

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 268**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

A61K 8/9706 (2007.01)

A61K 8/9789 (2007.01)

A61K 8/9717 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/IB2016/056648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17077497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16794748 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3370833**

54 Título: **Extracto sinérgico de Palmaria palmata**

30 Prioridad:

04.11.2015 FR 1560569

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2020

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS LLC (50.0%)
1011 Centre Road, Suite 315
Wilmington, DE 19805, US y
LVMH RECHERCHE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEQUOY, VALÉRIE;
PORTOLAN, FRÉDÉRIQUE;
LE MESTR, AUDREY;
CAPALLERE, CHRISTOPHE;
IMBERT, ISABELLE;
MANTELIN, JOËL;
BOTTO, JEAN MARIE;
DOMLOGE, NOUHA;
GARCIA, NOËLLE;
BERGERON, LAURINE y
NIZARD, CARINE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 769 268 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

Extracto sinérgico de *Palmaria palmata*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se sitúa en el campo de la cosmética y específicamente para el cuidado de la piel por una acción al nivel de la dermis. Se refiere más en particular a un extracto sinérgico de una planta del género *Jasminum* (denominada también jazmín) y del alga roja *Palmaria palmata*, a un procedimiento de obtención de tal extracto, a composiciones que comprenden tal extracto y a los usos cosméticos del mismo para luchar contra los signos del envejecimiento de la piel y, en particular, para mejorar la elasticidad, la flexibilidad y la firmeza de la piel.

Antecedentes de la invención

El envejecimiento corresponde al conjunto de procesos, particularmente fisiológicos, que modifican la estructura y las funciones del organismo a lo largo del tiempo. Se distinguen dos tipos de envejecimiento, es decir, por una parte el envejecimiento intrínseco y, por otra, el envejecimiento extrínseco. El envejecimiento intrínseco es debido a factores genéticos, a modificaciones bioquímicas que tienen lugar durante estados de fatiga, de estrés, de cambios hormonales como durante el embarazo, etc. Por lo que se refiere al envejecimiento extrínseco, este es debido a factores medioambientales a los que está sometido el organismo a lo largo de toda su vida, tal como la contaminación, el sol, las enfermedades, etc. Se trata de un proceso lento y progresivo que afecta a todas las células del organismo por diferentes medios y se manifiesta de diferentes modos. Por ejemplo, en cuanto a la piel, el aspecto de esta es modificado por los diversos tipos de agresiones internas o externas y se puede ver entonces la aparición de arrugas y patas de gallo, manchas de hiper- o hipopigmentación, sequedad incluso deshidratación de la piel, adelgazamiento de la epidermis, elastosis, imperfecciones, manchas de la vejez.

La piel es un órgano de recubrimiento compuesto principalmente por tres capas celulares: la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis, que constituye la superficie de la piel, está anclada a la dermis por una matriz de diversas proteínas denominada unión dermo-epidérmica.

La epidermis está constituida por varias capas de células denominadas queratinocitos que son regeneradas por las células madre de la epidermis localizadas en la membrana basal de la epidermis.

La dermis es el tejido de sostén de la piel y se compone mayoritariamente de células fibroblastos, fibras de elastina y fibras de colágeno (70 % de las fibras dérmicas), envueltas en una matriz extracelular intersticial de proteoglicanos. Los fibroblastos originan la síntesis de las fibras de colágeno y de la elastina. La neosíntesis de fibras de tropoelastina, inicialmente en forma de proelastina, es un proceso asociado a la actividad de los fibroblastos que segregan estas fibras en el espacio extracelular. Después de su maduración, la elastina, asociada a la fibrilina, representa el componente mayoritario de las fibras elásticas que confiere a la dermis sus propiedades elásticas. Por otro lado, los fibroblastos permiten regenerar el tejido conjuntivo y participan en la reparación de la piel tras una herida. Los fibroblastos, que están implicados en numerosas funciones al nivel de la piel, son esenciales, por tanto, en el mantenimiento de una piel sana y en buen estado.

Las actividades de renovación o de reparación de las estructuras dérmicas durante los daños provocados, por ejemplo, por los rayos UV o las heridas, implican la existencia de células madre dérmicas (*Skin Derived Precursors* o SKP) adultas, localizadas particularmente en tejidos tales como el prepucio y el folículo piloso (Toma *et al.*, 2005, *Stem cells* 23:727-737). Las células SKP son los principales progenitores de las células dérmicas en cuanto que garantizan la renovación de los fibroblastos. Estas entran en juego en particular durante la reparación de las heridas de la piel.

Las células SKP poseen características típicas de las células madre en general; presentan capacidades de autorrenovación y de diferenciación importantes (Li *et al.*, 2010, *J Cell Sci.* 123:853-60) y se definen como células que expresan un conjunto de marcadores moleculares tales como:

- Nestina+: proteína de filamento intermedio expresada por numerosas células a lo largo del desarrollo y, en particular, las células de la cresta neural. Su expresión es transitoria y no persiste en la edad adulta.
- OCT4+ (octámero de unión al factor de transcripción 4): marcador de multipotencia implicado en la autorrenovación de células madre embrionarias indiferenciadas.
- SOX2+ (región de determinación del sexo Y-box 2): factor de transcripción esencial para mantener la autorrenovación de células madre embrionarias indiferenciadas.

Las investigaciones para identificar agentes activos capaces de luchar contra el envejecimiento cutáneo han llevado a la comercialización de numerosos agentes activos más o menos eficaces. No obstante, sigue estando de actualidad la identificación de nuevos compuestos capaces de retardar la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo o de luchar más eficazmente contra ellos. El problema al que se dirige en particular la invención es la identificación de nuevos agentes activos capaces de luchar contra los principales signos del envejecimiento cutáneo

que se producen al nivel de la matriz extracelular, siendo producida la mayoría de las proteínas que la constituyen por los fibroblastos.

Las algas se usan ampliamente en aplicaciones cosméticas. Es conocido su potencial para prevenir el envejecimiento y mejorar el aspecto y la protección de la piel humana. El uso de extractos de algas puede mejorar la nutrición de la piel y del cabello, manteniendo al mismo tiempo un buen grado de hidratación.

Se comercializan determinadas especies de microalgas para el cuidado de la piel. Por ejemplo, son bien conocidos los extractos de *Arthrospira* y de *Chlorella* en las cremas antienvjecimiento, los productos anti-irritantes y los productos de cuidados refrescantes o de regeneración.

Asimismo, las especies del género de alga *Palmaria*, en particular la especie *Palmaria palmata*, son conocidas por ser eficaces en el cuidado de la piel. El alga *Palmaria palmata* se denomina también Dulce o Dulce. Esta planta marina es rica en minerales, en particular en fluoruro, fósforo, potasio, en vitaminas, en proteínas y en polisacáridos (xilanos). El documento FR2826575 describe el uso cosmético de xilanos extraídos de *Palmaria palmata*, más en particular para aumentar la hidratación de la capa córnea, aunque también para la regeneración de la piel y del cabello mediante la síntesis de fibronectina y la proliferación de células fibroblásticas.

Un extracto acuoso de flores de jazmín, en particular de la especie *Jasminum officinale*, es una fuente conocida de flavonoides con propiedades antioxidantes. El aceite esencial de jazmín se usa en aromaterapia (antioxidante) y en dermatología (propiedades antisépticas y antiinflamatorias).

Sin embargo, ninguno de los usos conocidos de un extracto de *Jasminum officinale*, por un lado, y de un extracto de *Palmaria palmata*, por otro, sugiere que estos dos extractos presenten, independientemente entre sí o uno en combinación con el otro, propiedades i) de aumento de la expresión génica y/o proteica del colágeno y/o ii) de aumento del carácter madre de las células madre dérmicas.

Una de las tendencias de la cosmética moderna es desarrollar productos activos de origen natural que tengan no solo efectos como agentes antiarrugas o antienvjecimiento, sino que combinen también varias propiedades y aporten así un espectro más amplio de mejora de los signos del envejecimiento.

No obstante, los inventores han puesto en evidencia que un nuevo extracto obtenido a partir de *Palmaria palmata* y de *Jasminum officinale* presenta un gran interés para los cuidados de la piel, en cuanto que tiene un efecto sinérgico sobre las células madre dérmicas. Tal extracto permite, en efecto, aumentar la reserva de células madre dérmicas y mejora su funcionamiento, lo que permite preservar e incluso restablecer la estructura del tejido conjuntivo de la dermis. Tal extracto permite mejorar las propiedades mecánicas de la piel, en particular su elasticidad, tal como se ha demostrado mediante una prueba de balistometría, y luchar así contra determinados signos del envejecimiento cutáneo.

De forma sorprendente, los inventores han descubierto que el extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín usado de acuerdo con la invención ofrece específicamente las ventajas siguientes:

- aumenta la cantidad de marcadores bioquímicos asociados al carácter "madre" de las células madre dérmicas (SKP) y, en particular Nestina+, OCT4+, SOX2+, en las células dérmicas;
- aumenta la elasticidad de la piel, la flexibilidad de la piel y/o la firmeza de la piel,
- aumenta la renovación de la piel;
- aumenta la síntesis de proteínas de la matriz extracelular dérmica, por ejemplo el colágeno, en particular el colágeno I, III o V; el procolágeno, en particular el procolágeno I, III o V; y la tropoelastina;
- permite, consiguientemente, luchar contra los signos cutáneos asociados al envejecimiento de la piel.

Por "carácter madre de las células madre dérmicas" se entiende el perfil de expresión de marcadores bioquímicos asociados al fenotipo de las células SKP o similares a SKP, en particular la expresión de Nestina+, OCT4+, SOX2+.

La invención y las ventajas que se derivan de la misma se comprenderán mejor con la lectura de la descripción.

Exposición de la invención

La presente invención se refiere a un extracto de una planta del género *Jasminum* obtenido mediante la maceración de al menos una parte de la planta en un hidrolizado acuoso del alga *Palmaria palmata*. La relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de la planta, usadas las dos como materia prima para preparar el extracto, está comprendida preferentemente entre 40/60 y 95/5. Este extracto presenta la originalidad de no tener propiedades biológicas idénticas a las que se obtienen con la mezcla de un hidrolizado acuoso del alga *Palmaria palmata* y de un extracto de una planta del género *Jasminum* obtenido mediante la maceración de al menos una parte de la planta en agua.

La presente invención tiene como primer objeto un extracto sinérgico del alga *Palmaria palmata* y de al menos una

parte de una planta del género *Jasminum*, extracto que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende i) una etapa de preparación de un extracto acuoso del alga *Palmaria palmata* seguida de ii) una etapa de maceración de al menos una parte de una planta del género *Jasminum* en dicho extracto acuoso, estando comprendida la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de la planta, usadas las dos como materia prima para preparar el extracto, entre 40/60 y 95/5.

En un modo de realización, el extracto sinérgico se obtiene mediante este procedimiento.

En la presente invención, los porcentajes se expresan en peso/peso, salvo indicación en contrario.

En el resto de la descripción se usan indistintamente el término "jazmín" y la expresión "planta del género *Jasminum*".

El término "extracto" designa de manera general una sustancia aislada, obtenida a partir de una materia prima vegetal nativa, y que no existe previamente en la naturaleza como tal.

En la presente descripción, la mención del alga o de la planta significa la materia vegetal recogida, opcionalmente secada (mediante cualquier método conocido, tal como secado en estufa o liofilización) y opcionalmente reducida a polvo o escamas mediante trituración.

Por "extracto sinérgico" de acuerdo con la invención se entiende un extracto que comprende, o que está constituido por, un extracto acuoso de *Palmaria palmata* y de jazmín, preferentemente de sumidades floridas de *Jasminum officinale*, capaz de aumentar la expresión de Nestina+, OCT4+, SOX2+, bien aumentando la síntesis proteica por modulación directa o indirecta de la expresión génica, bien por otros procesos biológicos tales como la estabilización de la proteína o también la estabilización de los transcritos de ARN mensajero, con respecto a un extracto de *Palmaria palmata* de referencia incubado solo, a un extracto de jazmín de referencia incubado solo y a la mezcla de los mismos. Un extracto de *Palmaria palmata* de referencia se podrá obtener, por ejemplo, llevando a cabo la etapa i) del procedimiento de preparación del extracto sinérgico tal como se ha descrito previamente, en condiciones de preparación idénticas. Un extracto de jazmín de referencia se podrá obtener, por ejemplo, llevando a cabo la etapa ii) del procedimiento de preparación del extracto sinérgico tal como se ha descrito previamente, en condiciones de preparación idénticas sustituyendo la masa de extracto acuoso de *Palmaria* obtenido a la salida de la etapa i) por la misma masa de agua. En toda la descripción, el aumento de las propiedades se evalúa a peso constante en materia seca de extracto.

