

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 437**

21 Número de solicitud: 202230255

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.03.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.10.2023

71 Solicitantes:

MONTELOEDER S.L. (100.0%)
Miguel Servet, 16 nave 17
03203 Elche (Alicante) ES

72 Inventor/es:

CATURLA CERNUDA, Nuria

74 Agente/Representante:

MARTÍN ÁLVAREZ, Juan Enrique

54 Título: **Composición de extractos vegetales para paliar los efectos del envejecimiento mediante prevención o retraso de la senescencia celular**

57 Resumen:

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad física y funcional, que afecta progresivamente a la salud del organismo. Una característica peculiar del envejecimiento es el aumento de la cantidad de células senescentes, las cuales han entrado en un estado de parada irreversible de los ciclos celulares tras sobrepasar un nivel de stress inherente o ambiental. Aunque la senescencia celular es un proceso esencial para varios procesos fisiológicos, ésta juega un papel perjudicial en una gran cantidad de patologías relacionadas con la edad. Un primer aspecto de la invención aporta una composición de extractos vegetales para paliar los efectos del envejecimiento que comprende un contenido de asiaticósidos de al menos 6,0 % en peso preferiblemente procedentes de un extracto de centella asiática, un contenido de verbascósidos de al menos 2,5 % en peso preferiblemente procedente de un extracto de cistanche, un contenido de hesperidina de al menos 12,5 % en peso, preferiblemente procedente de un extracto de naranja dulce y un contenido de punicalaginas de al menos 3,0 % en peso, preferiblemente procedente de un extracto de granada. Una composición como la descrita anteriormente previene los efectos negativos del envejecimiento mediante una reducción de la cantidad de células que alcanzan el estado de senescencia, debido a la capacidad de dicha formulación de prevenir o reducir el acortamiento de los telómeros durante la división celular. Esta composición está particularmente indicada para prevenir los efectos del envejecimiento sobre la piel.

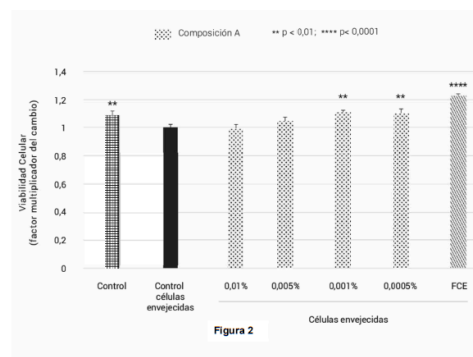


Figura 2

DESCRIPCIÓN

Composición de extractos vegetales para paliar los efectos del envejecimiento mediante prevención o retraso de la senescencia celular

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se enmarca dentro de campo técnico de productos para el retraso o reducción de los efectos del envejecimiento en los tejidos celulares, particularmente la piel, pero también en los órganos y tejidos internos, mediante un tratamiento alternativo a los habituales, basado en el retraso y/o la prevención de la senescencia celular.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El envejecimiento es una decadencia fisiológica en homeostasis estructural, así como en integridad funcional, que afecta progresivamente a la salud del organismo (Shulin et al, 2020). Una característica peculiar del envejecimiento es el aumento de la cantidad de células senescentes, las cuales han entrado en un estado de parada irreversible de los ciclos celulares tras sobrepasar un nivel de stress inherente o ambiental. La senescencia es una consecuencia del acortamiento de los telómeros después de repetidas divisiones celulares y aunque la senescencia celular es un proceso esencial para varios procesos fisiológicos, ésta juega un papel perjudicial en una gran cantidad de patologías relacionadas con la edad. Sin embargo, los productos antienvjecimiento actuales para la piel, se limitan a corregir los efectos visibles del envejecimiento, tales como arrugas, flacidez, falta de brillo, etc, mientras que otros efectos del envejecimiento que no son tan visibles, es decir, los efectos patológicos, tales como una disminución de la protección contra agentes patógenos, una mayor susceptibilidad a la irritación, una disminución de la capacidad cicatrizante, y una mayor susceptibilidad al cáncer, quedan sin ser tratados.

20

25

30

Referencias

- Shuling Song, Tamara Tchkonina, Jing Jiang, James L. Kirkland, Yu Sun; "Targeting Senescent Cells for a Healthier Aging: Challenges and Opportunities"; published in *Advanced Science*, Dec. 2020, Vol 7, Issue 23 (Wiley).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención aporta una composición de extractos vegetales para paliar los efectos del envejecimiento que comprende un contenido de asiaticósidos de al menos 6 % en peso, un contenido de verbascósidos de al menos 2,5 % en peso, un contenido de hesperidina de al menos 12,5 % en peso y un contenido de punicalaginas de al menos 3 % en peso.

Como se ilustrará en los ejemplos adjuntos, una composición como la descrita anteriormente previene los efectos negativos del envejecimiento, tanto los visibles como los patológicos, mediante una reducción de la cantidad de células que alcanzan el estado de senescencia, debido a la capacidad de dicha formulación de prevenir o reducir el acortamiento de los telómeros durante la división celular y en condiciones adecuadas, de prolongar la longitud de los telómeros mediante una estimulación de la actividad de la enzima telomerasa. Al impedir o retrasar el acortamiento de los telómeros, la piel no sólo es más bonita, sino que además es más sana, porque las células madre epiteliales cuando tienen telómeros muy cortos no abandonan sus nichos epiteliales, ni regeneran la piel y el pelo de manera adecuada, lo cual produce un envejecimiento prematuro. Esta composición también mejora el estado de salud de todos los tejidos y órganos, tanto externos como internos.

Los telómeros son estructuras críticas al final de los cromosomas de organismos eucarióticos compuestos por copias de repeticiones ricas en guanina. En los mamíferos, la repetición telomérica TTAGGG se repite miles de veces (Moyzis et al., 1988). Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas de su degradación y de ser reconocidos como rupturas de la doble hélice de ADN. Sin telómeros, los

cromosomas se fundirían y se produciría una inestabilidad genética (O'Sullivan and Karlseder, 2010). En humanos, la longitud media de los telómeros decrece desde 11 kilobases en el nacimiento hasta menos de 4 kilobases en edad avanzada (Arai et al. 2015). Durante la replicación de los cromosomas, las enzimas que duplican el ADN
5 no pueden continuar su duplicación hasta el final de los cromosomas, de forma que en cada duplicación se acorta el final de los cromosomas. Los telómeros forman los finales o extremos de los cromosomas humanos, y por lo tanto se acortan en cada ronda de división celular. Este mecanismo limita la proliferación de células humanas hasta un número finito de divisiones celulares mediante la inducción de senescencia
10 replicativa, diferenciación o apoptosis (Miyata et al. 2004; Smeets et al., 2011).

La longitud de los telómeros, por tanto, decrece con el tiempo y puede predecir la esperanza de vida. El acortamiento de los telómeros tiene efectos negativos en la salud y ha sido asociado a la senescencia celular, y otros muchos problemas de salud
15 que incluyen el envejecimiento y el cáncer. Una cuantificación precisa y consistente de la longitud de los telómeros es importante en muchos aspectos de biología celular, tales como inestabilidad cromosómica, reparo de ADN, senescencia, apoptosis, disfunciones celulares y oncogénesis.

20 En este sentido, la piel es un tejido autoregenerante que pasa por una proliferación extensiva a lo largo de la vida de un organismo. Los telómeros en las células epiteliales son particularmente susceptibles al acortamiento acelerado de los telómeros debido a la proliferación y a los agentes perjudiciales para el ADN, tales como la radiación solar, la contaminación ambiental o las especies radicales
25 oxigenadas (Buckingham y Klingelhuts, 2011; D'Errico et al., 2007).

Preferiblemente el contenido de asiaticósidos se aporta como un extracto de centella asiática. Preferiblemente la composición contiene alrededor de 36 % en peso de extracto de centella asiática.

30

La centella asiática es una fuente rica en asiaticósidos y por tanto es una planta adecuada para aportar el contenido requerido en asiaticósidos, sin tener que incluir una gran cantidad de inertes o compuestos inactivos en la composición.

Preferiblemente, el contenido en verbascósidos se aporta como un extracto de cistanche. Preferiblemente la composición contiene alrededor de un 32 % en peso de extracto de Cistanche. El extracto de cistanche puede ser de las variedades de Cistanche siguientes: *Cistanche tubulosa*, *Cistanche salsa* y/o *Cistanche desertícola*.

5

El cistanche es una fuente rica en verbascósidos y por tanto es una planta adecuada para aportar el contenido requerido en verbascósidos, sin tener que incluir una gran cantidad de inertes o compuestos inactivos en la composición.

10 Opcionalmente, el contenido en verbascósido puede ser aportado también con extractos de otras plantas como *Lippia citriodora*, *Budeja sp.*, *Rehmania glutinosa*, *Plantago spp.*

Preferiblemente, el contenido de hesperidina se aporta como un extracto de cítricos, es decir, *Citrus sinensis*, *Citrus amara ssp. sinensis variedad dulcis*, entre otras muchas. Preferiblemente la composición contiene alrededor de un 23 % de extracto de naranja dulce.

Los cítricos constituyen una fuente rica en hesperidina y por tanto son plantas adecuadas para aportar el contenido requerido en hesperidina, sin tener que incluir una gran cantidad de inertes o compuestos inactivos en la composición.

