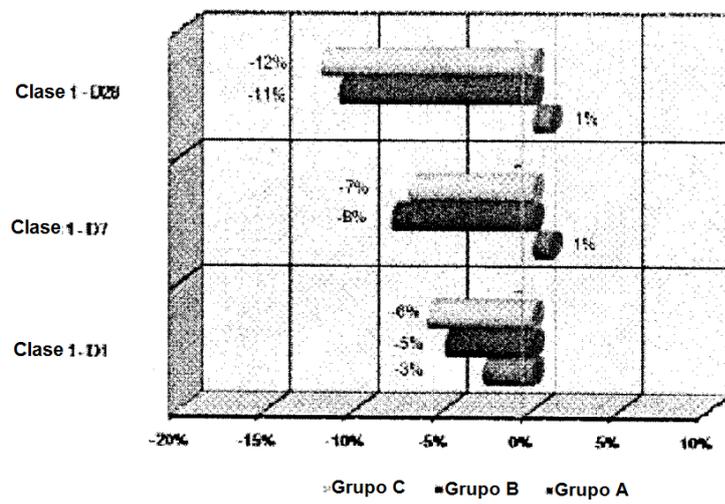


Figura 26

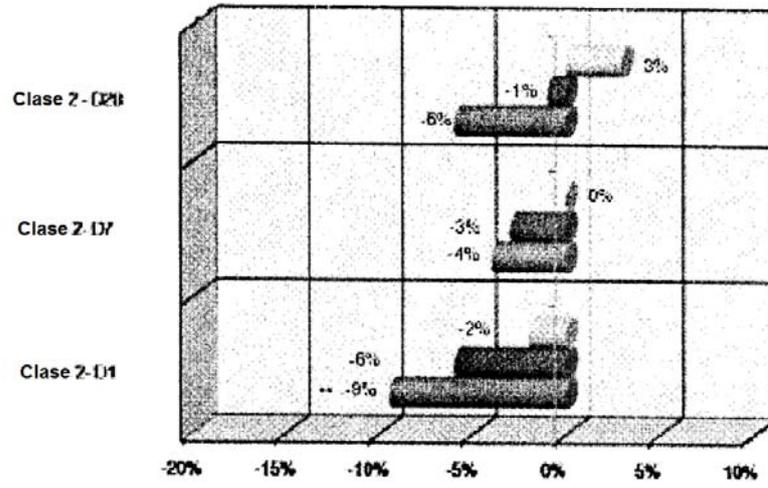
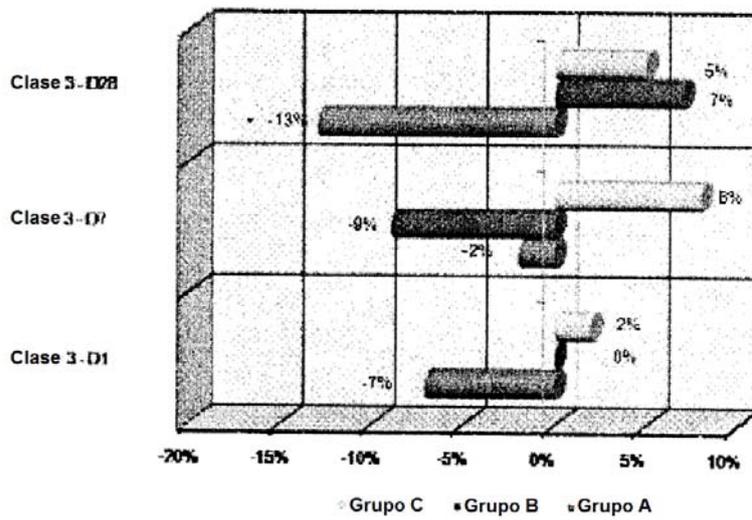