En particular, un extracto sinérgico de acuerdo con la invención es un extracto que comprende, o que está constituido por, un extracto acuoso de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín, capaz de multiplicar al menos por 2 el carácter madre de las células madre dérmicas, con respecto a un extracto de *Palmaria palmata* de referencia incubado solo, a un extracto de jazmín de referencia incubado solo y, opcionalmente, a una mezcla de los mismos.

En particular, el extracto sinérgico puede ser capaz de:

- de multiplicar al menos por 8 la cantidad de ARN mensajero de SOX2+ expresada por fibroblastos y/o
- de multiplicar al menos por 2 la cantidad de ARN mensajero de Nestina+ expresada por fibroblastos y/o
- de multiplicar al menos por 6 la cantidad de ARN mensajero de OCT4+ expresada por fibroblastos,

con respecto a un extracto de *Palmaria palmata* de referencia incubado solo y a un extracto de jazmín de referencia incubado solo.

Las expresiones "extracto sinérgico", "extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín" o "agente activo" se usarán alternativamente con el mismo sentido a lo largo de la descripción.

La parte de la planta del género *Jasminum* puede ser la raíz, el tallo, las hojas, las flores o las semillas. Se prefiere que dicha parte comprenda las flores. Por "sumidades floridas" se entiende una parte de la planta que comprende la flor acompañada opcionalmente de tallo. En un modo de realización, las sumidades floridas comprenden la flor y unos centímetros de tallo.

El extracto de acuerdo con la invención se obtiene preferentemente después de una extracción acuosa de *Palmaria palmata* en la que se efectúa después una maceración de las sumidades floridas de jazmín, variando la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas de 50/50 a 90/10, por ejemplo de 60/40 a 70/30 o de 80/20 a 90/10 (estando comprendidos los extremos). En un modo de realización, la relación másica es igual a 90/10.

La preparación del extracto puede comenzar con la preparación de un extracto acuoso de *Palmaria palmata*, que es una especie de algas rojas de la familia de las *Palmariales* denominada también Dulce o Dulce. Esta ha sido una fuente de fibra a través de los siglos. Esta alga es rica en minerales, en particular en fluoruro, fósforo, potasio, en

minerales, vitaminas, proteínas y polisacáridos (xilanos).

El extracto acuoso de *Palmaria palmata* usado de acuerdo con la invención se puede obtener mediante hidrólisis enzimática, por ejemplo con una carbohidrasa y/o una endoproteasa, de una solución acuosa de *Palmaria palmata* que comprende una relación másica agua / *Palmaria palmata* (expresada en peso seco del alga) comprendida entre 10/1 y 50/1, a un pH comprendido entre 3 y 6, a una temperatura comprendida entre 40 y 80 °C, durante un tiempo de al menos 1 hora, preferentemente 2 horas.

Las algas de *Palmaria palmata* ventajosamente se secan y se muelen finamente, después de su recogida.

La relación másica agua / *Palmaria palmata* preferentemente está comprendida entre 15/1 y 30/1, aún más preferentemente entre 20/1 y 25/1.

El pH se ajusta preferentemente, por ejemplo mediante adición de ácido clorhídrico (HCl), entre 3 y 6, preferentemente entre 4 y 5,5, aún más preferentemente entre 4 y 4,5.

La temperatura de hidrólisis está comprendida preferentemente entre 40 °C y 80 °C, preferentemente entre 50 y 60 °C y, aún más preferentemente, es de 55 °C.

El uso de extractos de plantas hidrolizados presenta numerosas ventajas en cosmética y dermocosmética. Además del hecho de liberar compuestos activos, la hidrólisis y la purificación permiten obtener mezclas más estables, más fácilmente homologables y que no provocan reacciones alérgicas en cosmética.

De forma ventajosa, la hidrólisis controlada permite el acceso a los azúcares contenidos en las algas de la especie *Palmaria palmata*. El extracto de acuerdo con la invención es un extracto acuoso de jazmín y de *Palmaria* enriquecido en compuestos de interés de *Palmaria palmata* y del jazmín.

La hidrólisis enzimática controlada se efectúa preferentemente con una xilanasa, como carbohidrasa, y una bromelaína, como endoproteasa. Estas enzimas permiten optimizar el rendimiento y el grado de hidrólisis.

Las xilanasas son enzimas del grupo de las glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces β -1,4-glucosídicos en el xilano mediante un doble mecanismo de desplazamiento. La hidrólisis de los xilanos libera xilosa.

Preferentemente, la endoproteasa usada en el procedimiento de acuerdo con la invención es la bromelaína, denominada también bromelasa. Se trata de una enzima proteolítica extraída de los tallos y raíces frescas de la piña. Es una mezcla de enzimas con acción proteolítica que se dirige a los grupos sulfatados de las cadenas laterales de las cisteínas.

La xilanasa se usa en una cantidad comprendida preferentemente entre un 2 y un 6 %, aún más preferentemente de un 4 %, con respecto a la cantidad en peso seco de alga introducida en el medio de reacción, y la bromelaína en una cantidad comprendida preferentemente entre un 1 y un 3 %, aún más preferentemente de un 2 %.

El extracto acuoso de *Palmaria palmata* así obtenido se separa después de los residuos sólidos mediante un método conocido por el experto en la técnica, tal como una centrifugación seguida de una filtración.

Este primer extracto acuoso filtrado es el que servirá de líquido de maceración para las sumidades floridas de jazmín, por ejemplo.

La maceración significa un procedimiento que consiste en dejar reposar durante un tiempo determinado un sólido en un líquido para extraer del mismo los compuestos solubles.

Preferentemente, la maceración se lleva a cabo durante un tiempo de al menos 2 horas y de hasta 4 horas a temperatura ambiente, por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 18 y 35 °C.

El *Jasminum officinale* o jazmín blanco (o jazmín oficial) es un arbusto trepador, de la familia de las *Oleaceae*, de hoja caduca a semipersistente, que da una abundante floración perfumada durante todo el verano.

Las sumidades floridas de jazmín (que comprenden, como parte de la planta, la flor y van acompañadas de unos centímetros de tallo) se seleccionan preferentemente entre las sumidades floridas de una de las especies *Jasminum grandiflorum*, *Jasminum officinale*, *Jasminum odoratissimum*, *Jasminum sambac*, *Jasminum auriculatum*, *Jasminum flexile*, preferentemente *Jasminum officinale*. El jazmín pertenece preferentemente a la especie *Jasminum officinale*.

Las sumidades floridas de jazmín se usan ventajosamente enteras y secadas y dejadas en maceración en el extracto acuoso de *Palmaria palmata*.

El extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín así obtenido, tras la filtración, tiene un

contenido de materia seca comprendido entre 26,8 y 30,8 g/kg, una concentración de proteínas comprendida entre 1,3 y 2,3 g/kg y una concentración de azúcares (mayoritariamente xilosa) comprendida entre 25,3 y 29,3 g/kg.

El extracto se puede diluir seguidamente en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables tales como agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes. Preferentemente, el extracto se diluye en agua y xilitol a fin de obtener un extracto final con un 30 % en peso de xilitol. El extracto sinérgico de acuerdo con la invención se caracteriza, entonces, por una concentración de materia seca comprendida entre 280 y 320 g/kg, una concentración de azúcares comprendida entre 8 y 12 g/kg y un pH comprendido entre 4 y 5.

Un segundo objeto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín, que comprende las etapas siguientes según las cuales:

- se disuelve en agua una cantidad de *Palmaria palmata* en una relación másica agua / *Palmaria palmata* (en peso seco) comprendida entre 10/1 y 50/1;
- se hidroliza la solución acuosa de *Palmaria palmata* con una carbohidrasa y con una endoproteasa, a una temperatura comprendida entre 40 y 80 °C;
- se dejan macerar sumidades floridas de jazmín en el extracto acuoso de *Palmaria palmata* obtenido previamente; estando comprendida la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas entre 40/60 y 95/5.
- se filtra el macerado obtenido y después se calienta durante un periodo de 2 a 24 horas, a una temperatura comprendida entre 40 y 90 °C, para desactivar las enzimas carbohidrasa y endoproteasa.

De acuerdo con un modo de realización particular, el procedimiento de obtención de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín de acuerdo con la invención comprende las etapas siguientes según las cuales:

a) se disuelve en agua una cantidad de *Palmaria palmata* secada y finamente triturada en forma de escamas en una relación másica agua / *Palmaria palmata* comprendida entre 10/1 y 50/1, preferentemente entre 20/1 y 40/1.

b) se hidroliza la solución acuosa de *Palmaria palmata* con una carbohidrasa y una endoproteasa, preferentemente efectuada con una xilanasa y una bromelaína, a un pH comprendido entre 3 y 6, preferentemente entre 4 y 5,5, aún más preferentemente entre 4 y 4,5, a una temperatura comprendida entre 40 y 80 °C, preferentemente entre 50 y 60 °C, aún más preferentemente de 55 °C, durante un tiempo de al menos 1 hora, preferentemente 2 horas;

c) después de la adición opcional de un adyuvante de filtración y de una centrifugación, se obtiene un extracto acuoso de *Palmaria palmata*;

d) se dejan macerar, durante un tiempo de al menos 2 horas hasta un máximo de 4 horas a temperatura ambiente, sumidades floridas secas de jazmín en el extracto acuoso de *Palmaria palmata* obtenido en la etapa c); estando comprendida la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas entre 40/60 y 95/5. Preferentemente, la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas es igual a 90/10.

e) se filtra el macerado así obtenido en la etapa d) para recuperar un extracto de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín que se calienta durante al menos 2 horas y hasta 24 horas y, preferentemente, durante 12 horas o una noche, a una temperatura comprendida entre 40 y 90 °C, preferentemente a 80 °C, para desactivar las enzimas carbohidrasa y endoproteasa; y

f) se purifica opcionalmente mediante filtración para obtener el extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín.

A lo largo de la etapa d), las sumidades floridas de jazmín no se dejan necesariamente macerar en un medio que contiene un glicol o, más generalmente, un alcohol como el metanol; se prefiere usar un medio líquido a base de agua únicamente. Además, la etapa de maceración de las flores en el extracto acuoso de *Palmaria* no comprende necesariamente una etapa de hidrólisis enzimática, la cual se contempla a veces en la técnica anterior para extraer de las flores los compuestos fenólicos y glucídicos que contienen estas. Se lleva a cabo una hidrólisis enzimática del extracto acuoso de *Palmaria* antes de la adición de las flores de jazmín.

Después de las etapas b) y e), la solución obtenida puede estar turbia. Para eliminar los residuos sólidos en suspensión, se llevan a cabo etapas de centrifugación y de filtración. Se puede añadir a la mezcla un adyuvante de filtración tal como Celatom®, después se lleva a cabo una etapa de filtración para separar los sólidos de la fase líquida, eliminando los sólidos. A continuación se pueden efectuar varias etapas de filtraciones sucesivas a través de filtros con porosidad decreciente. El filtrado recogido constituye el extracto de *Palmaria palmata* rico en polisacáridos.

El filtrado resultante de la hidrólisis enzimática de *Palmaria palmata* y de la maceración de sumidades floridas de jazmín en el extracto de *Palmaria*, después de la desactivación de las enzimas residuales constituye una primera forma del extracto sinérgico activo de acuerdo con la invención, o primer filtrado. En esta fase, el primer filtrado, por ejemplo, tiene una concentración de materia seca comprendida entre 26,8 y 30,8 g/kg, un contenido de compuestos proteicos comprendido entre 1,3 y 2,3 g/kg y un contenido de azúcares comprendido entre 25,3 y 29,3 g/kg.

Este primer filtrado activo se puede diluir entonces en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables tales como agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes. En un modo de realización preferente, el primer filtrado activo se diluye en una mezcla de disolventes de modo que se obtiene un segundo filtrado o extracto final que contiene un 30 % de xilitol. El extracto sinérgico de acuerdo con la invención se puede preservar igualmente de las contaminaciones con benzoato de sodio al 0,5 %.

El segundo filtrado diluido en un disolvente se puede filtrar después en condiciones estériles, pasteurizar a baja temperatura, preferentemente a 65 °C toda una noche, para completar la esterilización.

De acuerdo con esta realización, se obtiene un filtrado final que constituye el extracto sinérgico de acuerdo con la invención. El extracto sinérgico obtenido de acuerdo con la invención se puede analizar cualitativamente y cuantitativamente, según técnicas convencionales bien conocidas por el experto en la técnica, a fin de determinar sus características físico-químicas y su contenido de compuestos.