Preferiblemente, el contenido de punicalaginas se aporta como un extracto de granada (*Punica granatum*). Preferiblemente la composición contiene alrededor de un 9 % de extracto de granada.

La granada constituye una fuente rica en punicalaginas y por tanto es una planta adecuada para aportar el contenido requerido en punicalaginas, sin tener que incluir una gran cantidad de inertes o compuestos inactivos en la composición.

30

La administración de las composiciones de la presente invención se selecciona de entre formulaciones que la contienen destinadas para administración por vía oral, tópica, transdérmica o parenteral.

Preferentemente, las composiciones de la presente invención pueden ser administrada por vía oral conteniendo uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles, en forma sólida o líquida. Estas formulaciones pueden contener componentes convencionales tales como agentes de unión, cargas, lubricantes y agentes humectantes fisiológicamente aceptables. Las formulaciones pueden tomar cualquier forma apropiada, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas para chupar, disoluciones aceitosas o acuosas, suspensiones, emulsiones o en forma en polvo seco adecuada para la reconstitución con agua u otro medio líquido adecuado antes del uso, para la liberación inmediata o controlada.

10

Las formas orales líquidas para la administración también pueden contener determinados aditivos tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y agentes emulsionantes. Las composiciones líquidas no acuosas para la administración oral pueden formularse también, conteniendo por ejemplo aceites comestibles. Tales composiciones líquidas pueden encapsularse de manera conveniente en, por ejemplo, cápsulas de gelatina en una cantidad de dosificación unitaria.

15

Preferiblemente, la composición se administra en dosis de 100 mg a 1 g diarios, y más preferiblemente entre 100 y 300 mg diarios.

20

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por vía parenteral en combinación con vehículos líquidos inyectables convencionales, tales como agua o alcoholes adecuados. Los adyuvantes farmacéuticos convencionales para inyección, tales como agentes estabilizadores, agentes solubilizantes y tampones pueden incluirse en tales formulaciones inyectables. La composición de la presente invención puede ser administra por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa.

25

Igualmente, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por vía tópica, las formulaciones de aplicación tópica conteniendo uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles con la piel, en forma líquida, aerosol, crema, etc.

30

Referencias

- Buckingham EM, Klingelutz AJ. The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol*. 2011 Apr;20(4):297-302.
- 5 • D'Errico M, Lemma T, Calcagnile A, Proietti De Santis L, Dogliotti E. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res*. 2007 Jan 3;614(1-2):37-47.
- Miyata Y, Okada K, Fujimoto A, Hata K, Kagami H, Tomita Y, Ueda M. The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of
10 cultured epidermis. *J Dermatol Sci*. 2004 May;34(3):221-30.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep; 85(18):6622-6.
- 15 • O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Mar; 11(3):171-81.
- Smeets SJ, van der Plas M, Schaaïj-Visser TB, van Veen EA, van Meerloo J, Braakhuis BJ, Steenbergen RD, Brakenhoff RH. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer*. 2011 Apr 1;128(7):1596-605.
20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

La Figura 1 ilustra el efecto de las células senescentes en los tejidos epiteliales.

30

La Figura 2 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre la proliferación celular de fibroblastos dérmicos humanos normales (ensayo MTT).

35

La Figura 3 muestra un gráfico ilustrativo del efecto antioxidante de una composición según la presente invención sobre cultivos de fibroblastos dérmicos humanos normales.

La Figura 4 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre la actividad de la telomerasa en fibroblastos dérmicos humanos normales.

5 La Figura 5 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre la longitud de los telómeros en fibroblastos dérmicos humanos normales.

10 La Figura 6 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre el acortamiento telomérico en fibroblastos dérmicos humanos normales referido al número de divisiones celulares.

15 La Figura 7 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre el acortamiento telomérico en fibroblastos dérmicos humanos normales referido al número de divisiones celulares por pares de bases.

20 La Figura 8 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre la producción de melanina en melanocitos epidérmicos humanos normales expuestos a radiación ultravioleta.

25 La Figura 9 muestra un gráfico ilustrativo del efecto de una composición según la presente invención sobre la viabilidad celular en melanocitos epidérmicos humanos normales expuestos a radiación ultravioleta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y EJEMPLOS.

30 En la siguiente descripción se detallan con ejemplos como sorprendentemente la composición A según la presente invención puede paliar los efectos del envejecimiento mediante la prevención o reducción de la velocidad a la que las células epiteliales entran en senescencia.

La composición A comprende un 36,4 % en peso de extracto de centella asiática, un 31,8 % en peso de extracto de cistanche, un 22,7 % en peso de extracto de naranja dulce y un 9,1 % en peso de extracto de granada.

- 5 El extracto de centella asiática contiene alrededor de un 20% de asiaticósidos cuantificados por Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC)

El extracto de cistanche contiene alrededor de 10% de verbascósido cuantificado por HPLC.

10

El extracto de naranja dulce contiene alrededor de 60% de hesperidina cuantificado por HPLC.

15

El extracto de granada contiene alrededor de 40% de punicalaginas cuantificadas por HPLC.

Envejecimiento epitelial

- 20 El envejecimiento cutáneo es un proceso en el que progresivamente se producen cambios morfológicos y funcionales en la piel. Hay un declive en las funciones biológicas y en la habilidad para adaptarse al estrés metabólico que finalmente resulta en la aparición de arrugas, flacidez y cambios en pigmentación, entre otros.

- 25 Los factores determinantes del envejecimiento de la piel pueden ser internos y externos. El envejecimiento intrínseco está causado por determinantes genéticos. Mientras que el envejecimiento extrínseco depende de la exposición a varios factores ambientales (rayos UV, polución, etc..) y el estilo de vida (tabaco, alimentación, sueño y stress).

30

A nivel celular, los fibroblastos, el tipo de células más importante de la dermis, son esenciales para producir los colágenos y demás proteínas que conforman la matriz extracelular, y que permiten que la piel mantenga su función de forma adecuada. A medida que envejecemos se reduce progresivamente el número de fibroblastos al ir perdiendo su capacidad proliferativa y su función se va deteriorando progresivamente,

35

por ejemplo, reduciéndose la expresión de genes codificadores de isoformas de colágeno.

Además, el número de fibroblastos senescentes aumenta con la edad, debido, entre
5 otras causas, al deterioro de los sistemas de eliminación de las células senescentes. Las células senescentes son perjudiciales porque se desarrollan hacia un fenotipo secretorio asociado con la senescencia (SASP), que se considera una de las principales causas del envejecimiento. Los fibroblastos humanos que han adoptado SASP secretan citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas (MMPs) de la matriz y
10 liberan especies reactivas del oxígeno. Todo ello da lugar a la degradación de la matriz extracelular y por consiguiente el envejecimiento cutáneo (ver Figura 1 (Freitas *et al.*, 2007)).

Adicionalmente, las especies oxigenadas reactivas (ROS) juegan un papel
15 fundamental en el envejecimiento tanto intrínseco como extrínseco. Al aumentar la edad, el equilibrio entre las ROS y agentes antioxidantes se pierde a favor de las primeras, produciéndose activación de múltiples vías MAP kinasa, las que inducen un aumento en la síntesis de matriz-metaloproteinasas (MMP), responsables de la degradación del colágeno de la piel humana. Este desbalance entre las enzimas que
20 remodelan y reparan la matriz dérmica favorece la pérdida de tejido conectivo y la atrofia de la piel. A esto se asocia la pérdida de la función inmunológica.

Por esta razón, los ejemplos 1 y 2 evalúan los efectos anti-envejecimiento de la composición A según la presente invención tras el tratamiento *in vitro* de fibroblastos
25 dérmicos humanos normales (NHDF) sujetos a condiciones de cultivo que simulan el proceso de envejecimiento (senescencia celular), mediante la cuantificación de la viabilidad celular con el ensayo MTT (proliferación celular) y de los ROS tras la exposición a un medio que contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

30 Referencias

Sandra Freitas-Rodríguez, Alicia R. Folgueras, Carlos López-Otín, The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*,(2007) 1864, Issue 11, Part A, 2015-2025.

EJEMPLO 1. La formulación A según la presente invención evita la pérdida de potencial de proliferación de fibroblastos en medio envejecedor protegiéndolos de la senescencia celular.

Metodología

Para el ensayo de proliferación celular, se expusieron los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) durante 3 horas a un medio envejecedor condicionado que contenía H₂O₂ (500 μM). Tras el periodo de incubación, el medio fue sustituido con medio fresco que contenía la composición A según la invención a diferentes concentraciones durante 96 horas. Se incluyó factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20 ng/ml) como control positivo y NHDF sin pretratamiento en H₂O₂ como control sin envejecimiento (Control). La viabilidad celular fue cuantificada usando el ensayo MTT.

Resultados

Los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica de la Figura 2.

Los fibroblastos pretratados con H₂O₂ (control envejecido) exhibieron una viabilidad celular marcadamente reducida (-9,2 %) comparada con la del control no envejecido. Las células suplementadas con la composición A según la invención recuperaron su capacidad de proliferación y se observó un incremento significativo de la viabilidad celular a 0,001 % en peso (+11,3 %) y a 0,0005 % en peso (+10,8 %) comparados con el control envejecido, elevando la capacidad de crecimiento a niveles similares a el de los fibroblastos no envejecidos, y algo inferiores al nivel de las células de control incubadas con el factor de crecimiento epidérmico EGF (+22,9 %).