Figura 27



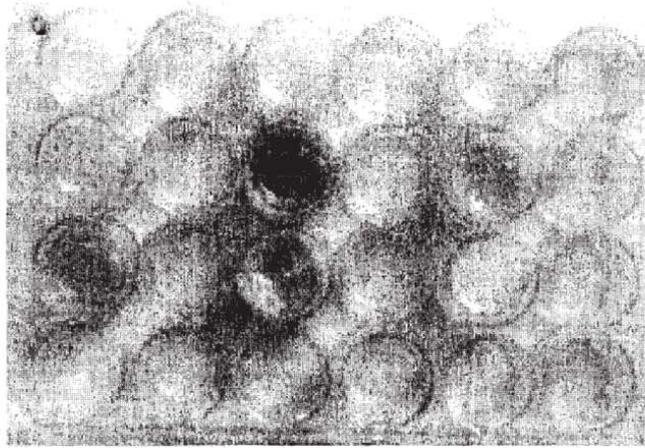


Figura 28

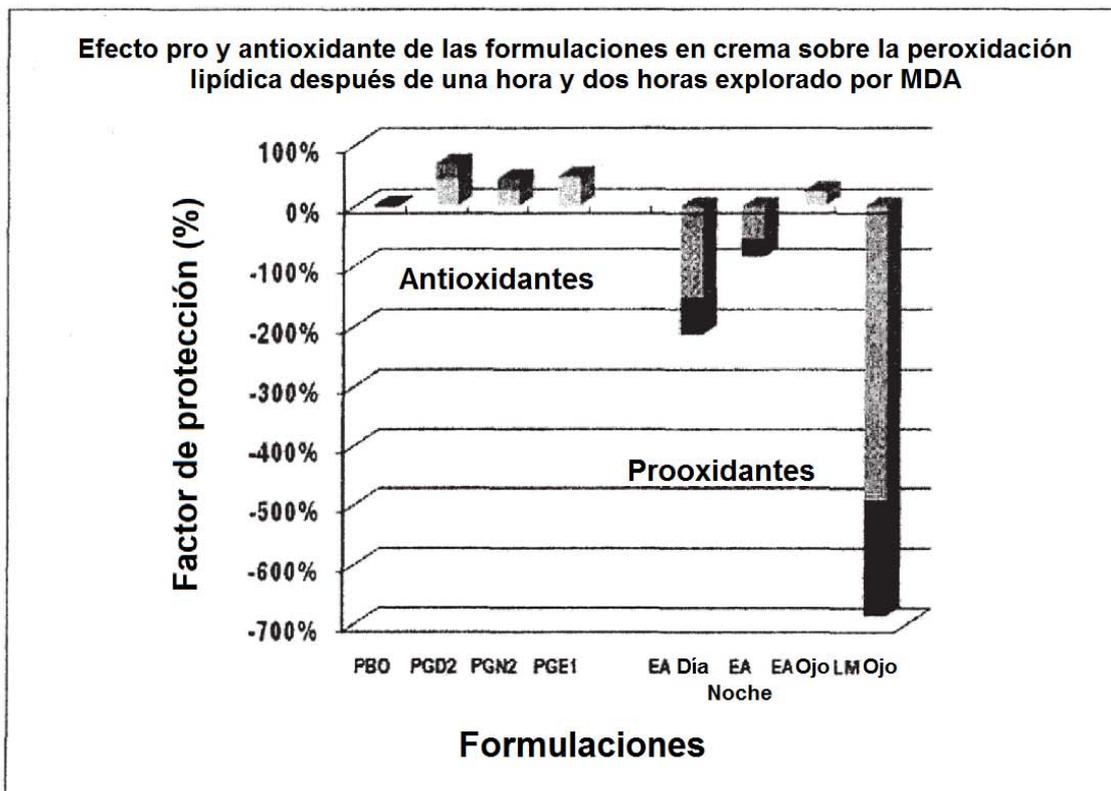


Figura 29a

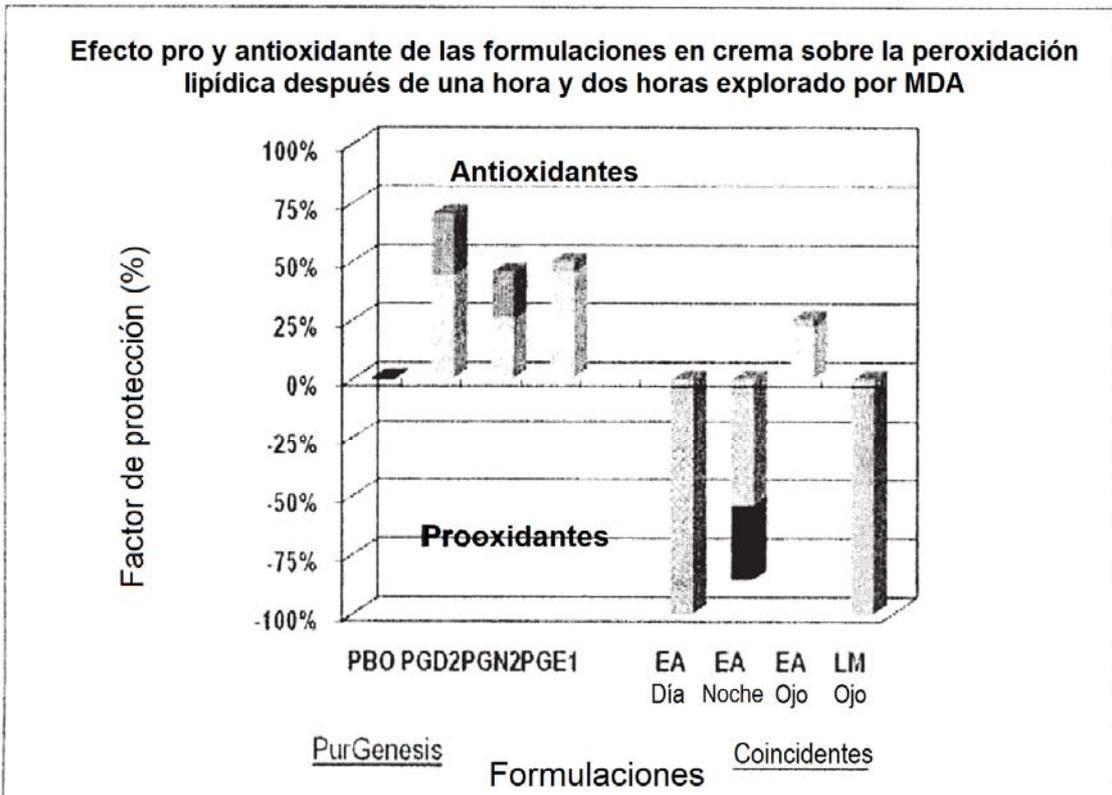


Figura 29b

Efecto pro y antioxidante de las formulaciones en crema sobre la peroxidación lipídica después de una hora y dos horas explorado por MDA