Preferentemente, cuando el primer filtrado activo contiene un 30 % de xilitol, el extracto sinérgico de acuerdo con la invención se caracteriza por una concentración de materia seca comprendida entre 280 y 320 g/kg, una concentración de azúcares comprendida entre 8 y 12 g/kg y un pH comprendido entre 4 y 5.

El tercer objeto de la presente invención es una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, para luchar contra los signos del envejecimiento cutáneo, el extracto sinérgico de acuerdo con la invención, a una concentración comprendida entre un 0,0001 % y un 20 % en peso seco del peso total de la composición y, preferentemente a una concentración comprendida entre un 0,05 % y un 5 % en peso seco del peso total de la composición.

Por "fisiológicamente aceptable" se entiende que el extracto sinérgico de acuerdo con la invención, o una composición que contiene dicho agente, está adaptado para entrar en contacto con la piel o una membrana mucosa, sin provocar una reacción de toxicidad o de intolerancia.

El extracto sinérgico de acuerdo con la invención puede estar encapsulado o incluido en un vector cosmético o farmacéutico tal como un liposoma o cualquier otra microcápsula utilizada en el campo de la cosmética, o adsorbido sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales tales como talcos y bentonitas.

Estas composiciones se pueden presentar en particular en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa; de una emulsión aceite-en-agua, agua-en-aceite o emulsiones múltiples; se pueden presentar también en forma de cremas, suspensiones o incluso polvos, adaptados para una aplicación sobre la piel, las mucosas, los labios y/o los anexos. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, una loción, una leche, un suero, una pomada, un gel, una pasta o una espuma. Se pueden presentar también en forma sólida, tal como una barra, o se pueden aplicar sobre la piel en forma de aerosol. Se pueden usar como producto de cuidado para la piel y/o como producto de maquillaje de la piel.

Estas composiciones comprenden, además, cualquier aditivo añadido normalmente en el campo de la aplicación previsto así como los adyuvantes necesarios para su formulación, tales como disolventes, codisolventes (etanol, glicerol, alcohol bencílico), espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes del olor, ingredientes activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, oligoelementos, polímeros filmógenos, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes o aguas termales, polímeros tales como polisacáridos o polipéptidos, derivados de celulosa de tipo metilcelulosa o hidroxipropilcelulosa o incluso polímeros sintéticos, poloxámeros, carbómeros, siloxanos, PVA o PVP.

En todos los casos, el experto en la técnica se asegurará de que estos adyuvantes, así como sus proporciones, se seleccionen de modo que no perjudiquen las propiedades ventajosas deseadas de la composición de acuerdo con la invención. Estos adyuvantes pueden corresponder, por ejemplo, a un 0,01 a un 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de un 5 a un 80 % en peso, preferentemente de un 5 a un 50 % en peso con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes usados en la composición se seleccionarán entre los usados convencionalmente en el campo considerado. Por ejemplo, se pueden usar en una proporción que varía de un 0,3 a un 30 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición que se puede usar de acuerdo con la invención se podrá aplicar por cualquier vía adecuada, particularmente por vía oral o tópica externa, y la formulación de las composiciones la adaptará el experto en la técnica.

- 5 Ventajosamente, las composiciones de acuerdo con la invención se presentan en una forma adaptada a una aplicación por vía tópica. Estas composiciones deben contener, por tanto, un medio fisiológicamente aceptable, es decir, compatible con la piel y los anexos, y cubren todas las formas cosméticas.

- 10 Ventajosamente, la composición que se puede usar para realizar la invención puede comprender, además del agente activo de acuerdo con la invención, al menos otro agente activo que presente efectos cosméticos similares y/o complementarios a los de la invención. De acuerdo con la invención, este agente activo se definirá como "un agente activo adicional".

- 15 Por ejemplo, el agente o agentes activos adicionales se pueden seleccionar entre: agentes antienvjecimiento, reafirmantes, aclarantes, hidratantes, drenantes, favorecedores de la microcirculación, agentes farmacéuticos, exfoliantes, descamantes, estimulantes de la matriz extracelular, activadores del metabolismo energético, antibacterianos, antifúngicos, calmantes, antirradicales, anti-UV, antiacné, antiinflamatorios, anestésicos, productores de sensación de calor, productores de sensación de frío, adelgazantes.

- 20 Tales agentes adicionales se pueden seleccionar entre los grupos que comprenden.

- vitamina A y, en particular, ácido retinoico, retinol, propionato de retinol, palmitato de retinol,
- vitamina B3 y, más en particular, niacinamida, nicotinato de tocoferol,
- vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, pantenol,
- 25 - vitamina C, particularmente ácido ascórbico, ascorbil glucósido, tetrapalmitato de ascorbilo, ascorbil fosfato de magnesio y sodio,
- vitaminas E, F, H, K, PP, coenzima Q10,
- inhibidores de la metaloproteínasa, o un activador de los TIMP,
- DHEA, sus precursores y derivados,
- 30 - aminoácidos, tales como arginina, ornitina, hidroxiprolina, dipalmitato de hidroxiprolina, palmitoil glicina, hidroxilisina, metionina y sus derivados, compuestos N-acil aminoácidos,
- péptidos naturales o de síntesis, que incluyen di-, tri-, tetra-, penta- y hexapéptidos y sus derivados lipófilos, isómeros y complejos con otras especies tales como un ion metálico (por ejemplo cobre, zinc, manganeso, magnesio y otros). Por ejemplo, los péptidos conocidos comercialmente con el nombre MATRIXYL®,
- 35 ARGIRELINE®, COLLAXYL®, PEPTIDE VINCI 02®, CHRONOGEN®, LAMINIXYL IS®, PEPTIDE Q10®, el péptido sintético de secuencia Arg-Gly-Ser-NH₂, comercializado con el nombre ATPeptide®, el péptido sintético de secuencia Pro-Leu-Asp-Thr-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gln comercializado con el nombre SIRPeptide®.
- extractos de péptidos vegetales tales como extractos de soja, de espelta, de vid, de colza, de lino, de arroz, de maíz, de guisante,
- 40 - extractos de levadura, extractos de *Artemia Salina*,
- ácido deshidroacético (DHA),
- fitoesteroides de origen sintético o natural,
- ácido salicílico y sus derivados, alfa- y beta-hidroxiácidos, silanoles,
- aminoazúcares, glucosamina, D-glucosamina, N-acetil-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, manosamina, N-
- 45 acetil-manosamina, galactosamina, N-acetil galactosamina,
- extractos de polifenoles, isoflavonas, flavonoides, tales como extractos de uva, extractos de pino, extractos de olivas,
- lípidos tales como ceramidas o fosfolípidos, aceites de origen animal tales como escualeno y escualano; aceites vegetales tales como el aceite de almendras dulces, de copra, de ricino, de jojoba, de oliva, de colza, de cacahuete, de girasol, de germen de trigo, de germen de maíz, de soja, de algodón, de alfalfa, de adormidera, de calabaza, de onagra, de mijo, de cebada, de centeno, de cártamo, de pasiflora, de avellana, de palma, de hueso de albaricoque, de aguacate, de caléndula; aceites vegetales etoxilados, manteca de karité,
- 50 - protectores de UV y filtros solares.

- 55 Otro aspecto de la invención se refiere al uso cosmético de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín de acuerdo con la invención, para luchar contra los signos del envejecimiento de la piel, favoreciendo en particular el mantenimiento del carácter "madre" de las células madre dérmicas SKP adultas.

La invención se refiere a mamíferos y a seres humanos en particular.

- 60 Por "signos del envejecimiento cutáneo" se entiende cualquier modificación del aspecto exterior de la piel y de los anexos debida al envejecimiento intrínseco y extrínseco como, por ejemplo, arrugas y patas de gallo, marchitamiento, pérdida de firmeza, adelgazamiento, falta de elasticidad y/o de tono, deslustre y pérdida de resplandor, aunque también cualquier modificación interna de la piel que no se refleja sistemáticamente en un
- 65 aspecto exterior modificado como, por ejemplo, cualquier degradación interna de la piel que sigue a las agresiones externas tales como la radiación ultravioleta (UV). El agente activo de acuerdo con la invención, o la composición

que lo contiene, permitirán luchar en particular contra la pérdida de elasticidad, de flexibilidad y de firmeza de la piel.

Por "luchar contra los signos del envejecimiento cutáneo" se entiende retardar la aparición, reducir, mejorar el aspecto visual o, incluso, corregir tales signos. En particular, por "luchar contra los signos del envejecimiento cutáneo" se entiende mejorar las propiedades mecánicas de la piel, particularmente aumentar su firmeza, su flexibilidad y/o su elasticidad.

Asimismo, la invención se refiere también al uso cosmético de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín para mejorar la elasticidad de la piel.

La invención se refiere también al uso cosmético de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín para mejorar las propiedades elásticas de la piel.

El término "piel" de acuerdo con la invención engloba la piel y el conjunto de los anexos queratinicos presentes en la superficie del cuerpo, en particular vello, pestañas, cejas, uñas y cabellos.

La renovación permanente de la piel, aunque también su reparación después de un daño tal como por radiaciones UV o heridas, implican la existencia de células madre somáticas denominadas células madre dérmicas o SKP en la piel. Esta reserva de células madre disminuye durante el envejecimiento y tras las agresiones externas, disminuyendo la capacidad de renovación de la piel y contribuyendo a la aparición de signos del envejecimiento de la piel.

Por la expresión "agresión externa" se entiende las agresiones que puede producir el entorno. A modo de ejemplo, se pueden citar agresiones tales como la contaminación, las radiaciones ultravioleta o, incluso, los productos de carácter irritante tales como tensioactivos, conservantes o perfumes. Por contaminación, se entiende tanto la contaminación "externa" debida, por ejemplo, a las partículas de gasóleo, al ozono o a los metales pesados, como la contaminación "interna" que puede ser debida particularmente a las emisiones de disolventes, de pinturas, de colas, o de papeles pintados (tales como tolueno, estireno, xileno o benzaldehído) o, incluso, el humo de cigarrillo. La sequedad de la atmósfera es también una causa importante de desecación cutánea.

Sin embargo, los inventores han encontrado que el agente activo de acuerdo con la invención, de una forma sorprendente, protege las células SKP y refuerza su actividad. En efecto, el extracto de acuerdo con la invención permite un aumento sinérgico de los marcadores característicos del carácter "madre" de las células madre dérmicas, muy superior a la activación observada tras el tratamiento con un extracto de *Palmaria palmata* solo o con un extracto acuoso de sumidades floridas de jazmín solo.

El extracto sinérgico se podrá usar así, como agente activo, en una composición cosmética para prevenir o reparar los daños causados a la piel por el envejecimiento, acelerado opcionalmente por una exposición al sol o a un entorno desecante.

Así, un aspecto de la invención se refiere al uso cosmético de un extracto de sumidades floridas de jazmín obtenido por maceración de dichas sumidades en un extracto acuoso de *Palmaria palmata*, para mejorar al menos una de las condiciones de una zona de piel sana de una persona, seleccionadas entre el grupo que consiste en la firmeza de la piel, la elasticidad de la piel, la flexibilidad de la piel y la velocidad de renovación de la piel.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "uso cosmético" un empleo que no está destinado a un uso terapéutico. En el contexto de este empleo, el extracto se aplica a una parte de la piel de una persona que está sana. Una zona de piel sana puede ser caracterizada fácilmente por un dermatólogo, que no detecta en ella ninguna enfermedad, ninguna afección cutánea (psoriasis, eccema o acné) ni ninguna herida.

A lo largo del envejecimiento, la cantidad de colágeno disminuye globalmente, lo que conlleva una pérdida de firmeza de la piel. Este fenómeno se puede acelerar cuando la piel está sometida a agresiones externas tales como el frío o las radiaciones UV.

El envejecimiento de la piel se manifiesta por diferentes signos que tienen causas biológicas independientes entre sí, si bien es posible luchar contra el envejecimiento de la piel proponiendo ingredientes activos que intervienen sobre dianas particulares para inducir la disminución de un signo de envejecimiento particular.

Entre estas manifestaciones figuran la pérdida de firmeza, el aumento de la rigidez y de la pérdida de elasticidad. La principal causa de degradación de las propiedades mecánicas de la piel se basa en la disminución de la cantidad de colágeno en la matriz extracelular dérmica. Esta disminución es debida a varias causas diferentes e independientes entre sí, entre las cuales la degradación de las moléculas de colágeno por enzimas, la glicación de estas mismas moléculas y la disminución de la producción de colágeno por los fibroblastos.