Este ejemplo demuestra la potente eficacia de la composición A según la invención para contrarrestar los efectos del envejecimiento celular sobre la capacidad de regeneración de los tejidos.

EJEMPLO 2. La formulación A según la presente invención inhibe el stress oxidativo inducido por H₂O₂, medio envejecedor condicionado, en fibroblastos humanos.

5

Metodología

Los fibroblastos epidérmicos humanos normales (NHDF) fueron expuestos durante 3 horas a un medio envejecedor condicionado que contenía H₂O₂ (500 µM). Tras la incubación, el medio fue sustituido por medio fresco que contenía la composición A según la invención a diferentes concentraciones durante 24 horas. Tras este periodo, la producción de especies radicales oxigenadas (ROS) fue medida mediante fluorimetría. Las medidas de la generación de ROS fueron calculadas frente a las células sin tratar con la composición A y envejecidas con H₂O₂ (control envejecido).

15

Resultados

Los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica de la Figura 3.

La dosis de H₂O₂ productora de senescencia exhibió un nivel de ROS intracelular significativamente mayor en las células sin tratar con la composición A (+ 60,4 %), lo cual es una característica del envejecimiento de la piel. Mientras que cuando las células fueron tratadas con la composición A durante 24 horas, el nivel de ROS disminuyó. El tratamiento con la composición A a 0,005 % y a 0,01 % en peso disminuyó los niveles de ROS en 32 % y 57,7 %, respectivamente.

Este ejemplo demuestra la potente eficacia de la composición A según la invención para reducir los efectos del estrés celular sobre la capacidad de producción de radicales libres oxidantes.

30

Telómeros y senescencia

Los telómeros son complejos de ADN-proteína dinámicos que protegen los extremos de los cromosomas y favorecen la estabilidad cromosómica. Cuando las células se dividen, los telómeros no son replicados en su totalidad lo que implica un acortamiento

35

de los mismos en cada replicación (Chan and Blackburn, 2004) Una vez que los telómeros llegan a una longitud crítica, las células paran de dividirse y entran en senescencia (Victorelli and Passos, 2017). Por tanto, la longitud de los telómeros es considerada un marcador del envejecimiento celular. El proceso de acortamiento de los telómeros, a medida que envejecemos, es reducido por la enzima telomerasa, cuya función es añadir nucleótidos al final del extremo de la molécula de ADN (Oeseburg H, 2010).

La actividad de la telomerasa se encuentra en determinadas células (por ejemplo, células germinales y células madre), la cuales se dividen continuamente y deben mantener los telómeros por encima de una determinada longitud con el fin de poder realizar sus funciones. Mediante el estímulo de la actividad de la telomerasa, es posible aumentar la longitud de los telómeros y consecuentemente extender el número de divisiones celulares que pueden tener lugar sin incurrir en aberraciones cromosómicas perjudiciales o fusión telomérica (Sahin E, 2010). Si bien esto no hace inmortales a las células, sí puede extender su ciclo de vida. Además, la cantidad de telomerasa en nuestros cuerpos decrece a medida que envejecemos (Eisenberg, 2011).

Así, mediante la activación de la telomerasa se puede:

- Hacer frente al acortamiento de los telómeros y al envejecimiento celular
- Ayudar a las células a vivir más tiempo y continuar funcionando adecuadamente.
- Hacer que las células viejas funcionen como cuando eran jóvenes (cambiando la expresión genética a un fenotipo más joven).

EJEMPLO 3A. La composición A según la presente invención exhibe efectos anti-envejecimiento y efectos de protección frente a la senescencia mediante estimulación de la actividad de la telomerasa.

Metodología

Determinación de la actividad relativa de telomerasa mediante Q-TRAP

El protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas basado en la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR) cuantitativa es un ensayo basado en PCR sensible y preciso que permite la medida de la actividad de la telomerasa.

5

Pellets celulares fueron divididos usando el tampón de división CHAPS (3-colamidopropildimetilamonio 1-propanosulfonato) para la extracción de proteína. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y se usaron en 24 horas) La cuantificación de proteína para cada muestra fue realizada usando el ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Kit 50000002). Se requiere un mínimo de concentración de proteína de 0.3 mg/ml para efectuar el análisis de las muestras. Los extractos de proteína de telomerasa fueron incubados a 27 °C durante 30 minutos para permitir a la telomerasa de los extractos de proteína alargar los telómeros mediante adición de secuencias repetidas TTAGGG. Tras la reacción enzimática, los productos de extensión de la telomerasa fueron amplificados y cuantificados mediante qPCR a tiempo real usando verde SYBR (un pigmento fluorescente de cianina). La PCR se inició a 95 °C durante 10 minutos, seguida de una amplificación de 40 ciclos (95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s) y de una etapa de curva de fusión. Las reacciones fueron seguidas y analizadas con QuantStudio 5 (Applied Biosystems). La actividad de la telomerasa en las líneas celulares o muestras fue calculada basándose en el ciclo umbral (Ct). Todas las muestras fueron corridas por triplicado.

La serie de dilución estándar de positivo en telomerasa se representa frente a la concentración de proteína de telomerasa ($r^2 > 0,9$) como una curva estándar de valores de Ct. La curva estándar se genera representando ciclos umbrales (valores Ct) de línea celular estándar HeLa frente al logaritmo de 1000, 333, 111, 37,03, 12,34, 4,11, 1,37 y 0,45 ng de proteína (extracto celular completo).

La actividad de la telomerasa se midió en los fibroblastos humanos durante un periodo de 24 y 72 horas.

30

Resultados

Los resultados del ensayo de la actividad de la telomerasa se muestran en la gráfica de la Figura 4.

5

A las seis horas de ensayo, el control y las muestras tratadas con la composición A según la presente invención mostraban niveles de actividad de la telomerasa similares. Solo se observó un incremento no significativo de la actividad de la telomerasa en la muestra tratada con composición A a 0,001 % en peso de concentración.

10

A las 24 horas, se observó un incremento de la actividad de la telomerasa en todas las muestras celulares tratadas con la composición A, comparadas con el grupo de control sin tratar. Estas diferencias se identificaron como estadísticamente significantes ($p < 0,01$ %).

15

A las 72 horas el control y las muestras tratadas mostraban niveles similares de actividad de la telomerasa.

20 Referencias

- Chan SR, Blackburn EH. 2004. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1441):109–121. doi:10.1098/rstb.2003.1370
- Victorelli S, Passos JF. 2017. Telomeres and cell senescence - size matters not. *EBioMedicine.* 21:14–20. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.027.
- Eisenberg DTA. An evolutionary review of human telomere biology: the thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. *American Journal of Human Biology.* 2011;23:149–167.
- Oeseburg H, et al. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology.* 2010;459:259–268
- Sahin E, DePinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature.* 2010;464:520–528.
- Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. 2001. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem.* 47(3):519–524.

35

EJEMPLO 3B. La composición A según la presente invención exhibe efectos anti-envejecimiento y efectos de protección frente a la senescencia mediante prevención del acortamiento de los telómeros.

Para comprobar si la composición A es capaz de inhibir, al menos parcialmente, el acortamiento de los telómeros, se han realizado dos experimentos distintos con dos técnicas diferentes y condiciones diferentes.

10

PROTOCOLO 1

Metodología

15 Para el experimento de la longitud de los telómeros, los fibroblastos NHDF fueron cultivados y crecidos durante 24-29 duplicaciones celulares, induciendo envejecimiento y acortamiento de los telómeros debido al paso celular. Durante todo este cultivo, las células fueron tratadas o no tratadas (control sin tratar) con la composición A, sustituyendo el medio por producto fresco cada 3 días. Tras la incubación, las células fueron recogidas y el gADN fue extraído y la longitud de sus telómeros fue cuantificada mediante RT-qPCR. El gDNA fue también extraído de las células a tiempo 0. El número de duplicaciones celulares fue calculado mediante conteo de células.

25 Para calcular la longitud de los telómeros, se incluyó una muestra de ADN genómico humano de referencia en la reacción qPCR, la cual tenía una longitud de telómeros conocida. Para realizar el análisis de los datos primarios, se utilizó el método Pfaffl (Pfaffl, 2001) para calcular la proporción de la expresión de genes en relación a SCR (control interno). La expresión matemática de la expresión de genes relativa in tiempo PCR real es la siguiente:

$$\text{Proporción} = \frac{(E_{\text{objetivo}})^{\Delta C P_{\text{objetivo}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta C P_{\text{referencia}}(\text{control-muestra})}}$$

Resultados

5

Los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica de la Figura 5.

Los fibroblastos envejecidos durante 24-29 duplicaciones sin tratamiento mostraron una longitud de telómeros significativamente reducida, comparada con el control sin envejecer. Sin embargo, el tratamiento de los fibroblastos con una concentración tan
10 baja como 0,0001 % en peso de composición A incrementó significativamente la longitud de los telómeros en comparación con las células envejecidas sin tratar.