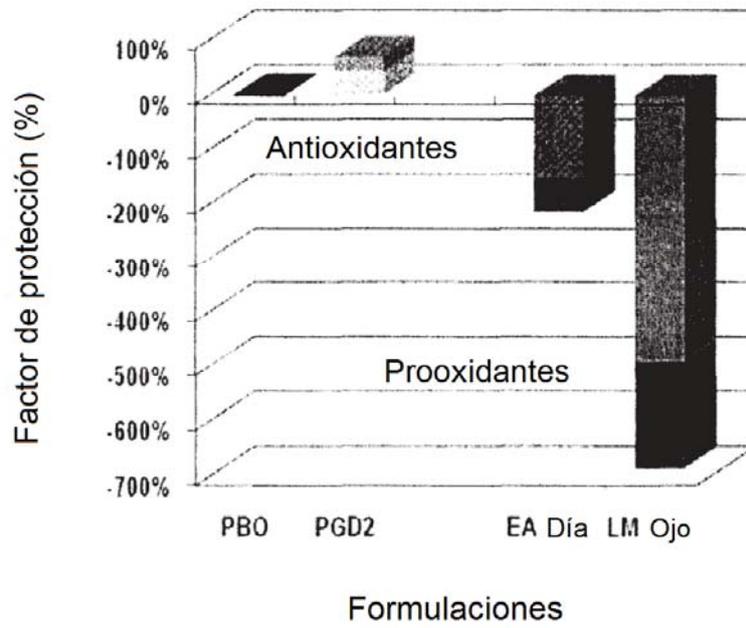


Figura 29c

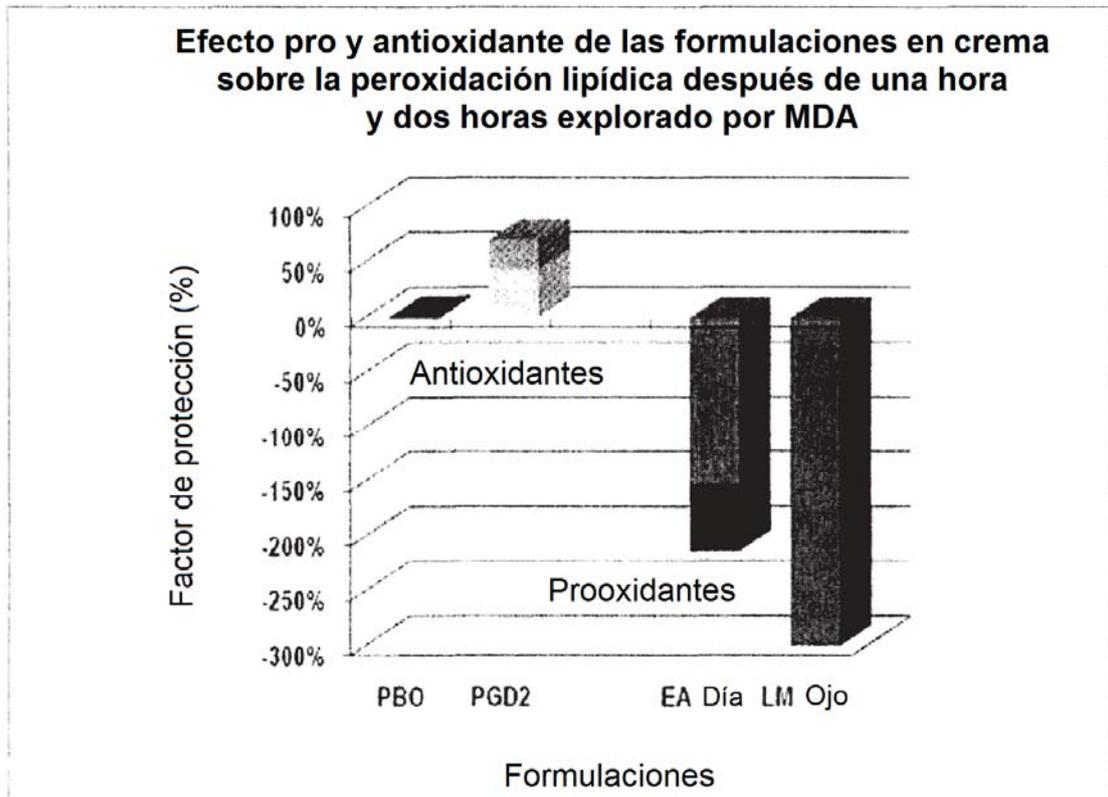


Figura 29d

Efecto pro y antioxidante de las formulaciones en crema sobre la peroxidación lipídica después de una hora y dos horas explorado por MDA