Los ingredientes activos biológicos con efecto antienvjecimiento conocidos por el experto en la técnica que se incorporan en composiciones cosméticas inhiben la actividad de las colagenasas, responsables de la degradación

del colágeno. Otros ingredientes activos que inhiben el mecanismo de glicación del colágeno se han propuesto también en productos de cuidado cosmético. Estos ingredientes activos y estas composiciones cosméticas ralentizan la degradación y la desorganización de las fibras de colágeno. Tales productos no permiten aumentar ni la cantidad de proteínas dérmicas neosintetizadas ni el grado de renovación celular.

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de proporcionar ingredientes activos biológicos más eficaces para luchar contra los signos del envejecimiento cutáneo. El fin de la presente invención es proporcionar un nuevo extracto de origen vegetal que permita, no estabilizar la cantidad de colágeno en la piel a lo largo del tiempo, sino aumentar la expresión génica y/o proteica del colágeno y, en consecuencia, mejorar las propiedades mecánicas de la piel tales como la flexibilidad y la elasticidad

De acuerdo con uno de sus aspectos, la invención se refiere al uso del extracto descrito anteriormente, o preparado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, para luchar contra el envejecimiento de la piel, mediante un aumento de su nivel de flexibilidad, de su nivel de elasticidad y/o de su velocidad de renovación celular.

El aumento de la flexibilidad y la elasticidad de la piel producido por el extracto de la invención puede ir unido al aumento de la expresión de al menos una proteína de la matriz extracelular de la dermis seleccionada entre el colágeno, la tropoelastina y el procolágeno. El aumento de la expresión de al menos una proteína en la dermis corresponde al aumento de la expresión génica y/o la expresión proteica de dicha proteína. En una realización particular, el aumento de la firmeza y de la elasticidad de la piel es causado por los aumentos simultáneos de la síntesis de colágeno y de elastina, por ejemplo un aumento simultáneo de las síntesis de colágeno I, de colágeno III, de procolágeno I, de procolágeno III y de tropoelastina.

El aumento de la renovación celular de la piel se traduce en un aumento del número de células madre dérmicas y/o en la mejora de su funcionamiento, lo que permite restablecer la estructura del tejido conjuntivo dérmico que estaba deteriorada antes de la aplicación del extracto sinérgico. En un caso particular, la invención se dirige a restaurar o aumentar el carácter madre de las células madre dérmicas aumentando la expresión de uno al menos de los marcadores Nestina+, OCT4+, SOX2+, expresados por fibroblastos.

Más en particular, la invención tiene como objeto el uso cosmético de un extracto de sumidades floridas de jazmín obtenido por maceración de dichas sumidades en un extracto acuoso de *Palmaria palmata*, para luchar contra el envejecimiento de la piel aumentando la firmeza, la flexibilidad y/o la elasticidad de la piel. El aumento de la firmeza, de la flexibilidad y/o de la elasticidad puede ser inducido por el aumento de la síntesis de proteínas por los fibroblastos en la dermis.

La invención tiene también como objeto el uso cosmético de un extracto de sumidades floridas de jazmín obtenido por maceración de dichas sumidades en un extracto acuoso de *Palmaria palmata*, para aumentar la renovación celular de la dermis aumentando especialmente el carácter madre de las células madre dérmicas (SKP) y/o aumentando la cantidad de células madre dérmicas en la piel.

La presente invención se refiere también al uso cosmético, ventajosamente por vía tópica, del extracto descrito previamente, para aumentar la expresión de al menos una proteína de la dermis. El aumento de la expresión de una proteína en la dermis puede corresponder al aumento de la expresión génica y/o la expresión proteica de dicha proteína. Esta proteína se selecciona, por ejemplo, entre el colágeno, la tropoelastina y el procolágeno. El colágeno es preferentemente colágeno I o colágeno III. El procolágeno es preferentemente procolágeno I o procolágeno III. En un modo de realización particular, la invención se refiere al uso del extracto para aumentar de forma simultánea la expresión proteica de procolágeno I, la expresión proteica de colágeno III y la expresión proteica de tropoelastina.

El aumento de la expresión del colágeno de la dermis puede ser un aumento del nivel de expresión proteica del colágeno de al menos un 15 % con respecto al nivel de expresión proteica del colágeno medido en ausencia del extracto de acuerdo con la invención. Este aumento se mide preferentemente en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos y células madre dérmicas de tipo SKP o similar a SKP obtenidas a partir de fibroblastos de donante adulto, empleando una cantidad de extracto seco en peso del orden del 0,01 % del peso del equivalente de la dermis. Por ejemplo, se trata de un aumento del nivel de expresión proteica del procolágeno I y del colágeno III de al menos un 20 % en equivalentes de dermis, medido, por ejemplo, de acuerdo con un protocolo tal como el descrito en el ejemplo 3, empleando un método de inmunomarcaje con detección mediante observación con un microscopio de epifluorescencia, combinado opcionalmente con un aumento del nivel de expresión proteica de la tropoelastina de al menos un 15 % en equivalentes de dermis, medido, por ejemplo, de acuerdo con un protocolo tal como el descrito en el ejemplo 5, empleando un método de inmunomarcaje con detección mediante observación con un microscopio de epifluorescencia.

El aumento de la flexibilidad y/o de la elasticidad puede ser un aumento de al menos un 15 % con respecto al nivel de flexibilidad o, respectivamente, de elasticidad, de una muestra de piel medido antes de la aplicación del extracto de acuerdo con la invención. El aumento de la flexibilidad y la elasticidad de la piel se puede medir empleando un balistómetro en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos y células madre dérmicas de tipo SKP o similar a SKP, usando una cantidad de extracto equivalente a un peso seco del orden del 0,01 % en peso del peso del medio

de cultivo.

El método de balistometría consiste en seguir las oscilaciones de una bola que se deja caer desde una altura predeterminada sobre una muestra de piel. La profundidad de penetración de la bola al ser liberada (denominada indentación) permite medir la rigidez y, por tanto, la flexibilidad de la piel. En efecto, cuanto más profundamente penetra la bola, menor es la rigidez de la piel. La elasticidad se evalúa mediante el cálculo de la pendiente de la curva (denominada alfa) que une todos los vértices de los picos de oscilación. Cuanto más elástica es una piel, más rebotes efectúa la bola y menor es la pendiente.

El aumento de la flexibilidad, que se puede expresar también como la disminución de la rigidez es, por ejemplo, una disminución de la indentación de al menos un 15 % con respecto a la indentación medida antes de la aplicación del extracto de acuerdo con la invención, empleando un método de balistometría en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos y células madre dérmicas de tipo SKP o similar a SKP, en particular de acuerdo con el protocolo del ejemplo 6.

El aumento de la elasticidad es, por ejemplo, un aumento de al menos un 15 % de la pendiente alfa con respecto a la pendiente alfa medida antes de la aplicación del extracto de acuerdo con la invención, empleando un método de balistometría con equivalentes de dermis que contienen fibroblastos y células madre dérmicas de tipo SKP o similar a SKP, en particular de acuerdo con el protocolo del ejemplo 6.

El aumento de la renovación celular de la piel puede ser un aumento de la expresión de uno al menos de los marcadores Nestina, OCT4 y SOX2 en fibroblastos, medido mediante un método de PCR cuantitativa, en comparación con la cantidad de los ARNm de SOX2, Nestina y/o OCT4 expresados por células de fibroblastos cultivados *in vitro*, antes y después de la aplicación del extracto de la invención, usado en una cantidad equivalente a un peso seco del orden del 0,01 % en peso del medio de cultivo. Los aumentos de la expresión de los ARNm de SOX2, de Nestina y de OCT4 en fibroblastos son preferentemente de al menos un 250 %, de al menos un 100% y de al menos un 250 %, respectivamente.

La invención también tiene por objeto un método de cuidado cosmético que consiste en aplicar sobre la piel sana de un sujeto un extracto sinérgico tal como el descrito previamente para aumentar la firmeza, la flexibilidad y/o la elasticidad de la piel, o aumentar su velocidad de renovación.

Los modos de realización que son específicos para estos métodos de cuidado cosmético y para estos usos se deducen igualmente de la descripción anterior.

Otras ventajas y características de la invención se pueden ver con más detalle, con la lectura de los ejemplos ilustrativos no limitantes proporcionados.

En todas las Figuras, los valores numéricos que se han utilizado para la representación gráfica son los valores medios de tres mediciones. Las barras de errores se corresponden con los valores calculados RQmin y RQmax, basados en la desviación típica media: ***: Altamente significativo; **: Muy significativo, *: Significativo con la prueba de Dunnett.

Figura 1: qPCR de los ARNm de SOX2, Nestina y OCT4 después de la aplicación a los fibroblastos de diferentes extractos. Los valores numéricos que se han utilizado para la representación gráfica son los valores medios de tres mediciones. Las barras de errores se corresponden con los valores calculados RQmin y RQmax, basados en la desviación típica media: ***: Altamente significativo; **: Muy significativo, *: Significativo con la prueba de Dunnett.

Figura 2: Expresión de proteínas de la matriz extracelular (procolágeno I y colágeno III) después de la aplicación de un 1 % del extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1 a un equivalente de dermis que contiene células SKP. Los valores numéricos que se han utilizado para la representación gráfica son los valores medios de tres mediciones. Las barras de errores se corresponden con los valores calculados RQmin y RQmax, basados en la desviación típica media: ***: Altamente significativo; **: Muy significativo, *: Significativo con la prueba de Dunnett.

Figura 3: Expresión del colágeno III después de la aplicación de un 1 % del extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1 a un equivalente de dermis que contiene células similares a SKP. (media $\pm$ ETM; n = 6, 3 dermis por condición y 2 fotos por dermis equivalente). *: Significativo con la prueba "t" de Student - hipótesis unilateral.

Figura 4: Medida de la contracción de los equivalentes de dermis que contienen células similares a SKP, después de la aplicación de un 1 % del extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1. (media $\pm$ ETM; n = 3 dermis equivalentes). **: Muy significativo con la prueba "t" de Student - hipótesis unilateral.

Figura 5: Medición de la síntesis de las fibras de tropoelastina en equivalentes de dermis que contienen células similares a SKP, después de la aplicación de un 1 % del extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1. (media $\pm$ ETM; n = 10-12, 3-4 fotos por dermis equivalentes). *: Significativo con la prueba "t" de Student - hipótesis unilateral.

Figura 6: Medición de la rigidez y de la elasticidad de equivalentes de dermis que contienen células similares a SKP, después de la aplicación de un 1 % del extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1. (media $\pm$ ETM; n =

15, 5 mediciones por dermis equivalentes). *: Significativo con la prueba "t" de Student - hipótesis unilateral.

Figura 7: Fotografía de las observaciones por microscopía óptica (aumento x 40) antes y después de la activación de los marcadores SOX2 y Nestina, por el extracto sinérgico del ejemplo 1.

- 5 Todos los resultados expresados en los ejemplos siguientes son estadísticamente significativos de acuerdo con la prueba de Student o de Dunnett ($p < 0,05$).

Ejemplo 1: Preparación de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de jazmín

- 10 Se disuelven 180 g de *Palmaria palmata* en forma de escamas en 4 kg de agua y el pH se ajusta a un valor comprendido entre 4,5 y 5,5 con HCl.

A fin de extraer los azúcares de *Palmaria palmata*, se efectúa una hidrólisis empleando una hidrolasa y una proteasa. Para tal fin, se añaden 7,2 g de xilanas y 3,6 g de bromelaina al medio de reacción. A continuación se calienta el medio de reacción dos horas a 55 °C.

- 15 Una etapa de filtración permite descartar el residuo sólido para conservar solamente el filtrado rico en carbohidratos. Para ello, se añaden 10 g/kg de CELATOM® (adyuvante de filtración) y la solución se centrifuga 10 minutos a 4000 r.p.m. Después de la centrifugación, se elimina el sólido residual y el filtrado seguidamente se clarifica más o menos mediante filtración a través de un filtro de celulosa.

En una segunda etapa, se añaden 20 g de flores de *Jasminum officinale* al filtrado de aproximadamente 3,6 kg obtenido y se efectúa una maceración durante 2 horas a temperatura ambiente.

- 25 Se añaden 10 g/kg de CELATOM® a la mezcla y el sólido se separa del filtrado mediante filtración.

El filtrado (resultante de la hidrólisis enzimática de *Palmaria palmata* y de la maceración de sumidades floridas de jazmín) se calienta seguidamente durante una noche a 80 °C para desactivar las enzimas residuales.

- 30 La solución se purifica después mediante filtración con filtros de porosidad decreciente para obtener una solución transparente brillante, de color ámbar.

El extracto sinérgico obtenido se caracteriza por una materia seca de $28,8 \pm 2,0$ g/Kg, un contenido de proteínas de $1,8 \pm 0,5$ g/kg y un contenido de azúcares de $27,3 \pm 2,0$ g/kg.