Para reflejar mejor el acortamiento de los telómeros resultante de la división celular,
15 los valores del acortamiento de los telómeros fueron normalizados con respecto al número de divisiones celulares estimado que se produjo en las distintas condiciones. Cuando se aplica esta corrección, los resultados (mostrados en la Figura 6) muestran un descenso en el acortamiento de los telómeros estadísticamente significativo causado por la Composición A a 0,0001 % en peso de concentración ($p < 0,05$). Bajo
20 estas condiciones, los telómeros se acortaron a una velocidad de $0,010 \pm 0,003$ kb/división más lenta que en las células sin tratar. Esta cifra es un 57,7 % más lenta que el control sin tratar.

PROTOCOLO 2

25

Metodología

Para este experimento, fibroblastos humanos normales fueron cultivados y crecidos durante 8 semanas (14-17 duplicaciones celulares) junto con la composición A a tres
30 concentraciones diferentes, 0,001 %, 0,0005 % y 0,0001 % en peso. Las células fueron cultivadas y testadas bajo condiciones de estrés oxidativo añadiendo H_2O_2 (10 μM) como agente de estrés oxidativo. Se determinaron las alteraciones en las longitudes de los telómeros y en las velocidades de acortamiento de los telómeros (TSRs) para cada concentración de composición A y se compararon los resultados.

35

La medida de la longitud de los telómeros se llevó a cabo utilizando la tecnología Telomere Analysis Technology (TAT[®]) propiedad de Life Length. TAT[®] mide la longitud de los telómeros usando la técnica de alta productividad (HT) Q-FISH (quantitative fluorescent in situ hybridization) descrita previamente (de Pedro et al, 5 2020). Este método se basa en un método de cuantificación por fluorescencia con hibridación in situ modificado para medir cromosomas individuales en células en interfase. En breve, los telómeros se hibridan con un ácido nucleico péptido fluorescente (PNA) que reconoce tres repeticiones de telómero (la secuencia: Alexa488-OO-CCCTAACCCCTAACCCCTAA, comprada a Panagene). Las imágenes de 10 los núcleos y los telómeros son capturadas por un sistema de pantalla de alto contenido. La intensidad de la señal fluorescente del PNA telomérico que hibridan a un telómero dado es proporcional a la longitud de dicho telómero. La intensidad de fluorescencia se transforma en pares de bases (bp) mediante una curva de regresión estándar que se genera utilizando líneas celulares de control con longitud de 15 telómeros conocida. TAT[®] no solo mide la longitud de los telómeros en pares de bases absolutas, también aporta una evaluación de la distribución de la longitud de los telómeros y el porcentaje de telómeros cortos, permitiendo así un análisis más completo de cada muestra.

20 De este modo, se midieron tres variables distintas con el método TAT[®]: la longitud de telómero mediana, el 20° percentil de la longitud de telómero y el porcentaje de telómeros más corto de 3 Kbp que se percibe como la cantidad de telómeros críticamente cortos que incrementa el riesgo a que las células entren en senescencia.

25 Todas las muestras fueron analizadas por quintuplicado.

Los fibroblastos dérmicos humanos normales fueron usados para observar el efecto de la composición A en los telómeros bajo condiciones de estrés oxidativo (10 ug/ml de H₂O₂) en un periodo de 6 y 8 semanas.

30

Resultados

Los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica de la Figura 7.

Los resultados muestran que los fibroblastos no tratados envejecidos durante 6 y 8 semanas bajo estrés oxidativo exhiben una longitud de telómeros más reducida, así como un mayor porcentaje de telómeros cortos comparados con los fibroblastos sin envejecer (control tiempo 0). En contraste, los fibroblastos tratados con la composición A exhibieron una longitud de telómeros mediana y valores del 20° percentil mayores, así como un menor porcentaje de telómeros cortos (<3Kb), comparados con el grupo de control sin tratar, tanto durante las 6 y 8 semanas de tratamiento.

Además, tras normalizar los datos con la población duplicada, se observó una velocidad de acortamiento de los telómeros menor en los fibroblastos tratados con la composición A, lo que sugiere un efecto protector de los telómeros bajo condiciones de estrés oxidativo y de envejecimiento.

Estos experimentos demuestran la potente eficacia de la composición A según la invención para retrasar la progresión celular hasta un estado de senescencia, mediante una reducción en la velocidad de acortamiento de los telómeros.

Nuestra piel envejece porque, individualmente, cada célula del cuerpo envejece y entra en una fase de senescencia, según la cronología establecida por un reloj celular biológico: los telómeros.

Los telómeros son unidades repetitivas de ADN que protegen los extremos de los cromosomas durante la división celular. A medida que las células se dividen con el transcurso del tiempo, los telómeros se acortan y cuando la longitud de los telómeros es muy corta, las células terminan su replicación por división y entran en senescencia.

Las células senescentes se encuentran en mayor cantidad en edades avanzadas debido a un deterioro relacionado con la edad de los sistemas de eliminación de células senescentes, tales como el sistema inmunitario y el ciclo autofágico-lisosomal.

Las células senescentes son perjudiciales porque evolucionan hasta un fenotipo de secreción asociado a la senescencia (SASP), el cual se sospecha es una de las mayores causas del envejecimiento. Las células SASP se comunican con células

próximas utilizando citoquinas proinflamatorias, que incluyen moduladores catabólicos tales como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (ver Figura 1, derecha), y liberan especies radicales oxigenadas, resultando en la degradación de la matriz celular en sus alrededores.

5

Efectos ambientales y del envejecimiento sobre la pigmentación de la piel (Radiación UVA)

El sistema de pigmentación de la piel se modifica por el proceso de envejecimiento y una pigmentación irregular es uno de los mayores cambios asociados con el envejecimiento.

La melanina segregada por los melanocitos es el pigmento más importante de la piel humana en la base de la epidermis. La melanina es crucial para la fotoprotección de la piel humana de los rayos dañinos del sol. Sin embargo, existen varios trastornos de hiperpigmentación epitelial resultantes de la sobreproducción y acumulación subsecuente de melanina, tales como pecas, manchas de la edad, melasma y lentigo senil, los cuales pueden ser un problema angustioso. Esta sobreproducción se desencadena por una variedad de factores, pero los más importantes son la exposición a la luz solar, los cambios hormonales relacionados con la edad o estados inflamatorios de la piel.

La hiperpigmentación aparece típicamente en áreas de la piel que están regularmente expuestas al sol, tales como las manos o la cara. La radiación ultravioleta (UVA) contribuye a la melanogénesis mediante la producción de estrés oxidativo celular, neutralizando las defensas antioxidantes.

La pigmentación cutánea anormal es una condición estética significativa que puede afectar a la calidad de vida de una persona. Además, una sobreproducción de melanina puede asociarse al melanoma, un tipo de cáncer de piel. Por lo tanto, es importante el estudio y desarrollo de productos capaces de regular la sobreproducción de melanina de forma efectiva, tal como la composición A, cuyos efectos en los melanocitos se ilustran en el ejemplo 4.

EJEMPLO 4. La composición A según la presente invención exhibe efectos blanqueantes mediante la inhibición de síntesis de melanina y el daño celular inducidos por la exposición a la radiación ultravioleta.

5 Metodología

Se cultivaron melanocitos epidérmicos humanos normales durante 72 horas junto con la composición A según la presente invención. Durante el periodo de incubación, las células fueron expuestas a radiación ultravioleta dos veces al día (dosis total = 5
10 J/cm²). Tras la última radiación, las muestras fueron incubadas durante 96 horas adicionales antes de la cuantificación de la melanina y la viabilidad celular.

Resultados

15 Los resultados obtenidos se pueden observar en las gráficas de la Figura 8, para la producción de melanina, y la Figura 9, para la viabilidad celular.

La radiación ultravioleta (UVA) incrementó significativamente los niveles de melanina en un 41 %, comparado con el control sin exposición a radiación UVA. La composición
20 A según la invención a concentraciones de 0,005 % y 0,0005 % en peso redujo significativamente los niveles de melanina en 41 y 40 %, respectivamente, comparados con las células irradiadas no tratadas.

La radiación ultravioleta redujo significativamente la viabilidad de los melanocitos
25 humanos en un 25 % comparad con el control no irradiado. La composición A según la invención a concentraciones de 0,005 % y 0,0005 % en peso aumentó significativamente la supervivencia celular y redujo el daño celular causado por la radiación UVA en un 25 y un 20 %, respectivamente, comparados con las células irradiadas no tratadas.

30

EJEMPLO 5. La composición A según la presente invención exhibe múltiples efectos beneficiosos muy significativos sobre la piel como se demuestra en este estudio clínico en humanos con control de placebo.

5 Se seleccionaron 60 voluntarias que mostraban síntomas de envejecimiento de la piel. A las voluntarias fueron divididas en 2 grupos, a uno de ellos se les administró una dosis diaria de composición A de 225 mg y al otro una dosis de placebo (es decir, una cápsula sin composición A). El estudio duró tres meses y se hicieron mediciones de los parámetros de estudio a los 28 y 56 días y al final del estudio, a los 84 días.