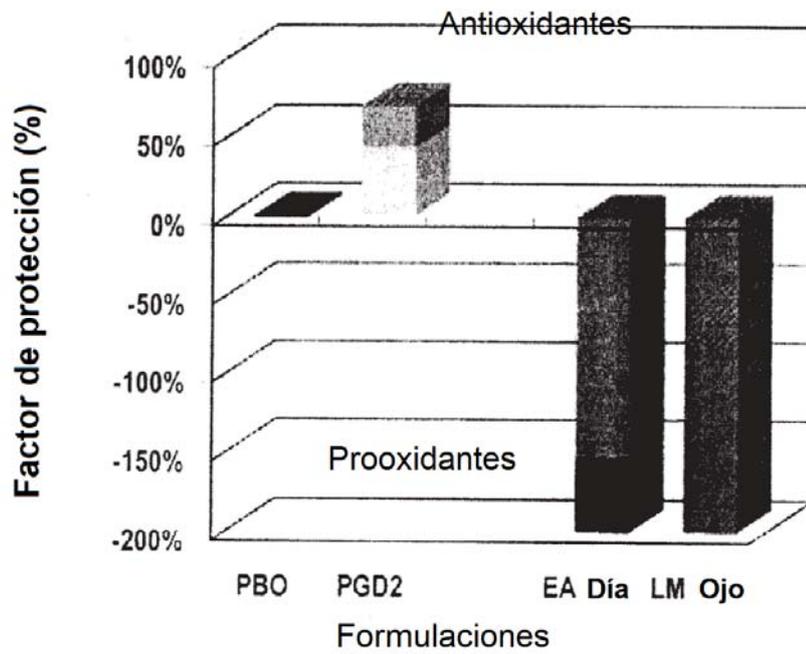


Figura 29e

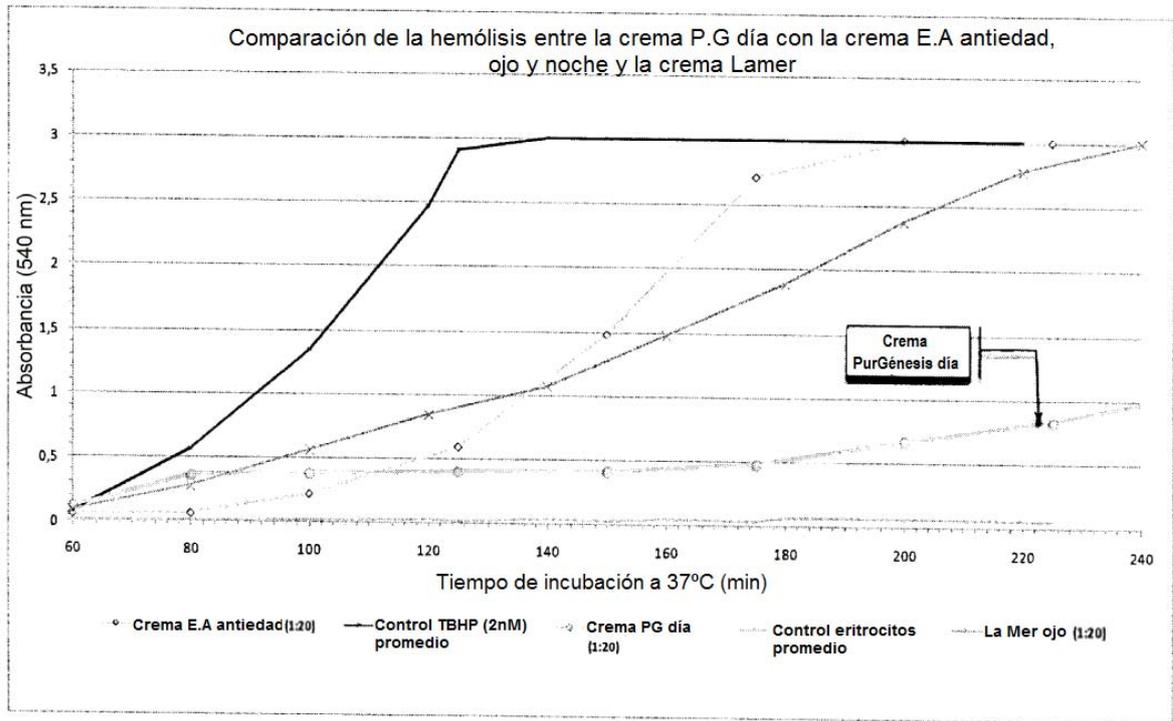