- 35 A continuación la solución se diluye con agua y se filtra en condiciones estériles, después se pasteuriza a baja temperatura (65 °C durante una noche) para finalizar la esterilización.

- 40 El producto final correspondiente al extracto sinérgico activo es una solución transparente de color amarillo pálido caracterizado por: una materia seca de $10 \pm 3,0$ g/kg, un contenido de azúcares comprendido entre 8 y 12 g/kg y un pH entre 4 y 5.

Ejemplo 2: Evaluación de los ARNm de SOX2, Nestina y OCT4 después de la aplicación de un extracto sinérgico de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con un extracto de *Palmaria palmata* de referencia y con un extracto de sumidades floridas de jazmín de referencia.

- 45 El fin de este estudio es comparar la cantidad de ARNm de SOX2, de Nestina y de OCT4 expresado por las células después de un tratamiento con un extracto de jazmín de referencia, con un extracto de *Palmaria palmata* de referencia y por el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1.

- 50 La tasa de ARNm de SOX2, de Nestina y de OCT4 se evaluó mediante PCR cuantitativa (q-PCR).

Se prepararon también un extracto derivado de sumidades floridas de jazmín solas y un extracto derivado de *Palmaria palmata* solo con el fin de efectuar ensayos comparativos de eficacia biológica.

- 55 Se tuvo cuidado de preparar los extractos de referencia y el extracto sinérgico en las mismas condiciones (misma tasa de materia vegetal seca/kg de agua, mismo pH, mismas condiciones de filtración y de clarificación).

Preparación de un extracto de jazmín de referencia

- 60 Se disponen 20 g de sumidades floridas de *Jasminum officinale* secas en 1 kg de agua y se dejan macerar 2 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación se llevan a cabo filtraciones sucesivas empleando filtros de porosidad decreciente (de 20-50 µm a 0,3-0,5 µm) a fin de descartar los residuos sólidos y de clarificar el extracto.

- 65 El extracto obtenido se caracteriza por una materia seca de $5 \pm 0,5$ g/kg. Seguidamente el extracto se diluye en agua a una concentración final de $3 \pm 0,5$ g/kg de materia seca. El pH se ajusta a 4. El extracto se somete después a una

filtración esterilizante a través de un filtro de 0,2 µm y se deja a 65 °C durante una noche a fin de efectuar una pasteurización a baja temperatura para finalizar la esterilización.

Preparación de un extracto de *Palmaria palmata* de referencia:

Se disuelven 50 g de *Palmaria palmata* en forma de escamas en 1 kg de agua. Se efectúa una hidrólisis empleando 2 g de xilanasa y 1 g de bromelaína, añadidas al medio de reacción. A continuación se calienta el medio de reacción dos horas a 55 °C. Una etapa de filtración permite descartar el residuo sólido para conservar solamente el filtrado rico en carbohidratos. Para ello, se añaden 10 g/kg de Celatom® (adyuvante de centrifugación) y la solución se centrifuga 10 minutos a 4000 r.p.m. Después de la centrifugación, el sólido residual se elimina y el sobrenadante se clarifica seguidamente mediante filtración a través de un filtro de porosidad decreciente, hasta 7-20 µm de porosidad, y se deja a 80 °C durante la noche. Al día siguiente el extracto se filtra de nuevo a través de un filtro de porosidad decreciente, hasta 0,3-0,5 µm. El extracto obtenido se caracteriza por una materia seca de 30 ± 2 g/kg. Seguidamente el extracto se diluye en agua a fin de obtener 20 ± 2 g/kg de materia seca. El pH se ajusta entonces a 4-4,5.

El extracto se somete después a una filtración esterilizante a través de un filtro de 0,2 µm y se deja a 65 °C durante una noche a fin de efectuar una pasteurización a baja temperatura para finalizar la esterilización.

Protocolo de evaluación de los ARNm: Se tratan fibroblastos humanos normales con los diferentes extractos preparados anteriormente y diluidos al 1 % (v/v) en el medio de cultivo (.). En paralelo, se mantienen cultivos de fibroblastos sin tratamiento, a fin de constituir un control no tratado. Este cultivo se desarrolla a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂.

A la salida de esta incubación, se extraen los ARN totales con el minikit RNeasy (QIAGEN, 74104) y los transcritos inversos con el kit High Capacity cDNA Reverse-Transcription que contiene inhibidores de ARNasas (Applied Biosystems, 4368814). La PCR cuantitativa se efectúa utilizando un termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Los cebadores y sondas de las dianas SOX2, Nestina y OCT4 así como los del control endógeno 18S se obtienen de Taqman Expression Assays (Applied Biosystems, Hs99999901_s1 para 18S; Hs01053049_s1 para SOX2, Hs00707120_s1 para Nestina y Hs00999632_g1 para OCT4), diluidos en agua estéril y Master Mix (Applied Biosystems).

Resultados:

Los resultados, tales como los presentados en la Figura 1, muestran un aumento estadísticamente significativo de un 29 %, un 26 % y un 34 %, respectivamente, de la expresión de los ARNm de SOX2, Nestina y OCT4 en los fibroblastos tratados con un 1 % del extracto de *Palmaria palmata* de referencia, en comparación con el control no tratado.

No se ha observado ninguna estimulación con el extracto de jasmín solo.

En el caso en el que los fibroblastos se han tratado con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a un 1 %, los resultados muestran que los aumentos son sensiblemente mayores que los observados anteriormente con el extracto de *Palmaria palmata* de un 296 % para la expresión de los ARNm de SOX2, de un 123 % para la expresión de los ARNm de Nestina y de un 285 % para la expresión de los ARNm de OCT4, respectivamente, en comparación con el control no tratado.

Conclusión:

Se observa una tasa mayor de los ARNm de SOX2, Nestina y OCT4 en los fibroblastos pretratados con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con las células de control no tratadas, con el extracto de jasmín de referencia y con el extracto de alga de referencia. El extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 permite aumentar de forma sinérgica los marcadores característicos del carácter "madre" de las células madre dérmicas.

Ejemplo 3: Demostración del efecto activador del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión del procolágeno I y del colágeno III en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos humanos y células SKP

El fin de este estudio es determinar la influencia del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, sobre la expresión de las proteínas de la matriz extracelular siguientes: procolágeno I y colágeno III.

Para ello, se han efectuado marcajes específicos a partir de equivalentes de dermis reconstruidos constituidos por colágeno I bovino polimerizado, fibroblastos humanos y células madre SKP.

Protocolos de inmunomarcajes: Se extraen fibroblastos humanos a partir de explantes de piel de donantes adultos.

Las células SKP usadas en este experimento provienen de piel de prepucio. Las células SKP en cultivo son pretratadas dos veces al día con el extracto de acuerdo con el ejemplo 1 diluido al 1/100 en medio de cultivo (es decir, un 1 % volumen/volumen) durante 7 días. Puesto que el extracto obtenido en el ejemplo 1 tiene un peso seco de aproximadamente 10 g/kg, se ha ensayado, por tanto, el extracto a aproximadamente un 0,01 % en peso del peso del medio de cultivo. En este modelo, las células madre se estimulan con el extracto antes de la incorporación en los equivalentes dérmicos, a fin de asegurar un efecto directo del extracto (En paralelo, se mantienen cultivos de células SKP sin tratamiento, a fin de constituir un control de células SKP no tratado. Este cultivo se desarrolla a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂.

Los equivalentes de dermis se han preparado mezclando una solución de colágeno de tipo I bovino en la que se introducen las células SKP, cultivadas en forma de esferas, y los fibroblastos suspendidos en un medio de cultivo de según una proporción respectiva de 1 esfera de células SKP por 10000 fibroblastos. La mezcla se homogeneiza cuidadosamente y se distribuye en los pocillos de una placa de 6 pocillos. Se produce una polimerización del colágeno I y permite la formación de un equivalente de dermis. Los equivalentes de dermis son tratados dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, a una concentración de un 1 % con respecto al volumen del medio, durante 5 días y mantenidos a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂.

Las muestras se fijan con un 10 % de paraformaldehído y se incluyen en parafina después de una sucesión de baños de etanol y de xileno (Shandon).

Los inmunomarcajes se efectúan sobre cortes de 4 µm de espesor.

Para el procolágeno I, los tejidos se someten a desenmascarado con microondas a 600 W en un tampón de citrato 0,01 M pH 6 (Sigma), seguido de un tratamiento enzimático con pepsina al 0,25 % (15 min a 37 °C; Zymed, Invitrogen).

Con relación al tratamiento de los cortes de tejidos para el inmunomarcaje de colágeno III, se efectúa un desenmascarado con microondas a 600 W, seguido de un tratamiento enzimático con tripsina al 0,5 % (15 min a 37 °C, Zymed, Invotrogen).

Después de 30 min de saturación, los cortes se incuban en presencia de un anticuerpo monoclonal de ratón específico del procolágeno I (Millipore), de un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno III (Rockland), después de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a un fluorocromo (Invitrogen) o anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen). Los cortes de equivalentes de dermis se examinan entonces al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse 80i).

Se analizan cuantitativamente tres fotos por condición con el software de análisis de imágenes Velocity (Improvision).

Los análisis estadísticos son efectuados por el software JMP (SAS).

Resultados:

Los resultados, tales como los presentados en la Figura 2, han mostrado un aumento significativo de un 18 % y un 23 % de la expresión de las proteínas de colágeno I neosintetizadas y de colágeno III en los equivalentes de dermis no tratados que contienen células SKP, con respecto al control no tratado y que no contiene células SKP.

El tratamiento con un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, de muestras de un equivalente de dermis que contienen las células SKP, ha provocado el aumento de un 25 % y un 29 %, respectivamente, del procolágeno I y del colágeno III, en comparación con el control con células SKP y no tratado.

Conclusiones:

La aplicación de un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a muestras de equivalentes de dermis que contienen las células madre dérmicas SKP estimula la expresión del procolágeno I y del colágeno III.

Ejemplo 4: Demostración del efecto activador del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la contracción dérmica y la expresión del colágeno III, en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos humanos y células similares a SKP

Wenzel *et al.* (*Biology Open*. 1: 516-526, 2012) y Hill *et al.* (*Plos One*, noviembre 2012, Vol. 7, Número 11, e50742) han demostrado que se podían aislar células similares a SKP después de un estrés por frío aplicado *in vitro* a fibroblastos de donantes adultos.

El fin de este estudio es determinar la influencia del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la

contracción de equivalentes de dermis y sobre la expresión del colágeno III en equivalentes de dermis de colágeno que contienen fibroblastos y células similares a SKP obtenidas a partir del mismo donante.

La contracción de los equivalentes de dermis es un proceso asociado a la actividad contráctil de los fibroblastos que se unen a las microfibrillas de colágeno, las orientan en una misma dirección y densifican la matriz extracelular. Al cabo de unos días el diámetro se estabiliza. Se han efectuado marcajes específicos a partir de equivalentes de dermis reconstruidos para seguir la síntesis de proteínas específicas de la matriz extracelular.

Protocolo: Se trataron fibroblastos humanos a partir de un explante de piel de donante adulto. Una porción de estos fibroblastos en cultivo se sometió a un estrés por frío (4 °C durante una noche) a fin de generar células similares a SKP. Las células que presentan las mismas características que las células SKP así obtenidas se denominan en este caso "células similares a SKP". Las células similares a SKP en cultivo usadas en este experimento se trataron dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 diluido al 1/100 en medio de cultivo (es decir, un 1 % volumen/volumen) durante 6 días. En paralelo, se mantienen cultivos de células similares a SKP sin tratamiento, a fin de constituir un control de células similares a SKP no tratado. Este cultivo se desarrolla a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂.

Se prepararon los equivalentes de dermis con una mezcla de colágeno de tipo I bovino en la que se introducen las células similares a SKP, cultivadas en forma de esferas multicelulares. Las células similares a SKP y los fibroblastos se incluyeron en una proporción de 1 esfera por 10 000 fibroblastos. La mezcla matriz de colágeno I / células se distribuye en los pocillos de una placa de 6 pocillos. Los equivalentes de dermis, una vez polimerizados, se cultivan en forma flotante en el medio. Los equivalentes de dermis se tratan dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, a una concentración del 1 %, durante 5 días y mantenidos a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂. Puesto que el extracto del ejemplo 1 tiene un peso seco de aproximadamente 10 g/kg, se ha ensayado, por tanto, el extracto a aproximadamente un 0,01 % en peso del peso del medio de cultivo.