10

Resultados Estudio Clínico

Globalmente, la composición A influye positivamente en todos los parámetros clínicos monitorizados, tanto en comparación con el comienzo del estudio (T0), como frente
15 al grupo placebo desde el primer mes de tratamiento (28 días), excepto para el parámetro R9, donde los resultados obtenidos son estadísticamente significativos en comparación con el valor inicial, pero no son significativos en comparación con el grupo tratado con placebo hasta los 56 días.

20 En la siguiente tabla se muestra la variación de cada uno de los parámetros frente al comienzo del estudio después de 28, 56 y 84 días de tratamiento.

Realización del estudio: el estudio clínico se llevó a cabo en grupos paralelos, aleatorizado, doble ciego en 60 voluntarias con signos evidentes de envejecimiento.
25 El estudio duró 12 semanas y se evaluó la eficacia del producto después de 4, 8 y 12 semanas de toma del producto. Los parámetros que se determinaron fueron: la hidratación de la piel (corneometer®), la pérdida de agua transepidérmica (tewameter®), la luminosidad y el tono de la piel (espectrofotómetro), la elasticidad y la firmeza de la piel (cutometer®), la profundidad de las arrugas y la rugosidad de la
30 piel (análisis de imagen con Primos 3D®) y el espesor de la epidermis y dermis (ultrasonidos).

ES 2 952 437 A1

PARÁMETROS	Composición A			Placebo		
	28 d	56 d	84 d	28 d	56 d	84 d
% variación vs. comienzo (T0)						
• Hidratación de la piel	+7.1% ^{S*}	+15,3% ^{S*}	+19,6% ^{S*}	+3.7% ^S	+3.3% ^{NS}	+2.4% ^{NS}
• Pérdida de agua transepidermal	-5.7% ^{S*}	-10.6% ^{S*}	-14.3% ^{S*}	-1.8% ^S	-1.0% ^{NS}	-1.1% ^{NS}
• Profundidad de las arrugas	-10.2% ^{S*}	-11.2% ^{S*}	-14.4% ^{S*}	+3.1% ^S	-2.2% ^{NS}	-3.7% ^S
• Parámetro Ra de suavidad ⁽¹⁾	-2.3% ^{S*}	-2.9% ^{S*}	-5.3% ^{S*}	+1.3% ^{NS}	+0.8% ^{NS}	-0.1% ^{NS}
• Elasticidad global de la piel – Parámetro R2	+6.8% ^{S*}	+11.8% ^{S*}	+14.2% ^{S*}	-0.8% ^{NS}	+0.4% ^{NS}	+1.7% ^{NS}
• Firmeza de la piel – Parámetro R0 ⁽²⁾	-5.5% ^{S*}	-9.9% ^{S*}	-11.7% ^{S*}	-1.3% ^{NS}	-1.1% ^{NS}	-1.9% ^{NS}
• Elasticidad neta – Parámetro R5 ⁽³⁾	+5.8% ^{S*}	+14.1% ^{S*}	+17.3% ^{S*}	-1.2% ^{NS}	+1.1% ^{NS}	+1.5% ^{NS}
• Efectos de cansancio de la piel – R9 ⁽⁴⁾	-5.1% ^S	-9.6% ^{S*}	-11.7% ^{S*}	-2.0% ^{NS}	-4.0% ^S	-4.7% ^S
• Color de piel (ángulo ITA) ⁽⁵⁾	+19.6% ^{S*}	+23.5% ^{S*}	+26.2% ^{S*}	+11.1% ^S	+9.2% ^S	+13.4% ^S
• Brillo de la piel (parámetro de brillo)	+13.9% ^{S*}	+23.7% ^{S*}	+27.3% ^{S*}	+7.2% ^S	+7.8% ^S	+9.5% ^S
variación vs. comienzo (T0)						
• Espesor de la piel (mm)	+0,06% ^{S*}	+0.11% ^{S*}	+0.15% ^{S*}	+0.02% ^S	+0.03% ^S	+0.05% ^S

(1) Un descenso del parámetro Ra puede ser expresado en valores absolutos como un incremento de la suavidad de la piel.

5 (2) Un descenso del parámetro R0 puede ser expresado en valores absolutos como un incremento de la firmeza de la piel.

(3) Una mejora del parámetro R5 indica una mejora de la recuperación elástica de la piel tras su deformación.

10 (4) Cuanto más cerca está este valor de 0, más bajos son los efectos del cansancio. Su descenso indica una mejora en la piel.

(5) Un ángulo de ITA bajo indica una pigmentación marrón, mientras que un valor alto del ángulo ITA indica pigmentación clara.

S: estadísticamente significativo vs. comienzo del estudio (T0) (p<0.05)

*: estadísticamente significativo vs. placebo (p<0.05)

15 NS: no estadísticamente significativo vs. comienzo del estudio (T0) (p>0.05)

En vista de estos resultados, se puede concluir que la composición A ejerce un beneficio excepcional y muy significativo sobre todas las propiedades de la piel como mejora hidratación y elasticidad, reducción de arrugas y favorece la redensificación de la dermis y epidermis, como resultado del efecto sinérgico de todos sus componentes sobre los telómeros de las células epiteliales. Además, es capaz reducir las manchas oscuras de la piel y aportar más luminosidad haciendo que la piel adquiera un tono más uniforme.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de extractos vegetales para paliar los efectos del envejecimiento caracterizada porque comprende un contenido de asiaticósidos de al menos 6 % en peso, un contenido de verbascósidos de al menos 2,5 % en peso, un contenido de hesperidina de al menos 12,5 % en peso y un contenido de punicalaginas de al menos 3 % en peso.
- 10 2. Una composición según la reivindicación 1 caracterizada porque el contenido de asiaticósidos se aporta como un extracto de centella asiática.
3. Una composición según la reivindicación 2 caracterizada porque la composición contiene alrededor de 36 % en peso de extracto de centella asiática.
- 15 4. Una composición según cualquier reivindicación anterior caracterizada porque el contenido en verbascósidos se aporta como un extracto de cistanche.
- 20 5. Una composición según la reivindicación 4 caracterizada porque la composición contiene alrededor de un 32 % en peso de extracto de cistanche.
- 25 6. Una composición según la reivindicación 4 o 5 caracterizada porque el extracto de cistanche es de las variedades de cistanche siguientes: *Cistanche tubulosa*, *Cistanche salsa* y/o *Cistanche desertícola*.
- 30 7. Una composición según cualquier reivindicación anterior caracterizada porque el contenido en verbascósido es aportado con extractos de plantas como *Lippia citriodora*, *Budeja sp.*, *Rehmania glutinosa*, *Plantago spp.*
8. Una composición según cualquier reivindicación anterior caracterizada porque el contenido de hesperidina se aporta como un extracto de cítricos.
- 35 9. Una composición según la reivindicación 8 caracterizada porque la composición contiene alrededor de un 23 % de extracto de naranja dulce.

10. Una composición según cualquier reivindicación anterior caracterizada porque el contenido de punicalaginas se aporta como un extracto de granada (*Punica granatum*).

5

11. Una composición según la reivindicación 10 caracterizada porque contiene alrededor de un 9 % de extracto de granada.

12. Una composición según cualquier reivindicación anterior caracterizada porque
10 además reduce la producción de melanina en la piel expuesta a la radiación solar.

13. Una formulación para paliar los efectos del envejecimiento caracterizada porque
comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y
además está configurada para ser administrada por vía oral conteniendo uno o
15 más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles, en forma sólida o
líquida.

14. Una formulación para paliar los efectos del envejecimiento caracterizada porque
comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y
20 además está configurada para ser administrada por vía tópica conteniendo uno o
más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles con la piel humana.