Figura 30

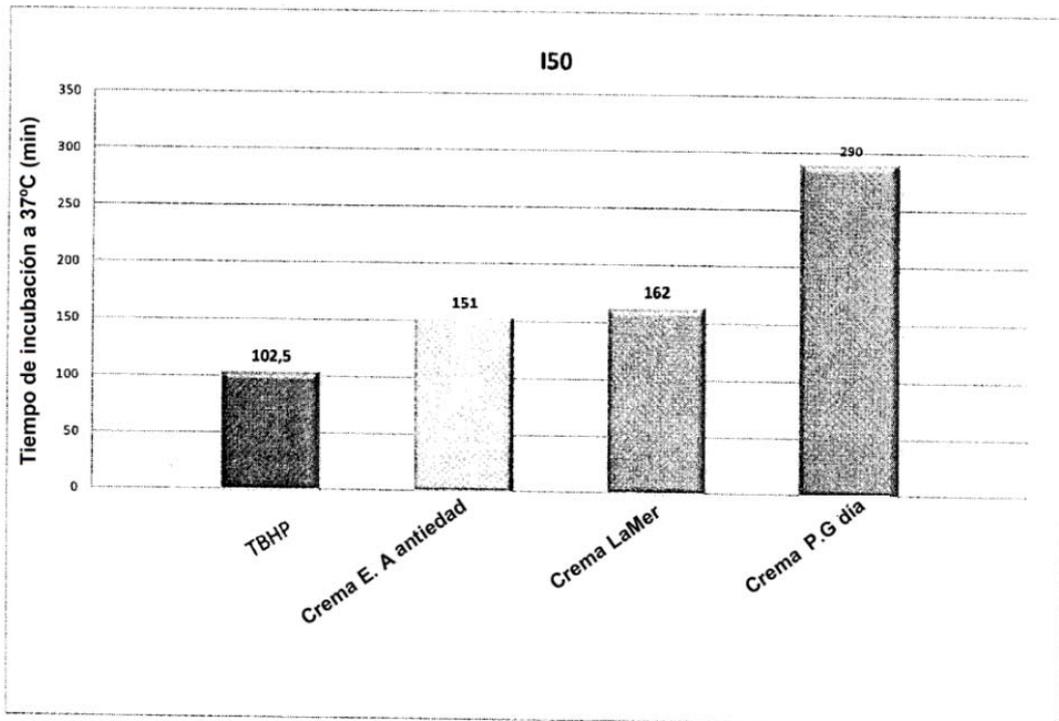


Figura 31

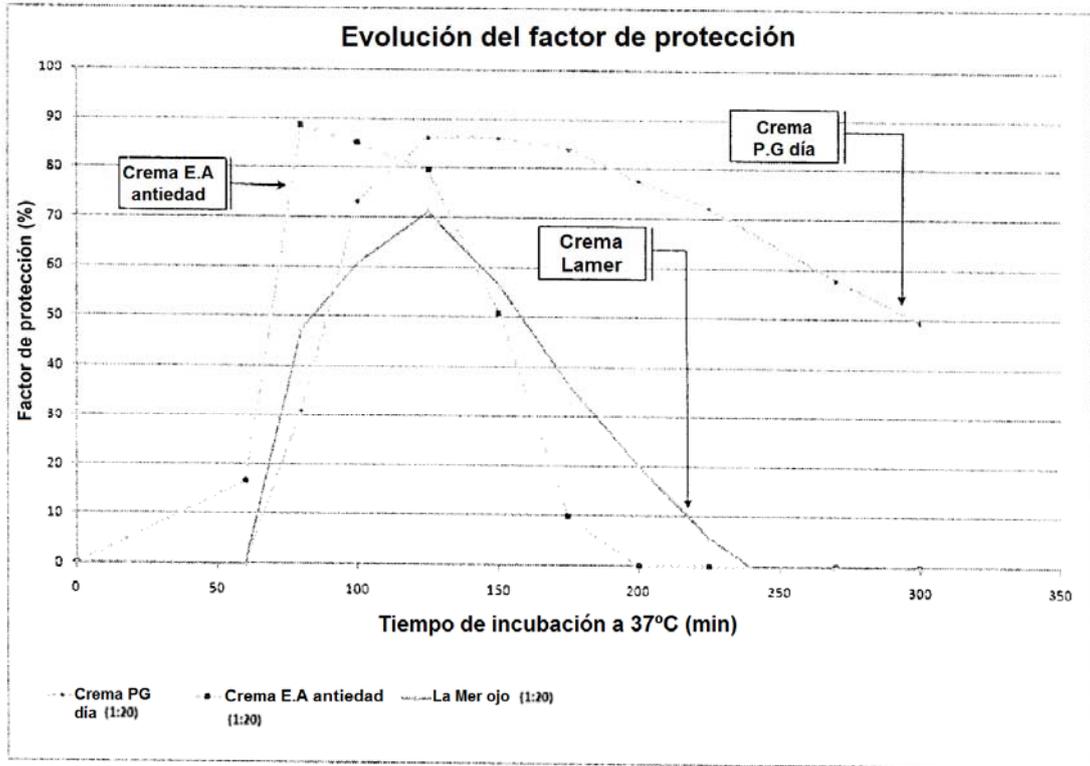


Figura 32

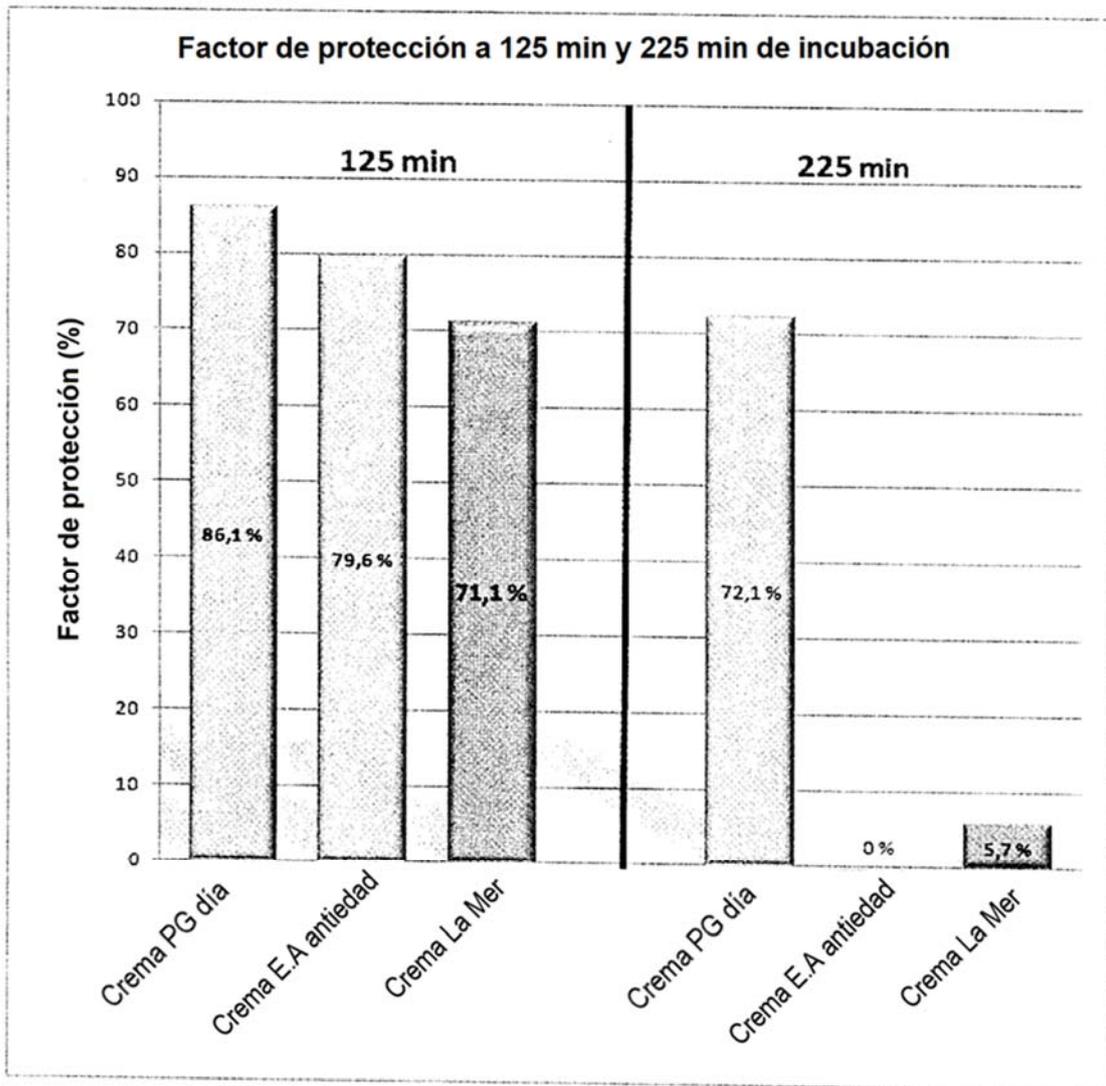


Figura 33

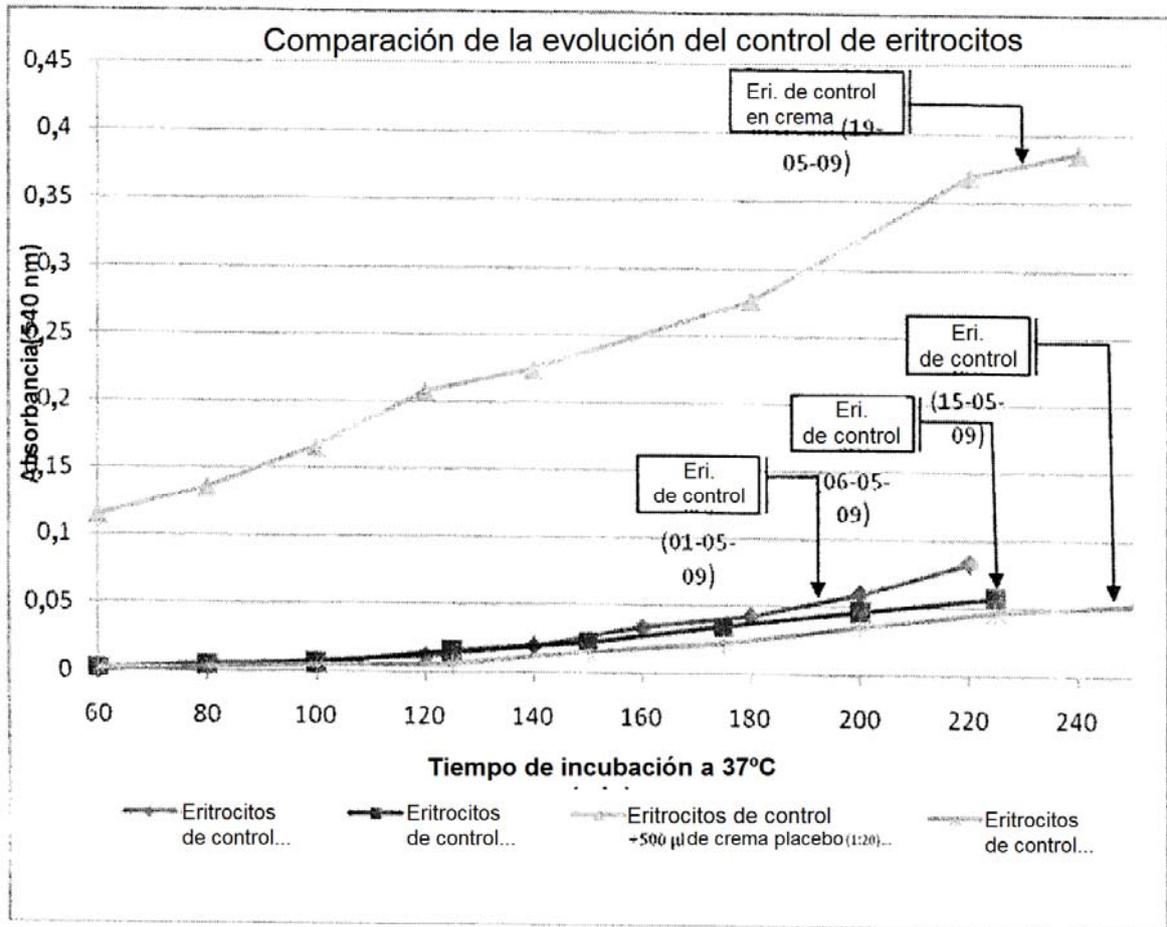


Figura 34