Cada día y para 3 equivalentes de dermis por condición, la contracción dérmica, que se traduce en una disminución del diámetro de los equivalentes de dermis, se controla tomando fotografías en el cultivo y cuantificándola después con el software de análisis de imágenes (Imagen J).

Una vez finalizado el cultivo, los tejidos se fijan con un 10 % de paraformaldehído y se incluyen en parafina después de una sucesión de baños de etanol y de xileno (Shandon).

El inmunomarcaje se efectúa sobre cortes de 4 µm de espesor.

Para el colágeno III, los cortes se someten a un desenmascarado con microondas seguido de un tratamiento enzimático con tripsina al 0,5 % (15 min a 37 °C, Zymed, Invotrogen). Después de 30 min de saturación, los cortes se incuban en presencia de un anticuerpo policlonal de conejo específico del colágeno III (Rockland), después de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen). Los cortes de equivalentes de dermis se examinan entonces al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse 80i).

Se analizan tres fotos por condición con el software de análisis de imágenes Volocity (Improvision).

Los análisis estadísticos son efectuados por el software JMP (SAS).

Resultados: Los resultados, tales como los presentados en la Figura 3, han mostrado un aumento significativo de un 29 % de la expresión de las proteínas de colágeno III en los equivalentes de dermis tratados con un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con el control no tratado con células similares a SKP.

El análisis del diámetro de los equivalentes de dermis, tales como los presentados en la Figura 4, ha mostrado un aumento muy significativo de la contractilidad del equivalente de dermis después de 4 días de tratamiento con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con el control no tratado con células similares a SKP.

Conclusiones: La aplicación de un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a los equivalentes de dermis que contienen las células "madre" dérmicas (Células similares a SKP) obtenidos a partir de fibroblastos de donante adulto mejora la contractilidad del tejido y estimula la expresión del colágeno III.

Ejemplo 5: Demostración del efecto activador del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la síntesis de fibras de tropoelastina, en equivalentes de dermis que contienen fibroblastos humanos y células similares a SKP

El fin de este estudio es determinar la influencia del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la síntesis de fibras de tropoelastina en equivalentes de dermis de colágeno que contienen fibroblastos y células

similares a SKP obtenidas a partir del mismo donante. Se han efectuado un inmunomarcaje a partir de equivalentes de dermis reconstruidos para seguir la síntesis de fibras de tropoelastina a partir de fibroblastos.

Protocolo: Se han preparado equivalentes de dermis de colágeno que contienen fibroblastos y células similares a SKP obtenidos a partir del mismo donante siguiendo el mismo protocolo que se especifica en el ejemplo 5, con excepción de los tratamientos. En efecto, las células similares a SKP usadas en este experimento se tratan dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 diluido al 1/100 en medio de cultivo (es decir, un 1 % volumen/volumen), durante 5 días. Los equivalentes de dermis se tratan dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, a una concentración del 1 %, durante 6 días. Puesto que el extracto obtenido en el ejemplo 1 tiene un peso seco de aproximadamente 10 g/kg, se ha ensayado, por tanto, el extracto a aproximadamente un 0,01 % en peso del peso del medio de cultivo.

Una vez finalizado el cultivo, los tejidos se fijan con un 10 % de paraformaldehído y se incluyen en parafina después de una sucesión de baños de etanol y de xileno (Shandon).

El inmunomarcaje se efectúa sobre cortes de 4 µm de espesor.

Los cortes se someten a un desenmascarado mediante un tratamiento enzimático con tripsina al 0,5 % (15 min a 37 °C, Zymed, Invotrogen). Después de 30 min de saturación, los cortes se incuban en presencia de un anticuerpo policlonal de conejo específico de la tropoelastina (Abcam), después de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen). Los cortes de equivalentes de dermis se examinan entonces al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse 80i).

Se analizan de diez a doce fotos por condición. Se efectúa un recuento del número de células de fluorescencia elevada así como del número de células totales.

Los análisis estadísticos son efectuados por el software JMP (SAS).

Resultados: Los resultados, tales como los presentados en la Figura 5, han mostrado un aumento significativo del 19 % de la síntesis de fibras de tropoelastina en los equivalentes de dermis tratados con un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con el control no tratado con células similares a SKP.

Conclusiones: La aplicación de un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a los equivalentes de dermis que contienen las células "madre" dérmicas (Células similares a SKP) obtenidos a partir de fibroblastos de donante adulto, mejora la síntesis de fibras elásticas.

Ejemplo 6: Demostración del efecto activador del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre las propiedades elásticas de los equivalentes de dermis que contienen fibroblastos humanos y células similares a SKP

El fin de este estudio es determinar la influencia del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre las propiedades elásticas de equivalentes de dermis de colágeno que contienen fibroblastos y células similares a SKP obtenidas a partir del mismo donante. El balistómetro de referencia BLS780 (Monaderm) es un aparato que permite determinar la elasticidad y la rigidez de la piel. Está provisto de un software que define automáticamente los parámetros de las mediciones.

Protocolo: Se prepararon equivalentes de dermis de colágeno que contienen fibroblastos y células similares a SKP obtenidos a partir del mismo donante siguiendo el mismo protocolo que se especifica en el ejemplo 4, con excepción de los tratamientos. En efecto, las células similares a SKP usadas en este experimento se trataron dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 diluido al 1/100 en medio de cultivo (es decir, un 1 % volumen/volumen durante 5 días. Los equivalentes de dermis se tratan dos veces al día con el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, a una concentración del 1 %, durante 10 días). Puesto que el extracto obtenido en el ejemplo 1 tiene un peso seco de aproximadamente 10 g/kg, se ha ensayado, por tanto, el extracto a aproximadamente un 0,01 % en peso del peso del medio de cultivo.

Metodología: Se sitúa una sonda sobre el equivalente de dermis. Una bola se libera de la sonda y penetra con una fuerza constante, predeterminada por el aparato, y rebota en la superficie de la piel. Después efectúa oscilaciones antes de estabilizarse. La profundidad de penetración de la bola al ser liberada (denominada indentación) permite medir la rigidez de la piel. En efecto, cuanto más profundamente penetra la bola, más blando es el tejido y, por tanto, tiene una menor rigidez. El segundo criterio es la pendiente de la curva que une todos los vértices de los picos (denominada alfa) y que permite determinar la elasticidad de la piel. En el caso de una piel muy elástica, la bola efectúa más rebotes y, por tanto, la pendiente es menor.

Resultados: Los resultados, tales como los presentados en la Figura 6, han mostrado un aumento significativo de un 19 % de la elasticidad de los equivalentes de dermis tratados con un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo

con el ejemplo 1, en comparación con el control no tratado con células similares a SKP. En paralelo, se ha observado una disminución significativa del 17 % de la rigidez de los equivalentes de dermis en comparación con el control.

- 5 **Conclusiones:** La aplicación de un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a los equivalentes de dermis que contienen las células "madre" dérmicas (Células similares a SKP) obtenidos a partir de fibroblastos de donante adulto, mejora las propiedades elásticas y la flexibilidad de los equivalentes de dermis.

Ejemplo 7: Ejemplos de composiciones cosméticas que contienen el extracto sinérgico de la invención

A- SUERO

Ingredientes (Nombre comercial / INCI)		% p/p	Proveedor
Fase A			
Agua purificada	Agua/Aqua	c.s. 100	
Pemulen* TR-2	Polímero entrecruzado Acrilatos/Acrilato de alquilo C10-30	0,30	Lubrizol
Conservante Optiphen®	Fenoxietanol (y) Caprililglicol	1,50	Ashland
Conservante metilparabeno	Metilparabeno	0,20	Ashland
Fase B			
Éster Ceraphyl® 230	Adipato de diisopropilo	2,00	Ashland
Éster Ceraphyl® SLK	Neopentanoato de isodecilo	4,00	Ashland
Éster Cerasynt® 945	Estearato de glicerilo (y) Laureth-23	1,00	Ashland
Ceteareth-20	Ceteareth-20	2,00	
Manteca de karité refinada	Manteca de <i>Butyrospermum Parkii</i> (karité)	1,50	Ashland
Fase C			
Trietanolamina	Trietanolamina	0,20	
Agua purificada	Agua/Aqua	5,00	
Fase D			
Si-Tec® RE-100	Ciclopentasiloxano (y) Dimeticona/Viniltrimetilsiloxisilicato	3,00	Ashland
Hidrogel Lubrajel* II XD	Agua/Aqua (y) Glicerina (y) Poliacrilato de glicerilo	2,00	Ashland
CM 1000	Ciclopentasiloxano (y) Dimeticonol	2,00	Wacker-Belsil
Extracto sinérgico de acuerdo con el Ejemplo 1		1,50	Ashland
BPD 500*	Polímero entrecruzado HDI/Trimetilol Hexil-lactona (y) Sílice	0,50	Kobo Products
Total		100,00	

Protocolo de preparación:

Se añade agua al recipiente principal. Se calienta con homogeneización suave.

Se vierte lentamente el Pemulen TR-2 en agua y se mezcla hasta una rehidratación completa. Se mantiene la temperatura entre 70 °C y 75 °C.

Cuando el polímero se ha mezclado por completo, sin ningún grumo, se añaden los conservantes uno a uno con mezcla.

En un segundo recipiente, se mezcla la fase B y se calienta a 75 °C. Se añade la Fase B al recipiente principal con homogeneización.

Se enfría a 60 °C -65 °C y se añade la Fase C premezclada.

Se enfría a 40 °C -45 °C y se añaden los ingredientes de la Fase D, uno a uno, con mezcla entre cada adición.

Se enfría con agitación hasta temperatura ambiente (25 °C).

B - Crema de noche

Ingredientes (Nombre comercial / INCI)		% p/p	Proveedor
Fase A			
Agua purificada	Agua/Aqua	c.s. 100	

(continuación)

Ingredientes (Nombre comercial / INCI)		% p/p	Proveedor
Versene* NA2	EDTA disódico	0,10	Dow
Butilenglicol	Butilenglicol	3,00	
Glicerina	Glicerina	1,00	
Fase B			
Arlacel* 165	Estearato de glicerilo (y) Estearato de PEG-100	4,80	Croda
Alcohol behenílico	Alcohol behenílico	1,50	
Alcohol cetílico	Alcohol cetílico	2,50	
Lanette* 18	Alcohol estearílico	1,00	BASF
Éster Ceraphyl® 375	Neopentanoato de isoestearilo	2,00	Ashland
Éster Ceraphyl 494	Estearato de isocetilo	5,00	Ashland
Éster Cerasynt 368	Palmitato de etilhexilo	2,40	Ashland
Gel laminar ProLipid® 141	Estearato de glicerilo (y) Alcohol behenílico (y) Ácido palmítico (y) Ácido esteárico (y) Lecitina (y) Alcohol laurílico (y) Alcohol miristílico	1,00	Ashland
Dow Corning 200 Fluid-100 cst*	Dimeticona	0,50	Dow Corning
Floraesters 70	Ésteres de jojoba	0,50	Floratech
Fase C			
Polímero Carbopol* 940	Carbómero	0,30	Lubrizol
Fase D			
TEA 99 %	Trietanolamina	0,30	
Agua purificada	Agua/Aqua	5,00	
Fase E			
Conservante LiquaPar®/Rokonsal® Optima	Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) isopropilparabeno (y) butilparabeno (y) isobutilparabeno	1,00	Ashland
Extracto sinérgico de acuerdo con el Ejemplo 1		3,00	Ashland
Fase F			
BPD 500*	Polímero entrecruzado HDI/Trimetilol Hexil-lactona (y) Sílice	0,25	Kobo Products
Flamenco Satina*	Mica (y) Óxido de titanio	0,50	BASF
FD&C Rojo 40 07700-C (Sol. 0,1 %)	Agua/Aqua (y) CI 16035 (Rojo 40)	0,20	
Total			

Protocolo:

- 5 Se añade agua al recipiente principal con homogeneización suave. Se añade el resto de ingredientes de la Fase A uno a uno y se calienta a 70 °C-75 °C con mezcla.

En un segundo recipiente se mezclan los ingredientes de la Fase B y se calienta a 75 °C con mezcla.

- 10 Se añade la Fase B (70 °C-75 °C) a la Fase A (70 °C-75 °C) utilizando agitación fuerte (10 minutos). Se comienza a enfriar.

A 60 °C-65 °C, se espolvorea la Fase C en la mezcla. Se mezcla bien para obtener una hidratación completa del polímero (opcionalmente se aumenta la velocidad de mezcla).

- 15 Se premezcla la Fase D; se añade a la mezcla y se combina el conjunto con cuidado a fin de obtener una mezcla uniforme. La mezcla se espesa. Se continúa el enfriamiento.

- 20 Se enfría con agitación lenta hasta 40 °C. Se añaden los ingredientes de la Fase E uno a uno agitando bien entre cada adición.