25

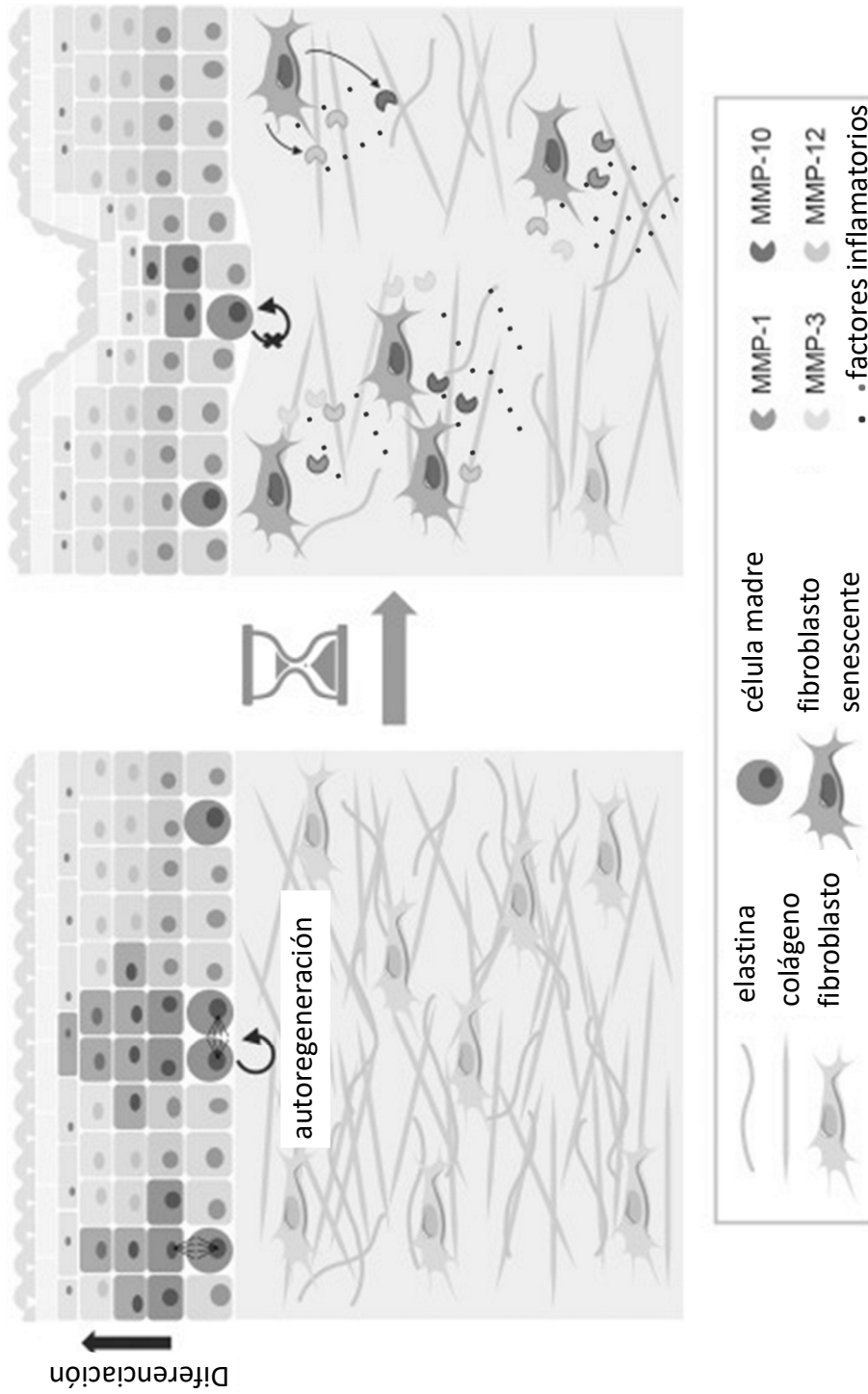


Figura 1

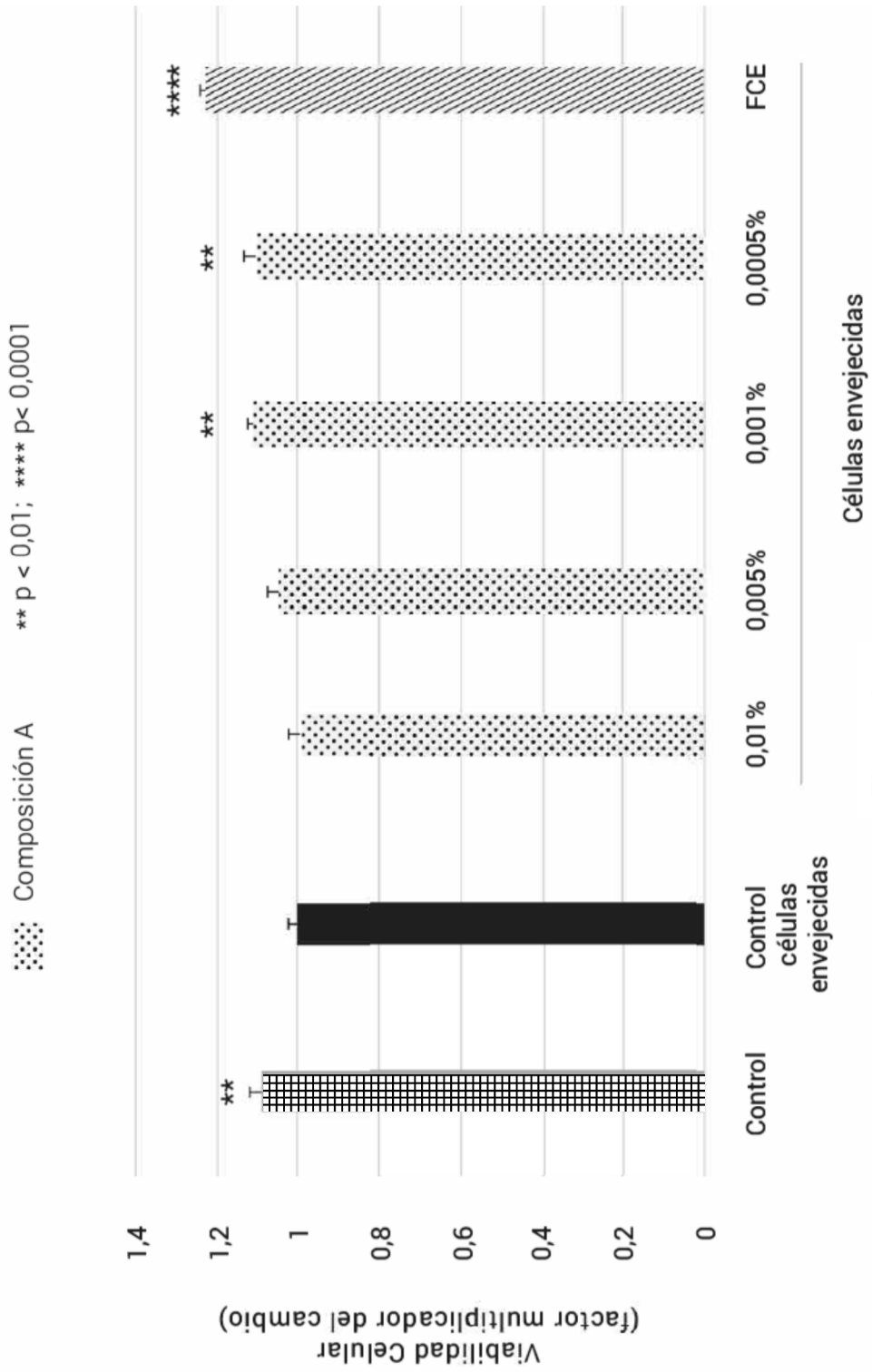


Figura 2

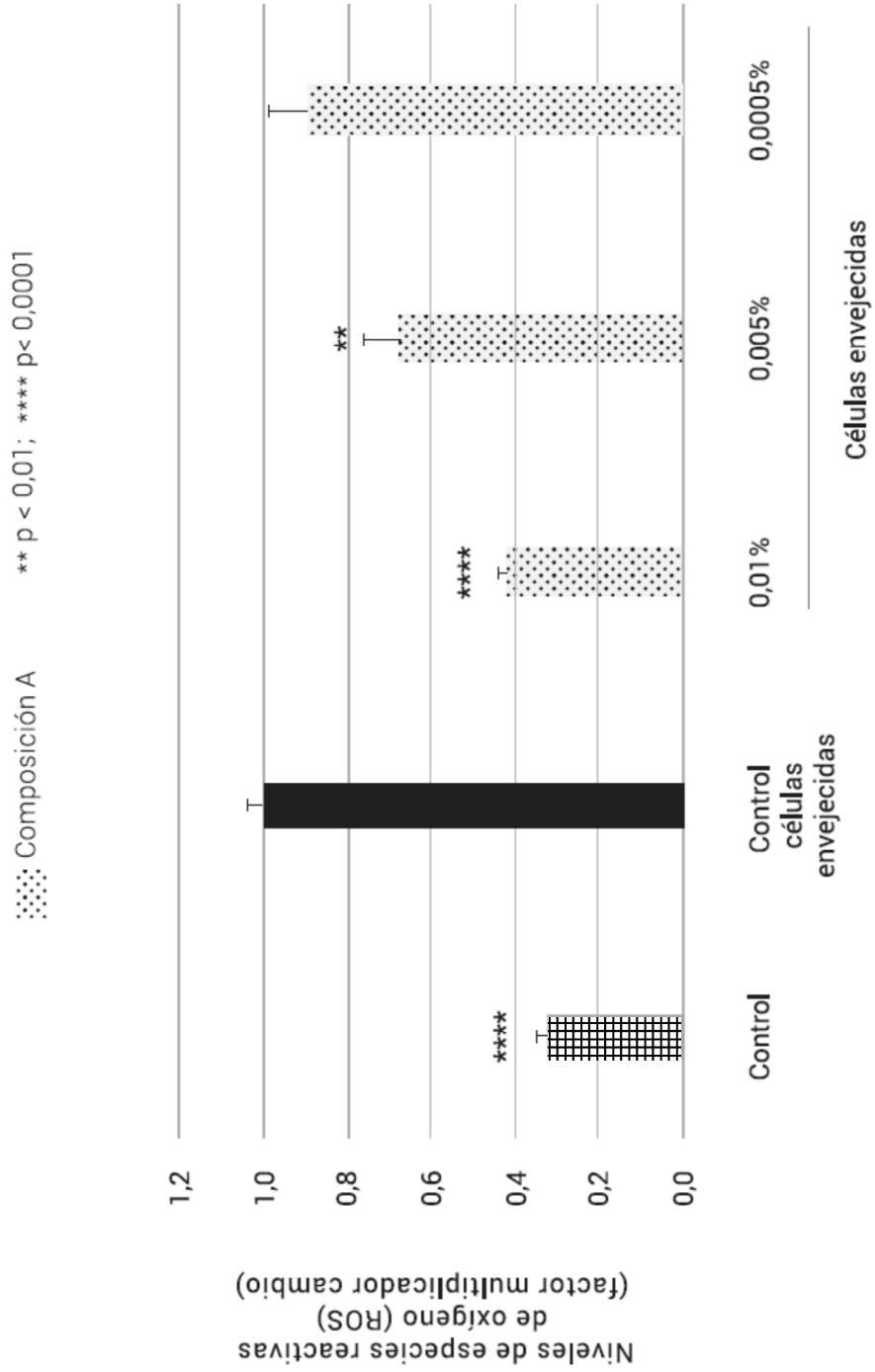


Figura 3

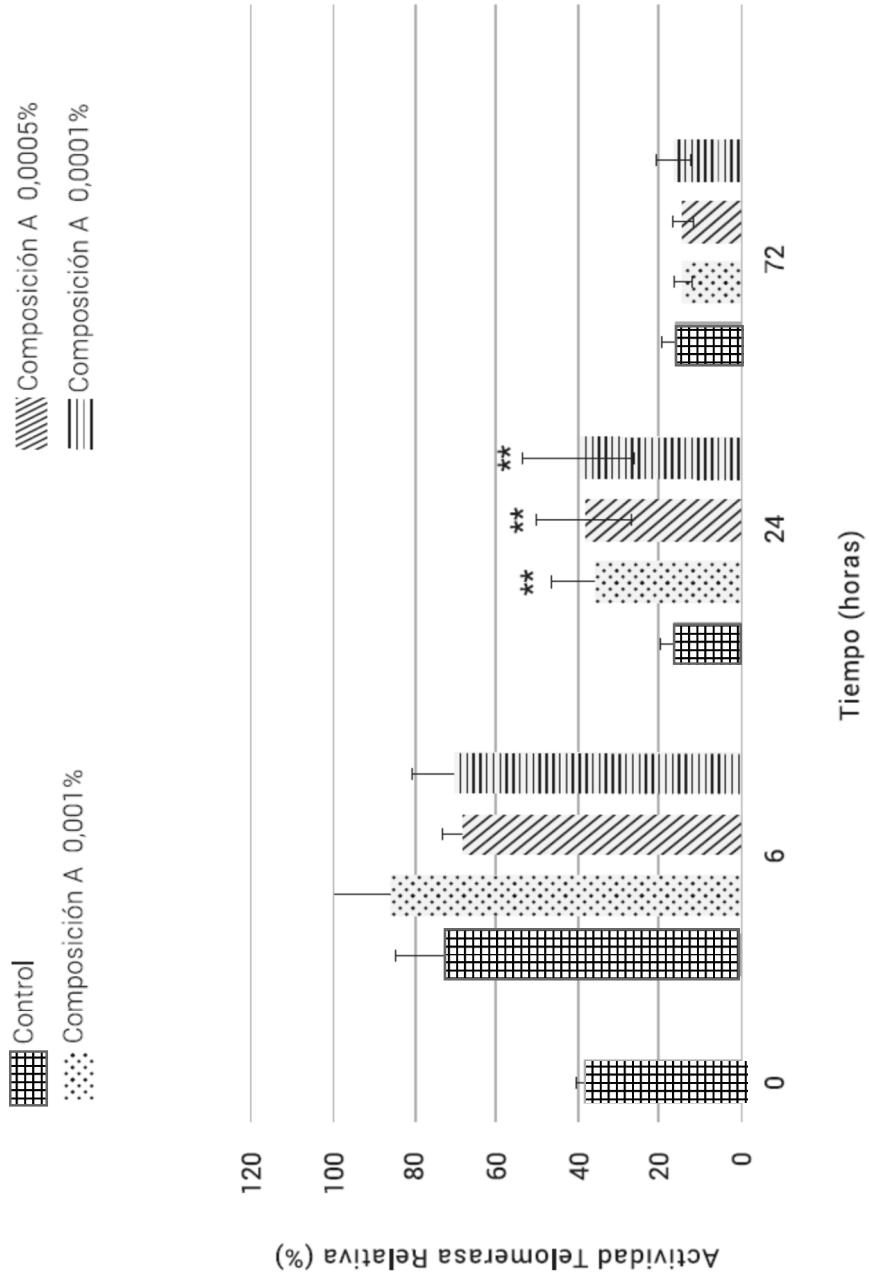


Figura 4

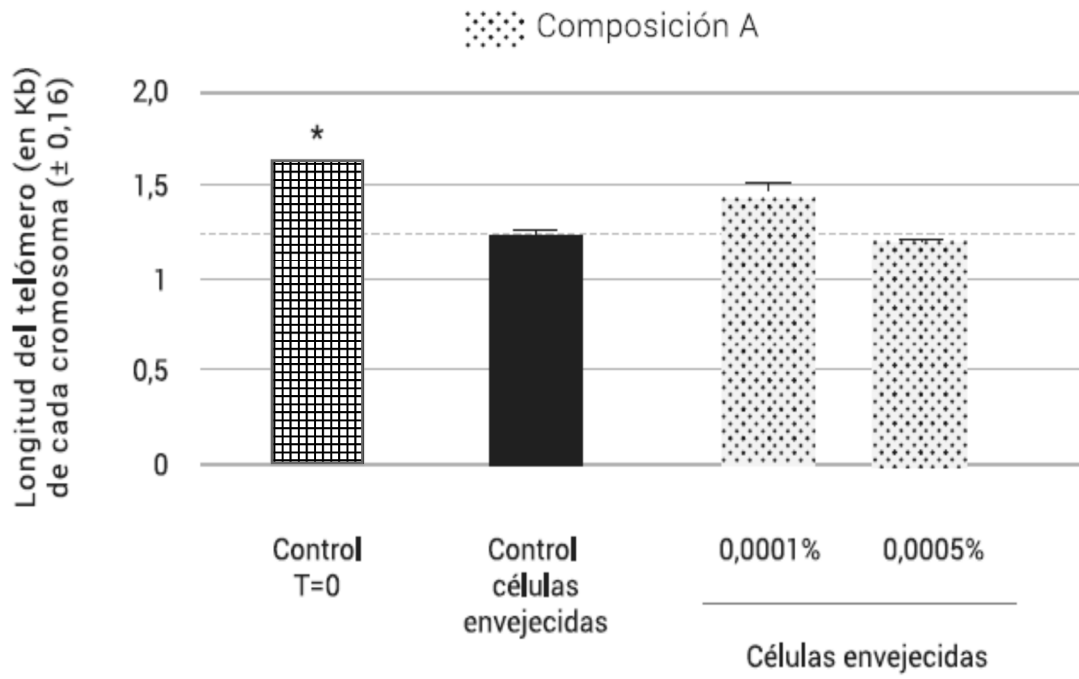


Figura 5

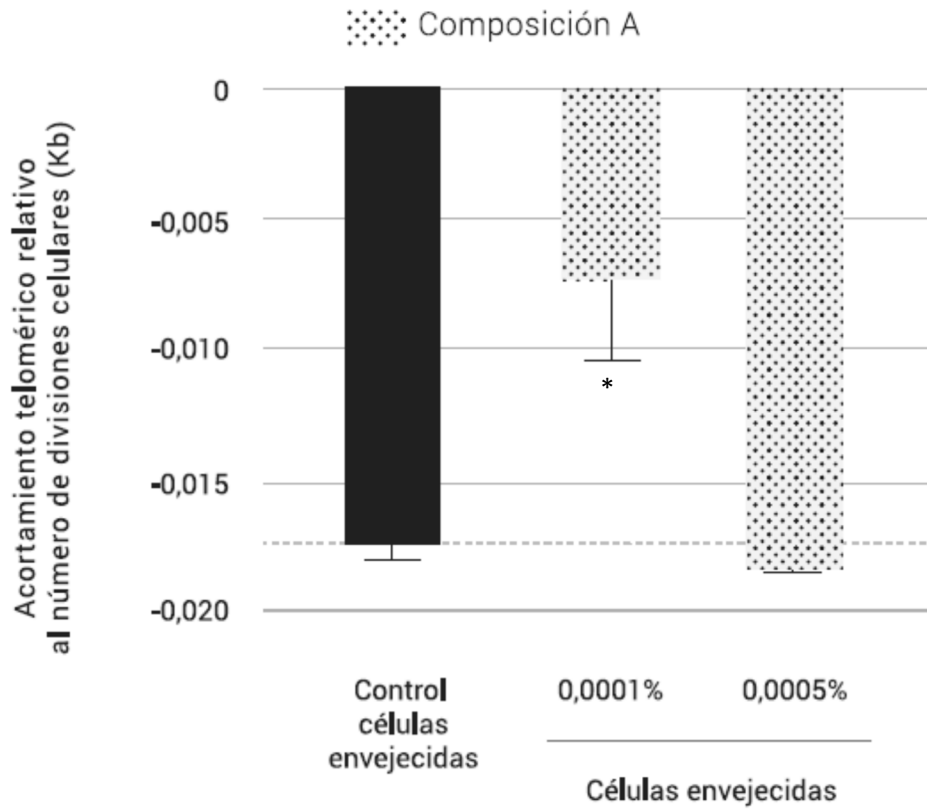


Figura 6

Composición A

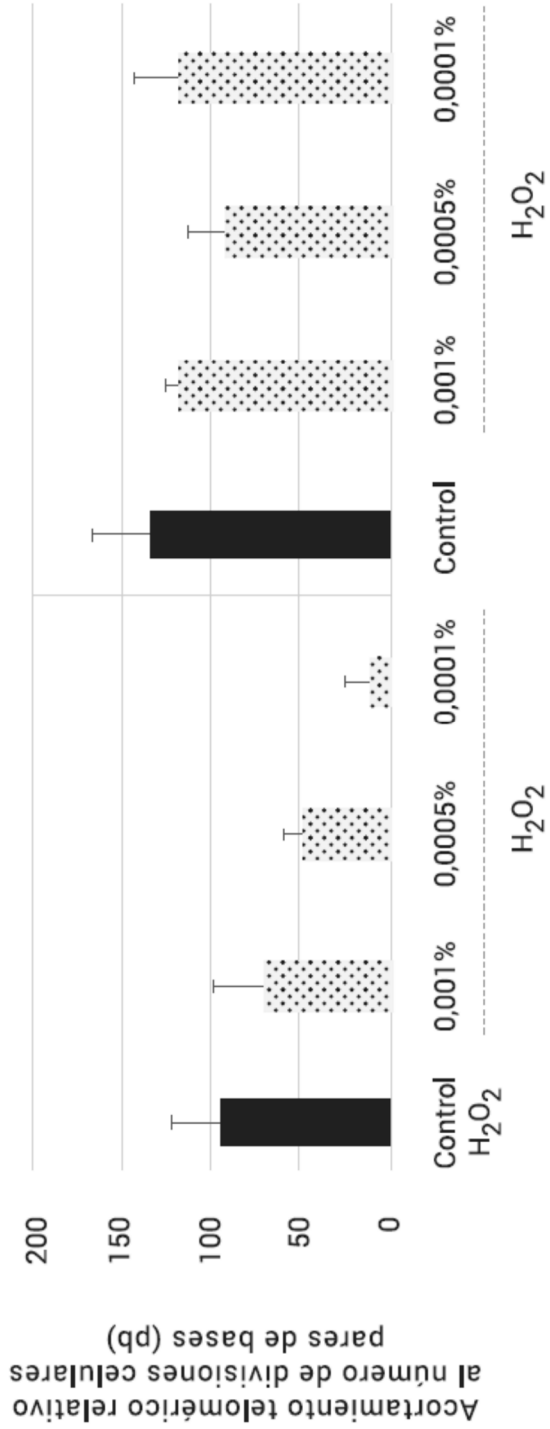