A temperatura ambiente, se añade la Fase F. Se mezcla bien. Se finaliza a 25 °C.

C - Crema detoxificante

- 25
- | Ingredientes (Nombre comercial / INCI) | | % p/p | Proveedor |
|--|--|-------|-----------|
| Fase A | | | |

(continuación)

Ingredientes (Nombre comercial / INCI)		% p/p	Proveedor
Agua purificada	Agua/Aqua	c.s. 100	
Versene* NA2	EDTA disódico	0,10	Dow
Fase B			
Arlacel* 165	Estearato de glicerilo (y) Estearato de PEG-100	4,00	Croda
Lanette* 16	Alcohol cetílico	1,50	BASF
Éster Ceraphyl® 375	Neopentanoato de isoestearilo	2,00	Ashland
Éster Ceraphyl 230	Adipato de diisopropilo	4,00	Ashland
Éster Ceraphyl 368	Palmitato de etilhexilo	3,00	Ashland
Gel laminar ProLipid® 141	Estearato de glicerilo (y) Alcohol behenílico (y) Ácido palmítico (y) Ácido esteárico (y) Lecitina (y) Alcohol laurílico (y) Alcohol miristílico (y) Alcohol cetílico	0,50	Ashland
Fase C			
Polímero RapiThix® A-60	Poliacrilato sódico (y) Polideceno hidrogenado (y) Trideceth-6	1,00	Ashland
Hidrogel Lubrajel* II XD	Agua/Aqua (y) Glicerina (y) Poliacrilato de glicerilo	2,50	Ashland
Fase D			
Conservante Germaben® II	Propilenglicol (y) Diazolinilurea (y) Metilparabeno (y) Propilparabeno	1,00	Ashland
Biofuncional Prolixir S20®	Agua (y) Butilenglicol (y) Dímero Tripéptido-43	1,00	Ashland
Extracto sinérgico de acuerdo con el Ejemplo 1		1,00	Ashland
Total		100,00	

Protocolo:

- 5 Se añade agua al recipiente principal con homogeneización suave. Se añade el Versene y se mezcla hasta disolución completa. Se calienta a 70 °C-75 °C.

En un segundo recipiente se mezclan los ingredientes de la Fase B y se calienta a 70 °C-75 °C con mezcla.

- 10 A 75 °C, se añaden la Fase B y la Fase A con fuerte agitación durante 10 minutos. Se comienza a enfriar.

Se enfría a 60 °C-65 °C y se añaden los ingredientes de la Fase C, uno a uno, con mezcla entre cada adición.

Se enfría a 40 °C-45 °C y se añaden los ingredientes de la Fase D, uno a uno, con mezcla entre cada adición.

- 15 Se enfría con agitación lenta hasta temperatura ambiente. Se finaliza a 25 °C.

Ejemplo 8: Demostración del efecto activador del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión proteica de los marcadores SOX2, OCT4 y Nestina en células similares a SKP

- 20 El fin de este estudio es determinar la influencia del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, sobre la expresión de proteínas características de las células madre: SOX2, OCT4 y Nestina.

Para ello, se han efectuado marcajes específicos en sedimentos de células similares a SKP incluidos en parafina.

- 25 Protocolos de los inmunomarcajes: Se aislaron células similares a SKP a partir de fibroblastos humanos extraídos a partir de explantes de piel de donantes adultos. Las células similares a SKP se tratan dos veces al día con el extracto de acuerdo con el ejemplo 1 diluido al 1/100 en medio de cultivo (es decir, un 1 % volumen/volumen) durante 2 días. Puesto que el extracto obtenido en el ejemplo 1 tiene un peso seco de aproximadamente 10 g/kg, se ha ensayado, por tanto, el extracto a aproximadamente un 0,01 % en peso del peso del medio de cultivo. Este cultivo se desarrolla a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂.

- 30 Al final del cultivo, las células similares a SKP se preparan en sedimento celular, se fijan con un 10 % de paraformaldehído y se incluyen en parafina después de una sucesión de baños de etanol y de xileno (Shandon).

- 35 Los inmunomarcajes se efectúan sobre cortes de 4 µm de espesor.

Para los tres inmunomarcajes, los cortes se someten a un desenmascarado con microondas a 600 W en un tampón de citrato 0,01 M pH 6 (Sigma). Después de 30 min de saturación, los cortes se incuban en presencia de un

anticuerpo monoclonal de ratón específico de Nestina (Abcam), de un anticuerpo policlonal de conejo específico de OCT4 o de SOX2 (Abcam), después de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a un fluorocromo (Invitrogen) o anti-conejo acoplado a un fluorocromo (Invitrogen). Los cortes de células similares a SKP se examinan entonces al microscopio de epifluorescencia (microscopio Nikon Eclipse 80i).

5

Resultados:

Las observaciones microscópicas (aumento x 40) han mostrado un aumento significativo de la intensidad de los marcajes de SOX2, OCT4 y Nestina en las condiciones en las que se ha aplicado el extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con el no tratado. La Figura 7 reproduce las fotografías obtenidas para los marcajes de SOX2 y Nestina.

10

Conclusiones:

La aplicación de un 1 % del extracto sinérgico obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a células similares a SKP estimula la expresión de los marcadores de células madre SOX2, OCT4 y Nestina.

15

REIVINDICACIONES

1. Extracto sinérgico del alga *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum*, extracto que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende i) una etapa de preparación de un extracto acuoso del alga *Palmaria palmata* seguida de ii) una etapa de maceración de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* en dicho extracto acuoso, estando comprendida la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas, usadas las dos como materia prima para preparar el extracto sinérgico, entre 40/60 y 95/5.
2. Extracto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas está comprendida entre 8/1 y 10/1.
3. Extracto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la planta del género *Jasminum* se selecciona entre las especies *Jasminum grandiflorum*, *Jasminum officinale*, *Jasminum odoratissimum*, *Jasminum sambac*, *Jasminum auriculatum*, *Jasminum flexile*, preferentemente *Jasminum officinale*.
4. Extracto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las sumidades floridas están enteras y secadas.
5. Extracto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, en la etapa i), el extracto acuoso de *Palmaria palmata* se obtiene mediante una hidrólisis enzimática empleando una carbohidrasa y una endoproteasa, seguida de filtración y/o centrifugación.
6. Extracto de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** la carbohidrasa es la xilanasa, usada preferentemente a una concentración comprendida entre un 2 y un 6 % en peso del peso seco del alga y, preferentemente, de un 4 %, y por que la endoproteasa es la bromelaína usada a una concentración comprendida entre un 1 y un 3 % y, preferentemente, de un 2 % en peso del peso seco del alga.
7. Extracto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** tiene un contenido de materia seca comprendido entre 26,8 y 30,8 g/kg, un contenido de proteínas comprendido entre 1,3 y 2,3 g/kg y un contenido de azúcares comprendido entre 25,3 y 29,3 g/kg.
8. Extracto de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que**, a la salida de la etapa ii), se diluye en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables seleccionados entre agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes.
9. Procedimiento de obtención de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** comprende las etapas siguientes según las cuales:
 - a) se disuelve en agua una cantidad de *Palmaria palmata* secada y finamente triturada en una relación másica agua / *Palmaria palmata* comprendida entre 10/1 y 50/1, preferentemente entre 20/1 y 40/1.
 - b) se hidroliza la solución acuosa de *Palmaria palmata* con una carbohidrasa y/o una endoproteasa a un pH comprendido entre 3 y 6, preferentemente entre 4 y 5,5, aún más preferentemente entre 4 y 4,5, a una temperatura comprendida entre 40 y 80 °C, preferentemente entre 50 y 60 °C, aún más preferentemente de 55 °C, durante un tiempo de al menos 1 hora, preferentemente 2 horas;
 - c) después de la adición opcional de un adyuvante de filtración y de una centrifugación, se obtiene un extracto acuoso de *Palmaria palmata*;
 - d) se dejan macerar, durante un tiempo de al menos 2 horas hasta un máximo de 4 horas a temperatura ambiente, sumidades floridas secas de una planta del género *Jasminum* en el extracto acuoso de *Palmaria palmata* obtenido en la etapa c); estando comprendida la relación másica entre el peso seco del alga y el peso seco de las sumidades floridas entre 40/60 y 95/5.
 - e) se filtra el macerado así obtenido en la etapa d) para recuperar un extracto de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* que se calienta durante al menos 2 horas y hasta 24 horas y, preferentemente, durante 12 horas o una noche, a una temperatura comprendida entre 40 y 90 °C, preferentemente a 80 °C, para desactivar las enzimas carbohidrasa y endoproteasa; y
 - f) se purifica opcionalmente mediante filtración para obtener el extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum*.
10. Composición cosmética que comprende, en un disolvente fisiológicamente aceptable, un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, u obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** comprende el extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* a una concentración comprendida entre un 0,0001 % y un 20 % en peso seco del peso total de la composición y, preferentemente a una concentración

comprendida entre un 0,05 % y un 5 % en peso seco del peso total de la composición.

- 5 12. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11 **caracterizada por que** comprende, además, al menos un agente activo adicional seleccionado ente vitamina A, ácido retinoico, retinol, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina E, vitamina F, vitamina H, vitamina K, vitamina PP, coenzima Q10, inhibidores de la metaloproteinasa, aminoácidos, carnitina, carnosina, taurina, péptidos naturales o sintéticos, extractos de péptidos vegetales, extractos de levaduras, extractos de *Artemia salina*, fitoesteroles de origen natural o sintético, ácido salicílico, oligosacáridos, polisacáridos, aminoazúcares, polifenoles, flavonoides, lípidos, fosfolípidos, aceites de origen animal, aceites vegetales, aceites vegetales etoxilados, protectores de UV y filtros solares.
- 10 13. Uso cosmético de un extracto sinérgico de *Palmaria palmata* y de sumidades floridas de una planta del género *Jasminum* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, o de una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 12, para luchar contra los signos del envejecimiento de la piel favoreciendo el mantenimiento del carácter "madre" de las células madre dérmicas (SKP).
- 15 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, para mejorar la elasticidad, la flexibilidad y/o la firmeza de la piel.

Figura 1

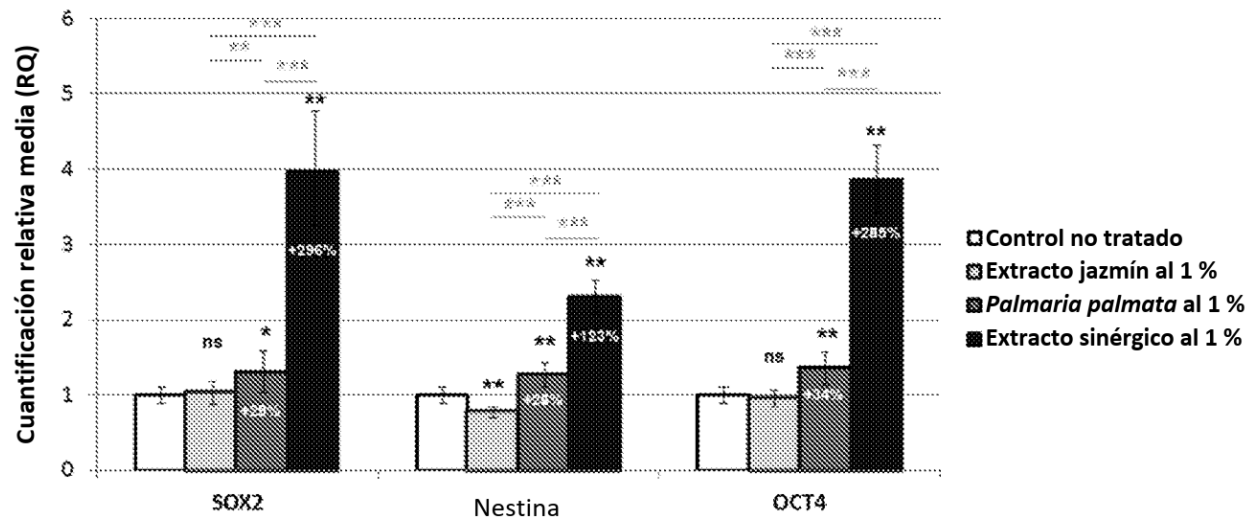


Figura 2

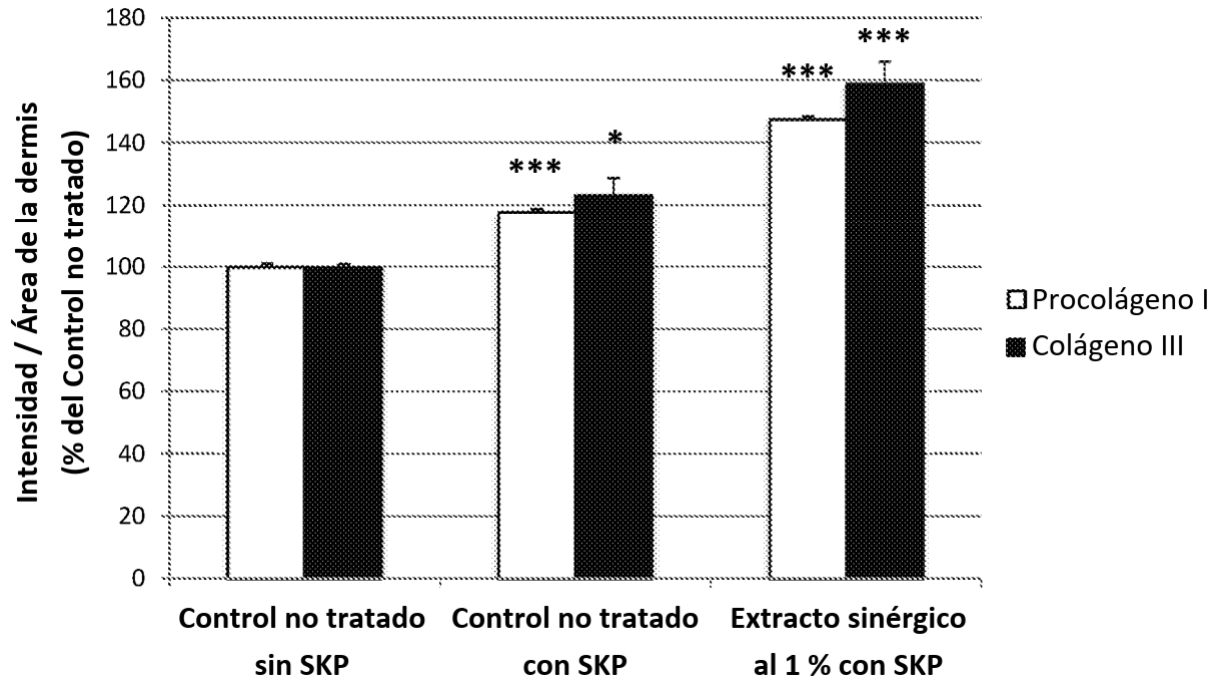


Figura 3

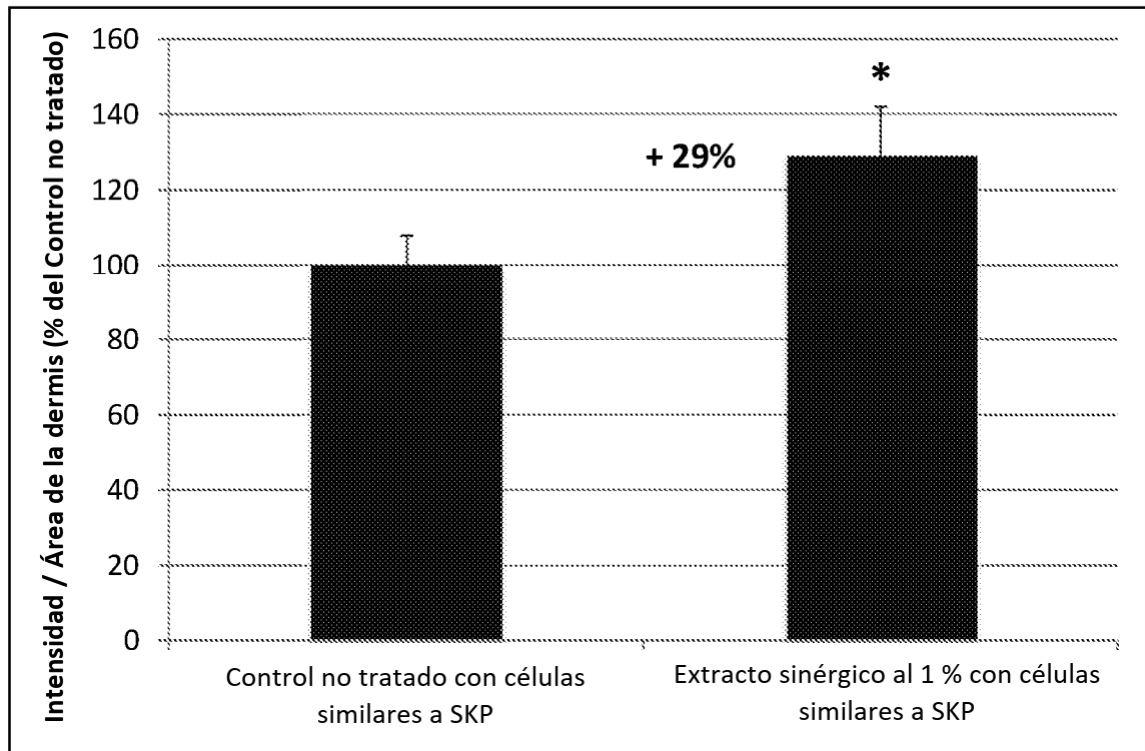


Figura 4

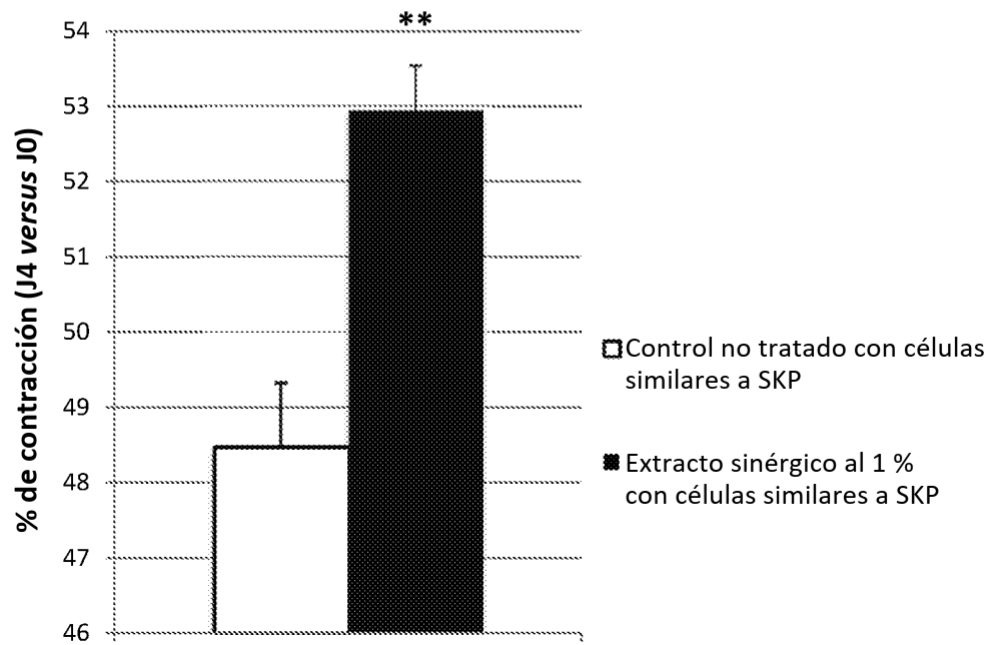


Figura 5

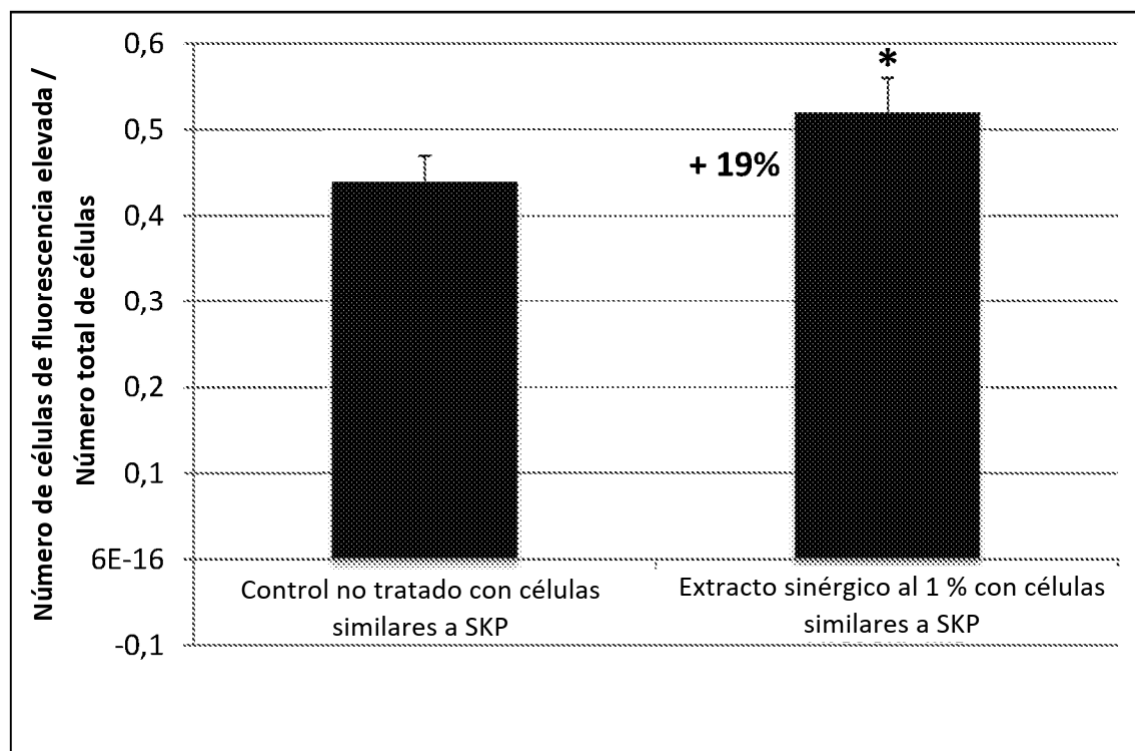


Figura 6

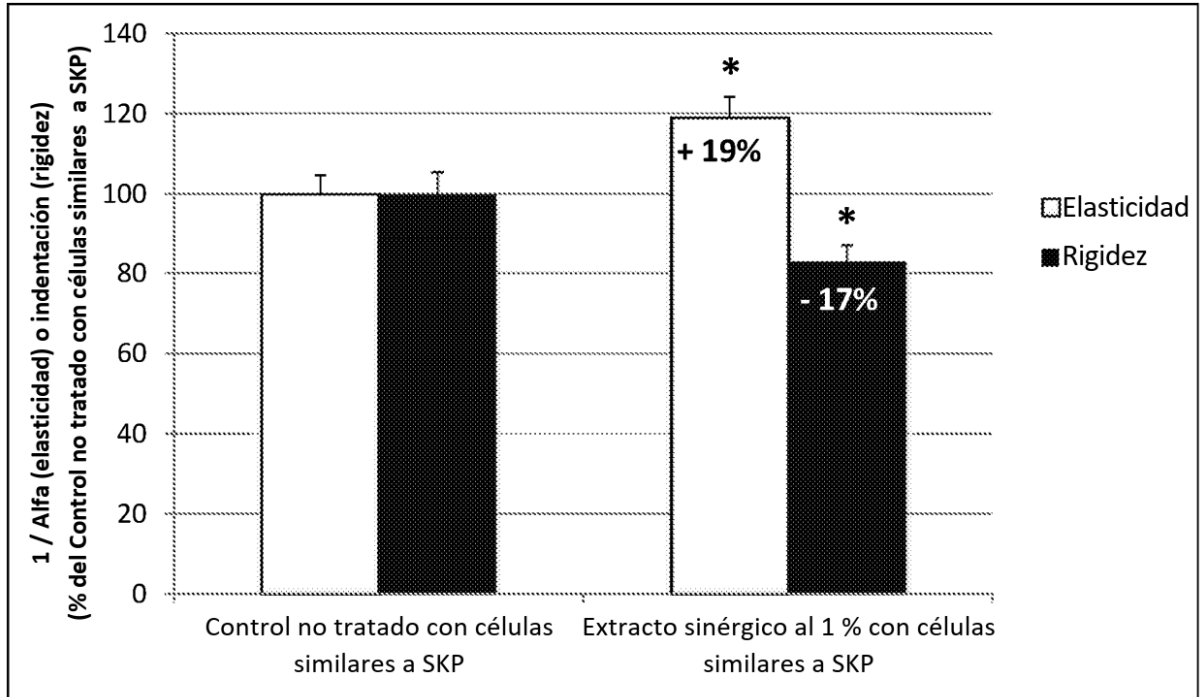


Figura 7