Figura 7

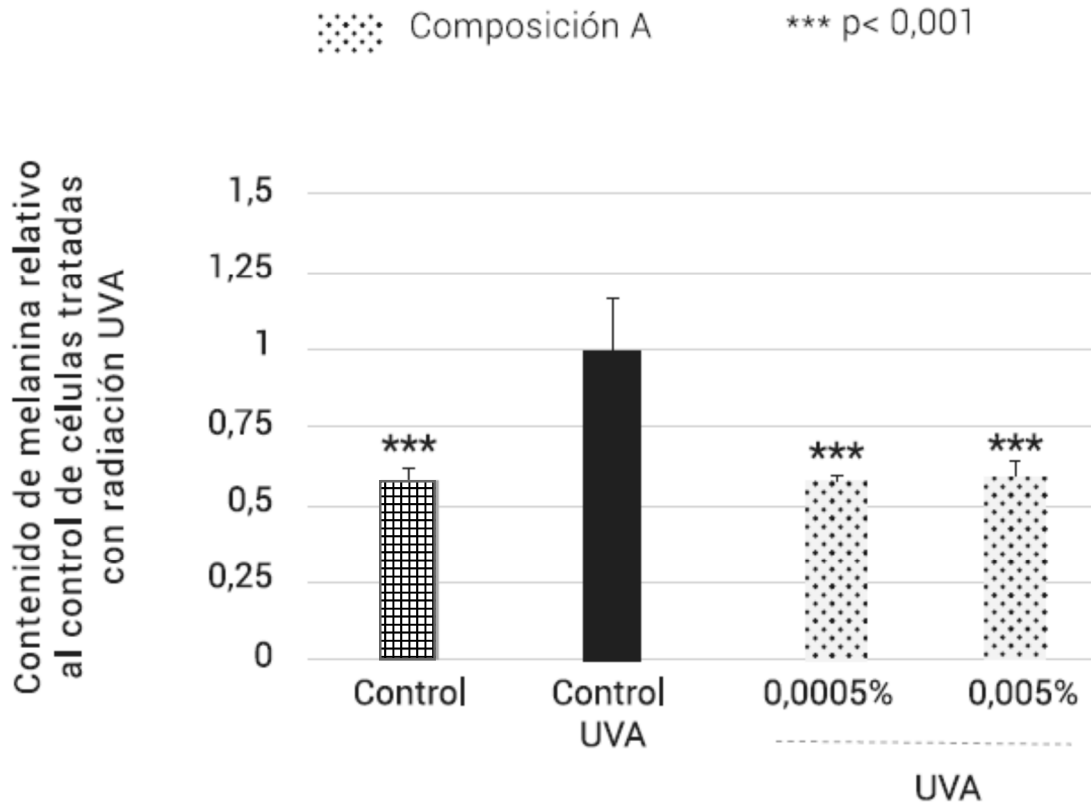


Figura 8

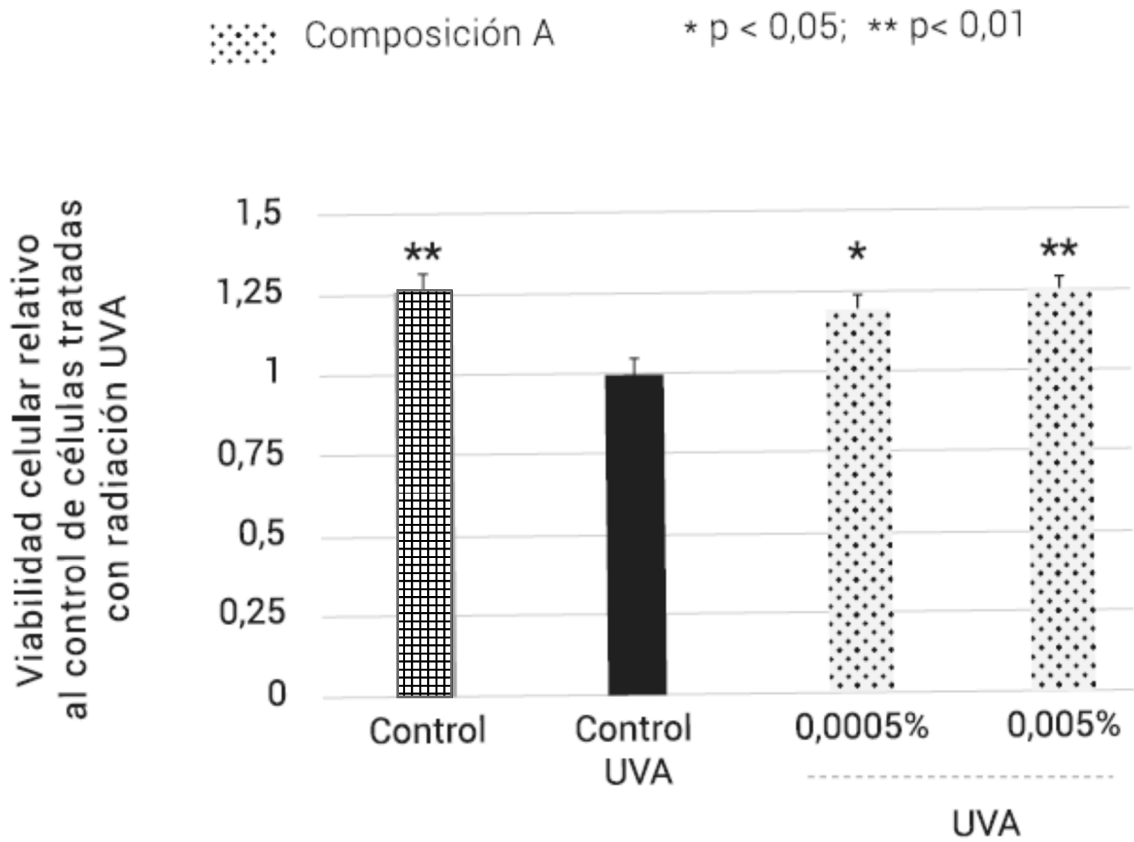


Figura 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 202230255

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2022

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K8/97** (2017.01)
A61Q19/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2012154949 A2 (MARY KAY INC et al.) 15/11/2012, reivindicaciones	1-14
A	CN 108904436 A (HANHOO COSMETICS CO LTD) 30/11/2018, reivindicaciones	1-14
A	WO 2016141315 A1 (AVON PROD INC) 09/09/2016, reivindicaciones	1-14
A	US 2014106001 A1 (LEWIS ERIC) 17/04/2014, reivindicaciones	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.08.2022

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT