

AVISO DE NOTIFICACION  
CORREO CERTIFICADO



Radicación : 2-112778- -11-0 Fecha: 2007-11-27 09:43:51  
Trámite : 11 PATENTEIYII  
Evento : 379 FASENACIONALII  
Actuación : 432 COMUNICACTOADM  
Destinatario : MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO Folios 1

Señor (a) (es)  
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO  
CALLE 94 A NO. 7 A-09  
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 38860  
Fecha : 26/11/2007  
Expediente : 2-112778  
Trámite : 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II  
Evento : 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II  
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comedidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co), con el número de resolución a través de la opción servicios en línea - caracter general - consulta actos administrativos.

Secretaría General  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10  
Sede CAN: Cra 50 No. 26-55 Int 2 PBX: 3820840  
Fax: 3 82 26 95 3 50 52 20. Línea 018000 910165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. - Colombia

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN 38860**

Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. 02-112778

**EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en los artículos 4, numeral 24 del Decreto 2153 de 1992 y 50 del Código Contencioso Administrativo, y.

**CONSIDERANDO**

**PRIMERO:** Que mediante Resolución 15774 de 31 de mayo de 2007 esta Superintendencia negó el privilegio de patente de invención a la creación denominada: 'COMPOSICIONES DE COMBINACIONES MARINAS Y EXTRACTOS DE PLANTAS'.

**SEGUNDO:** Que mediante escrito radicado en esta entidad el 12 de julio de 2007, bajo el número 02-112778-00008-0000, la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada del solicitante BENGT KRISTER OLSON, interpuso recurso de reposición contra la decisión contenida en la citada resolución, con el objeto de que se revoque la mencionada providencia y en su lugar, se continúe con el trámite de la solicitud.

**TERCERO:** Que el recurso a que hace referencia el ordinal anterior se fundamentó, en síntesis, de la siguiente manera:

Manifiesta la recurrente, luego de transcribir un aparte del artículo 45 de la Decisión 486, que de acuerdo con esta disposición "sólo si la invención no es patentable o no cumple con los requisitos establecidos en la Decisión 486, es que la oficina nacional competente debe notificar al solicitante para obtener una respuesta frente a las objeciones de patentabilidad. El Oficio 2376 resultado del examen de patentabilidad de la solicitud de patente resulta improcedente, toda vez que la solicitud de patente de la referencia sí cumplía con los requisitos de patentabilidad y las normas estipuladas en la Decisión 486 en sus reivindicaciones 1-40, tal y como se demostrará más adelante".

Señala a continuación que el Despacho "interpretó incorrectamente el literal b del artículo 15 de la Decisión 486 y concluyó que las reivindicaciones 1-19 y 21-40 reivindican parte aislada de material biológico existente en la naturaleza y que en consecuencia caen en la excepción de patentabilidad mencionada.

"A este respecto, pongo de presente a este Despacho que la presente invención se refiere a una combinación de extractos la cual no se encuentra como tal en la naturaleza. Es decir, la presente invención no se dirige a los extractos individuales sino a la combinación particular de los extractos (i), (ii) y (iii) y dicha combinación no ocurre naturalmente para ser aislada. Así entonces, los inventores de la presente invención han hecho un trabajo de investigación y desarrollo de un

**COMBINED MARINE AND PLANT EXTRACT COMPOSITIONS****FIELD OF THE INVENTION**

- 5 The present invention concerns compositions for oral use, said compositions containing cartilage or compounds extractable from cartilage as well as hydrophilic and lipophilic antioxidants.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10

Free radicals are formed in the body, e.g. in the skin, as a result of UV radiation, pollution, alcohol, etc. Excess of free radicals can cause severe damage to tissue structure, including skin structure, and thus signs of ageing begin to appear.

- 15 There has therefore been made use of antioxidants, both hydrophilic and lipophilic in combination, in reducing the oxidative stress caused by free radicals in the skin (Maffei Facino *et al.* ("Free Radical Scavenging and Anti-enzyme Activities of Procyanidines from *Vitis vinifera*" *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 44(1), Nr. 5 (1994), pp 592-601).

- 20 US 5,648,277 discloses oral formulations comprising both hydrophilic and lipophilic antioxidants.

JP 09 241637 discloses compositions comprising an active free-radical scavenger and uronic acids or mucopolysaccharides.

25

It has also been established that the administration of protein complexes containing mucopolysaccharides derived from marine cartilage sources have the ability to improve the texture of the dermis of the skin by making it more dense and firm (Kieffer ME, Efsen J., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 1998 Sep; 11(2):129-136).

30

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present investigators have found that the unique combination of a cartilage extract with a special blend of plant extract results in a surprisingly effective composition for  
5 increasing collagen synthesis in the skin as well as reducing to a remarkable level the radical mediated oxidation within the dermis. A decrease in collagen synthesis and radical oxidation are both associated with the ageing process in the skin.

In a first aspect, the invention relates to a composition for oral administration comprising  
10 plant extract and cartilage extract wherein the plant extract comprises grape seed extract and tomato extract.

The invention may be alternatively defined as a composition for oral administration comprising plant extract and cartilage extract wherein the plant extract comprises grape  
15 seed extract and lycopene in a weight/weight ratio of about 5:1 to 15:1, preferably about 10:1.

A further aspect of the invention relates to a composition for oral administration, said composition comprising i) cartilage, one or more compounds extractable therefrom, or  
20 derivatives thereof; ii) one or more hydrophilic antioxidants; and iii) one or more lipophilic antioxidants; wherein said composition increases collagen synthesis by at least 35% in a cell model.

A composition as defined herein for the general maintenance of healthy skin, to delay the  
25 onset of the degeneration of skin due to ageing or UV exposure, and for the treatment of the signs of ageing in skin is a still further aspect of the invention.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

30 In the context of the present invention, the term "hydrophilic" as applied to the hydrophilic antioxidant generally means that the antioxidant is sufficiently soluble in, and hence able to function in, an aqueous medium in the body. In the present context, an antioxidant is considered to be hydrophilic if it has a solubility in water of above 0.05 g per 100 g of water. A hydrophilic antioxidant preferably has a solubility in water of above 0.5 g, more

preferably above 1 g, in particular above 5 g, more particularly above 10 g, most particularly above 25 g, especially above 50 g, such as above 100 g per 100 g of water.

Similarly, the term "lipophilic" as applied to the lipophilic antioxidant generally means that it is sufficiently soluble in, and hence able to function in, a lipid medium in the body. This also means that it has a very low solubility in water. In the present context, an antioxidant is considered to be lipophilic if it has a solubility in water of below 0.05 g per 100 g of water. A lipophilic antioxidant preferably has a solubility in water of below 0.005 g, in particular below 0.0005 g per 100 g of water.

10

The term "cartilage extract" is intended to include cartilage, components that may be extracted therefrom, and derivatives thereof, including synthetic forms of compounds extractable from cartilage and synthetically prepared derivatives. Compounds termed "cartilage extract" may also be found in other tissue containing connective tissue, e.g. skin or hide, and may be extracted therefrom. The cartilage may be selected from the group consisting of marine animal cartilage, fish cartilage, mollusc cartilage and land-dwelling mammal cartilage. Marine animals may be selected from the group consisting of a whale, dolphin and seal; the fish may be selected from the group consisting of shark, salmon, tuna, cod and other known fish; the mollusc may be a squid; and land-dwelling mammal may be selected from the group consisting of a bovine, porcine, chicken, duck and turkey. The cartilage or extracts therefrom are preferably selected from bovine cartilage, porcine cartilage, shark cartilage, squid cartilage, chicken cartilage and salmon cartilage, and extracts therefrom.

25 Cartilage itself may be used. It may typically be used in the form of dried, e.g. lyophilised, comminuted cartilage. Useful extracts of the above mentioned types of cartilage or other tissue containing the appropriate components may typically be prepared through partial enzymatic proteolytic hydrolysis of cooked tissue followed by filtration and drying of the hydrolysate, e.g. through spray drying or lyophilisation. Such extracts have the advantage of being partially or fully soluble in aqueous media. (prepared according to US.3,862,003)

The cartilage extract typically comprises of one or more compounds extractable from cartilage, and preferably comprises glycosaminoglycans, optionally bound to a peptide.

The cartilage extract preferably comprises chondroitin sulphate, keratan sulphate, hyaluronic acid, or dermatan sulphate or mixtures thereof. The term "cartilage extract" is

intended to include compounds obtainable from cartilage but the compounds may actually be obtained from other sources. A particularly preferred source of cartilage extract is shark cartilage.

- 5 The term "cartilage extract" may relate to compounds extractable from cartilage or derivatives thereof. As stated, the cartilage extract may come from other natural sources but may be from a synthetic source, i.e. synthetically or semi-synthetically prepared. Preferably, the cartilage extract is extracted from natural source, most preferably, the extract is extractable from cartilage, particularly preferably the extract is extracted from
- 10 cartilage.

- As stated, the invention relates in a first aspect to a composition for oral administration comprising plant extract and cartilage extract wherein the plant extract comprises grape seed extract and tomato extract in a weight/weight ratio of about 2:1 to 1:2, preferably
- 15 about 1:1. The present investigators have found that the unique combination of a cartilage extract with a special blend of plant extract resulted in a surprisingly effective composition for increasing collagen synthesis in the skin as well as reducing to a remarkable level the UV radiation and oxidative stress, such as radical oxidation, related to the degradative process within the dermis.

20

The beneficial effects of a combination of grape seed extract and tomato extract as antioxidants were unexpectedly dramatically improved by the addition of cartilage extract. The results were surprisingly in part since cartilage extract has no antioxidant activity of its own.

25

Typically, the cartilage extract and the plant extract are present in a weight/weight ratio of about 1:2 to 2:1, preferably about 1:1.

- The cartilage extract preferably comprises glycosaminoglycans selected from the group
- 30 consisting of a chondroitin ester, a keratan ester, hyaluronic acid or an ester thereof, a dermatan ester, heparin, a heparan ester. These may be bound to a protein or peptide or as epimeric or polymeric forms of chondroitin ester, a keratan ester, hyaluronic acid or an ester thereof, a dermatan ester, heparin, a heparan ester, preferably chondroitin sulphate, keratan sulphate, hyaluronic acid or an ester thereof, a dermatan sulphate, a heparin, a
- 35 heparan sulphate

The glycosaminoglycans may be selected from the group consisting of chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulphate, and keratan sulphate, each of which may be optionally bound to a peptide. Most preferably, the composition of the present invention comprises

5 cartilage extract comprising chondroitin sulphate, optionally bound to a peptide.

In a typical embodiment of the present invention wherein the cartilage extract comprises 5-100% w/w of chondroitin sulphate.

10 In a preferred embodiment, the composition of the present invention comprises less than 1% weight/weight collagen, preferably less than 0.5%, particularly preferably less than 0.1% collagen protein. In the typical manner collagen extract is prepared, it does not comprise collagen to any appreciable amount. The extract is preferably prepared through enzymatic proteolytic hydrolysis thus digesting collagen proteins into peptides. The

15 composition comprising this extract having this low collagen level exhibited the unexpected beneficial effects. Consequently, collagen or a source thereof is preferably not further added to the composition of the present invention. In a most preferred embodiment, the composition is essentially collagen-free.

20 Similarly, a composition of the present invention typically comprising less than 0.025 % beta-carotene, preferably less than 0.02% beta-carotene, particularly less than 0.01% beta-carotene. Thus, a further aspect of the invention relates to a composition that can achieve the beneficial effects as described *infra* with very little or essentially no beta-carotene.

25

Conversely, the current understanding is that the lycopene content, relatively or absolutely, is particularly important to the unexpected beneficial effects of the composition of the present invention. The plant extract, specifically the tomato extract, comprises lycopene. Preferably, the tomato extract comprises about 5 to 12%, typically

30 approximately 10% lycopene, weight/weight. The tomato extract may be from a single or a blend of tomatoes.

In a typical embodiment, the tomato variety which is used to prepare the tomato extract is *Lycopersicum esculentum*, thereby providing suitable absolute and relative levels of

35 lycopene.

In a preferred embodiment of the present invention, the composition 0.1 to 5 % of lycopene weight/weight, preferably 0.2 to 4% lycopene, such as 0.3 to 2% lycopene, most preferably 0.3 to 1% lycopene, particularly 0.3 to 0.8%, such as 0.3 to 0.6% lycopene.

5

In an alternative definition of the composition of the present invention, the composition comprises a plant extract and a cartilage extract wherein the plant extract comprises grape seed extract and lycopene in a weight/weight ratio of about 5:1 to 15:1, preferably about 10:1. As stated, lycopene in said ratio is, according to the current understanding of

10 the invention, of significant importance for achieving the surprising beneficial antioxidant effect.

In a suitable embodiment, the antioxidant activity  $IC_{50}$  of the lipophilic antioxidant is lower than  $1.2 \times 10^{-7}$  for scavenging  $R^{\bullet}/ROO^{\bullet}$  radicals in lipid peroxidation of an unsaturated phospholipid in an aqueous medium. Typically, the lipophilic antioxidant exhibiting an antioxidant activity  $IC_{50}$  of at most  $1.2 \times 10^{-7}$  for scavenging  $R^{\bullet}/ROO^{\bullet}$  radicals in lipid peroxidation of an unsaturated phospholipid in an aqueous medium is the carotenoid compound lycopene (also termed  $\psi, \psi$ -carotene). Lycopene may typically be obtained by extraction from certain fresh fruits such as tomatoes, water melon, red grapefruit or guava fruit in a manner known *per se*, or it may be prepared synthetically in a known manner.

The beneficial effects of the oral composition of the present invention is the result of the novel combination of three components: cartilage extract, grape seed extract and tomato extract. Grape seed extract provides hydrophilic antioxidants. Tomato extract provides lipophilic antioxidants. The invention thus relates to a novel combination of antioxidants with compounds extractable from cartilage. A further aspect of the present invention thus relates to a composition for oral administration, said composition comprising i) cartilage, one or more compounds extractable therefrom, or derivatives thereof; ii) one or more hydrophilic antioxidants, and iii) one or more lipophilic antioxidants; wherein said composition increases collagen synthesis by at least 35% as determined by Test Method A.

Collagen synthesis decreases notably in aged skin cells. The decrease of collagen in skin results in a change in texture and rheological features of the skin, and the typical signs of ageing such as wrinkles, decreased smoothness, loss of elasticity and firmness.

As shown in Example 2, the composition of the present invention resulted in a surprisingly dramatic increase in collagen synthesis, in comparison to other combinations and individual components. The synthesis of collagen was evaluated by measuring the incorporation of radioactive proline ( $[^{14}\text{C}]$ -Proline) into proline-containing proteins, which are mostly regarded to be collagen, wherein 30% of the total number of amino acids are proline.

Dermal skin fibroblasts cultured in medium containing a combination of grape seed (G) extract and tomato (T) extract, GT (as disclosed in US 5,648,277), resulted in a decrease in the degree of incorporation of proline compared to the control: 3.6% incorporation compared with 4.8% in the control, a 25% decrease. Cell cultures containing a combination fish (F) extract and tomato (T) extract, FT, had no significant influence on the proline incorporation, since the degree of incorporation was 5.0 % compared with 4.8% in the control, a 4 % increase, only. Cell cultures containing a combination of fish (F) and grape seed (G) extract, FG, resulted in a small increase in the degree of incorporation of proline: 5.5% incorporation, a 10% increase compared to the control. Cell cultures containing the only the fish (F) extract resulted in an increase in the degree of incorporation of proline: 6.2% incorporation, a 29 % increase.

Cells cultured with a composition according to the present invention, comprising fish, extract (F), grape seed extract (G), and tomato extract (T), FGT, extracts however, surprisingly resulted in a dramatic 80% increase in proline incorporation: (8.4% of proline incorporated). Given that GT extract resulted in a 25% decrease in collagen synthesis and F extract resulted in a 29% increase in collagen synthesis, an 80% increase in collagen synthesis upon combining F with GT is surprising.

The one or more hydrophilic antioxidants of the compositions of the present invention may be from natural or synthetic sources, preferably natural sources. In a typical embodiment, the natural source is selected from the group consisting of pine bark, *Vitis vinifera*, *Camellia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silybum marianum*.

In a suitable embodiment, the one or more hydrophilic antioxidants are extractable from grape seed of *Vitis vinifera*.

The natural source of the one or more hydrophilic antioxidants typically contain up to 25% w/w of catechin, epicatechin and gallic acid; up to 90% w/w of epicatechin dimer, trimer and/or tetramer, and/or gallates thereof; and up to 10% w/w of epicatechin pentamer, 5 hexamer and/or heptamer, and/or gallates thereof.

The one or more hydrophilic antioxidants may be selected from the group consisting of polyphenols and esters thereof; ascorbic acid (vitamin C) and esters thereof; and pharmaceutically acceptable salts thereof. The polyphenols are typically catechins; 10 leucoanthocyanidins and flavanones; flavanins, flavones and anthocyanins; flavonols; flavonolignans; and oligomers thereof.

In a preferred embodiment, the hydrophilic antioxidants is a catechin selected from the group consisting of proanthocyanin A2 and oligomeric procyanidol (OPC), most preferably 15 an oligomeric procyanidol.

Flavonolignans are typically silymarin or one of the components thereof such as silybin, silydianin, silychristin and isosilybin.

20 In the composition of the invention, the hydrophilic antioxidant is typically one which exhibits an antioxidant activity  $IC_{50}$  of at most  $5 \times 10^{-7}$  for scavenging  $R^{\bullet}/ROO^{\bullet}$  radicals in lipid peroxidation of an unsaturated phospholipid in an aqueous medium.

As stated, a particularly preferred hydrophilic antioxidant is an extract from grape seed, 25 i.e. seeds of *Vitis vinifera*, said extract typically being obtained by extracting grape seeds using organic solvents such as acetone and/or ethyl acetate or the like, evaporating the solvents, re-dissolving the residue in water, and filtering and drying the filtrate, e.g. by spray drying or lyophilisation. In a particularly preferred embodiment, such an extract typically contains up to 25% w/w of catechin, epicatechin and gallic acid; up to 90% w/w of 30 epicatechin dimer, trimer and/or tetramer, and/or gallates thereof; and up to 10% w/w of epicatechin pentamer, hexamer and/or heptamer, and/or gallates thereof.

The one or more lipophilic antioxidants may also be from a natural or synthetic sources, typically a natural source. The lipophilic antioxidant may be a mixture of antioxidants such 35 as an extract from a natural source comprising a complex mixture of lipophilic

antioxidants. A suitable natural source for the lipophilic antioxidant is a tomato variety, particularly the *Lycopersicum esculentum* variety.

The one or more lipophilic antioxidants are typically carotenoids, procarotenoids, 5 tocopherols, phytosterols and ubiquinones. The carotenoids are particularly interesting lipophilic antioxidants and may be selected from the group consisting of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene,  $\delta$ -carotene, lycopene ( $\psi, \psi$ -carotene), zeaxanthin, cryptoxanthine, lutein, and xanthophyll.

- 10 As stated, the carotenoid lycopene is an especially interesting lipophilic antioxidant. The composition of the present invention most preferably comprises lycopene. Extracts serving as sources of lipophilic antioxidant preferably comprise 5-12% lycopene, such as 7-12% lycopene, preferably approximately 10 % lycopene. This may typically translate to a composition of the present invention comprising 0.1 to 5 % of lycopene weight/weight, 15 preferably 0.2 to 4% lycopene, such as 0.3 to 2% lycopene, most preferably 0.3 to 1% lycopene, particularly 0.3 to 0.8%, such as 0.3 to 0.6% lycopene, weight/weight.

A natural source of the lipophilic antioxidant preferably comprises

- |    |            |                            |
|----|------------|----------------------------|
|    | 5-12%      | lycopene                   |
| 20 | 1-1.5%     | tocopherols                |
|    | 0.05-0.15% | beta-carotene              |
|    | 0.5-0.75%  | phytoene                   |
|    | 0.5-0.55%  | phytofluene;               |
|    |            | most preferably comprising |
| 25 | 7-12%      | lycopene                   |
|    | 1-1.5%     | tocopherols                |
|    | 0.05-0.15% | beta-carotene              |
|    | 0.5-0.75%  | phytoene                   |
|    | 0.5-0.55%  | phytofluene.               |

30

- The source of the one or more lipophilic antioxidants preferably comprises less than 1% beta-carotene, such as less than 0.75%, such as less than 0.5%, preferably less than 0.25%, most preferably less than 0.2%, particularly less than 0.15%. Similarly, a composition of the present invention typically comprises less than 0.025 % beta-carotene, 35 preferably less than 0.02% beta-carotene, particularly less than 0.01% beta-carotene.

Thus, a further aspect of the invention relates to a composition that can achieve the beneficial effects as described *infra* with very little or essentially no beta-carotene.

In a typical embodiment, the sole source of the lipophilic antioxidant is provided by the  
5 tomato extract. Alternatively, the lipophilic antioxidant is the tomato extract.

In a typical embodiment of the invention, the composition comprises

- 20-40% cartilage extract, such as 25-35%, preferably 27-35%, such as 30-35%  
cartilage extract, weight/weight;  
10 1-10% grape seed extract, such as 2-8%, preferably 3-7%, such as 3-5% grape  
seed extract weight/weight; and  
1-10% tomato extract, such as 2-8%, preferably 3-7%, such as 3-5% tomato  
extract, weight/weight.

- 15 A typical composition of the present invention comprises fish extract (F), grape seed  
extract (G), and tomato extract (T) in a weight ratio of about 5:1:1 to 15:1:1, such as about  
10:1:1.

- As stated, the composition of the present invention is able to increase collagen synthesis  
20 by at least 35% as determined by Test Method A. Preferably, however, use of the  
composition under the conditions of Test Method A results in an increase in collagen  
synthesis by at least 40%, such as by at least 45%, such as at least 50%, at least 55%,  
preferably at least 60%, such as at least 65%, at least 70%, most preferably at least 75%.

- 25 Thus, a further aspect of the invention relates to a method of increasing collagen  
synthesis or lessening the decrease in collagen synthesis in the dermis comprising the  
oral administration of a composition as defined herein.

- The present investigators have found that not only does the novel composition of the  
30 present invention result in an increase in collagen synthesis but also has other indicators  
of its utility for the treatment of ageing or skin exposed to UV radiation. Accordingly, in a  
suitable embodiment, the composition reduces the harmful effects of free radicals by at  
least 40% as measured by MMP-1 activity compared to a control under the conditions of  
Test Method B, such as at least 45%, such as at least 50%. The oxygen free radicals and

the harmful effects therefrom are typically due to UV exposure but may result from other environmental, physiological or genetic factors.

The UV-induced overproduction of MMPs is considered to be one of the major causes of photoageing. UV radiation activates dermal cells resulting in overproduction of MMPs, which are enzymes which degrade collagen and other proteins that comprise the dermal extracellular matrix. The dermal degradation (breakdown) is followed by repair that is imperfect. Imperfect repair yields a deficit in the structural integrity of the dermis and it is repeated with each intermittent exposure to UV radiation leading to accumulation of dermal scarring and ultimately to visible signs of photoageing (2-5). The effect of UV light on induction of MMPs was confirmed also *in vitro* in fibroblast cultures (6,7). Other studies focusing on mechanism of UV induction of MMPs suggest that UV induced singlet oxygen (a reactive oxygen species) has a direct effect on cells resulting in the production of MMPs (8). Thus antioxidants and specifically those that scavenge singlet oxygen will counteract the UV-stimulated MMP synthesis. However, it cannot be excluded that also other free radical species are involved in stimulation of MMP synthesis. Old cells in culture as well as UV- or sun-exposed skin cells produce higher amounts of MMP. The reduction in MMP-1 activity as a result of the use of a composition of the present invention is thus an indicator of its utility for the maintenance of healthy skin.

Furthermore, the composition of the present invention decreases the formation of advanced glycosylation end products (AGE) by at least 10% as measured under the conditions of Test Method C in comparison to a control, such as by at least 20%, such as at least 30%, 40%, 50%, or 60%, preferably least 70%, particularly at least 80, or 90%, most preferably at least 100 or 110%.

AGE (advanced glycation endproducts, also known as Amadori products) are the result of glycation (glycoxidation), a non-specific binding reaction between proteins and carbohydrates. AGEs accumulate both within individual cells and in the extracellular matrix of tissues consisting of long-lived proteins such as collagen in skin. The AGE-cross-linked proteins are non-functional proteins and tend to aggregate in the extracellular matrix or in the cytoplasm of the cells and are believed to have a deleterious effect on the overall protein synthesis. Initially, an early stage product (Amadori product) is formed when glucose reacts with proteins. This Amadori product then undergoes further rearrangement to form a late-stage brown pigments that can cross-link proteins. After the

rearrangement, late-stage products continue to accumulate in long-lived proteins, such as collagen, over long periods of time with high cross-linking of proteins. AGE formation *in vivo* has been shown to increase with organismal and cellular ageing both *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, the level of AGE accumulation is thought to reflect the serum glucose levels.

- 5 A critical role in the formation of late stage AGEs is ascribed to oxidation, since glycation itself is a reversible process. Oxidation, however, is responsible for the permanent chemical damage and the loss of functionality of proteins due to permanent cross-links (9). Apart from being non-efficient and having a decreasing effect on overall protein synthesis, AGEs were shown to be chromophores that, after being irradiated with UV
- 10 light, generate significant amounts of active oxygen radicals (10). Oxidative stress thus contributes to formation of AGEs.

- Upon a single dose of exposure to UV radiation ( $5 \text{ J/cm}^2$ ), the AGE level in non-supplemented control cells increased approximately 20 times compared to non-irradiated
- 15 control cells. Under the same conditions, the AGE level in cultures supplemented with F increased approximately 40 times, indicating that F has no protective effect on AGE formation upon UV irradiation. Increase in AGE levels in F treated cells was in more dramatic at  $7.5 \text{ J/cm}^2$ . From Figure 3 it appears that the AGE levels in cells supplemented with FG increased 72 units, which is in the same range as untreated irradiated control
- 20 cells (a 10% decrease relative to the control).

Remarkably, FGT cells treated cells showed a surprising decrease in AGE level of approximately 22 units relative to non-irradiated cells, which translates to a 120% decrease in AGE concentration relative to non-treated irradiated cells.

25

Thus compositions of the present invention resulted in improvements in proline incorporation as well as providing beneficial effects in UV exposed cells in terms of MMP-1 activity and AGE formation.

- 30 Thus, a further aspect of the invention relates to a composition suitable for the cosmetic treatment of the signs of ageing in skin and for the general maintenance of healthy skin. The signs of ageing may be the result of a number of factors, such as sunlight, time, diet, and other environmental conditions.

- 35 Typically, a composition of the present invention comprises

1-80% w/w of compounds extractable from cartilage, weight/weight;  
0.1-75% w/w of grape seed extract, weight/weight; and  
0.002-25% of lycopene, weight/weight.

- 5 Most preferably, a composition of the present invention comprises  
27-35%, typically 30-35% cartilage extract, weight/weight  
1-10% grape seed extract, such as 3-5% grape seed extract weight/weight; and  
0.1 to 5% lycopene, typically 0.2 to 1% lycopene, weight/weight.

- 10 The present investigators have prepared suitable compositions comprising

100-110 mg of fish extract  
95-105 mg of plant extracts  
25-35 mg of *Acerola* extract  
60-90 mg of microcrystalline cellulose

- 15 3.5-4.5 mg of silicon dioxide

wherein the plant extracts comprise an oligomeric procyanidol and lycopene and the fish  
extracts comprise a glycosaminoglycan.

A further suitable composition according to the invention comprises

- 20 100-110 mg of fish extract  
95-105 mg of plant extracts  
60-65 mg of inulin  
25-35.00 mg of ascorbic acid  
10-20 mg of zinc gluconate.

- 25 10-15 mg of silicon dioxide

wherein the plant extracts comprise an oligomeric procyanidol and lycopene and the fish  
extracts comprise a glycosaminoglycan.

- Thus, a composition of the present invention may further comprise of other components  
30 such as further nutritional supplementation such as vitamins, minerals, amino acids and  
carbohydrates. In a preferred embodiment, the composition further comprises a Vitamin C  
or an extract containing Vitamin C, such as further comprising *Acerola* extract.

- As stated, the relative and absolute amounts of the constituents are, under the current  
35 understanding of the present invention, of great importance to achieving the surprising

beneficial effects of the compositions of the present invention. Accordingly, the hydrophilic and the lipophilic antioxidants are preferably present in a wt/wt ratio in the range from about 1:1 to about 200:1, such as from 2:1 to 100:1, in particular from 5:1 to 50:1, especially from 5:1 to 20:1, preferably from 5:1 to 15:1, most preferably about 7:1 to 12:1, 5 such as about 10:1.

Similarly, the cartilage, one or more compounds extractable thereof and the hydrophilic antioxidants are preferably present in a wt/wt ratio in the range from about 1:1 to about 200:1, such as from 2:1 to 100:1, in particular from 5:1 to 50:1, especially from 5:1 to 20:1, 10 preferably from 5:1 to 15:1, most preferably about 7:1 to 12:1, such as about 10:1.

Generally, an important aspect of the present invention relates to a composition wherein the i) cartilage, one or more compounds extractable therefrom, or derivatives thereof, ii) one or more hydrophilic antioxidants, and iii) one or more lipophilic antioxidants are 15 present together in sufficient amounts to suppress MMP-1 activity, to suppress AGE formation or to increase collagen synthesis in human fibroblast cells cultured *in vitro*.

Similarly, a further important aspect of the present invention relates to composition wherein the i) cartilage, one or more compounds extractable therefrom, or derivatives 20 thereof, ii) one or more hydrophilic antioxidants, and iii) one or more lipophilic antioxidants are present in a ratio suitable to suppress MMP-1 activity, to suppress AGE formation or to increase collagen synthesis in human fibroblast cells cultured *in vitro*.

In a combination of preferred embodiments, the composition may comprise 0.25-15 mg of 25 lycopene and 2.5-100 mg of grape seed extract, preferably from 0.5-5 mg of lycopene and 5-50 mg of grape seed extract, particularly 0.75-2.5 mg of lycopene and 10-30 mg of grape seed extract, particularly 1-2.5 mg of lycopene and 10-25 mg of grape seed extract.

In a further combination of embodiments, the composition may comprise 1-2.5 mg of 30 lycopene, 5-50 mg of grape seed extract and 50-200 mg of cartilage extract.

The compositions of the invention are for oral administration and may be administered in the form of a solid dosage form such as tablets, powders, granules, capsules, sachets or in a form of a liquid dosage form such as solutions, suspensions, tonics or syrups. Such 35 dosage forms may be prepared in a manner well known in the art of pharmaceutical

technology and may contain one or more excipients which may be any of those commonly used within the art. For solid compositions, conventional non-toxic solid excipients may be used including, but not limited to, e.g. pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, soybean fibre, magnesium stearate, sodium saccharin, talc, cellulose such as

- 5 microcrystalline cellulose, glucose, saccharose, silicon dioxide, magnesium carbonate or the like. Liquid dosage forms may be obtained by dissolving, dispersing etc. the active components and an optional pharmaceutical adjuvant in an excipient such as water or water-based liquids such as juices, oil or alcohol, in order to form a solution or suspension. If desired, the oral composition according to the invention may also contain minor
- 10 amounts of additives known in the art such as wetting or emulsifying agents, buffers, or the like. Such dosage forms may be formulated in accordance with principles well known in the art, cf. also e.g. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 15th Edition, 1975; or Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 31th Edition, 1996.

15

The composition may be such that the lipophilic antioxidant, such as the tomato extract, or, an extract comprising lycopene is formulated for normal release and the hydrophilic antioxidant, such as grape seed extract is formulated for delayed or slow release.

- 20 As illustrated from Example 5, the compositions when taken orally have an apparent visible effect on the condition of the skin. Figure 4 also depicts that those volunteers taking a composition of the present invention noticed improvements in overall skin condition, suppleness, quality of skin around the eyes and skin around the mouth. Thus, the results in Examples 1-4 translated successfully *in vivo*, the composition seemingly
- 25 acting systemically when taken orally.

The compositions of the present invention may be for use as an oral cosmetic product, a food or food supplement, a pharmaceutical or a dietetic.

- 30 A further aspect of the invention relates to a composition for use in the general maintenance of healthy skin, to delay the onset of the degeneration of skin due to ageing or UV exposure, and for the treatment of the signs of ageing in skin. The compositions of the present invention are suitable in treating ageing skin, skin exposed to sunlight or other forms of UV radiation, dry skin, rough skin, discoloured skin, skin with acne, scared skin,
- 35 skin with stretch marks, eczema and psoriasis.

A method for the cosmetic or prophylactic treatment of skin against the signs of skin ageing, and damage resulting from exposure to UV radiation comprising the oral administration of a composition defined *supra* is an important aspect of the invention.

- 5 Similarly, a method for the cosmetic or prophylactic treatment of ageing skin, skin exposed to sunlight or other forms of UV radiation, dry skin, rough skin, discoloured skin, skin with acne, scarred skin, skin with stretch marks, eczema and psoriasis, comprising the oral administration of a composition defined *supra* is a further aspect of the invention. The use of a composition defined *supra* for the preparation of an agent for the preventing
- 10 or slowing the signs of skin ageing, preventing or lessening the harmful effects of UV radiation exposure, for treating stretch marks, for treating acne, for lessening the symptoms of eczema, for assisting in scar formation and wound healing, for reducing scarring, for lessening the symptoms of psoriasis, or for treating rough, discoloured or dry skin is anticipated.

15

- In these uses, a typical daily dosage for an average adult person is from 55 to 3700 mg of the above defined mixture of cartilage component, hydrophilic antioxidant and lipophilic antioxidant, such as from 70 to 1000 mg. The administration may take place in one daily dose or in divided doses up to four times a day, such as 1, 2, 3 or 4 times, preferably 1 or
- 20 2 times daily.

- The compositions may be packaged according to principles well known in the art such as in tablet containers, blister packs or bottles. In the event that one of components is sensitive to light which in particular is the case if the lipophilic antioxidant is lycopene, it is
- 25 advisable to shield the composition from light. In the case of e.g. blister packs, this may suitably be attained if the blister packs are of the well-known type formed from two sheets of aluminium foil and aluminium coated plastic foil, respectively, such as a shaped (forming depressions) sheet of a plastic/aluminium laminate (e.g. a laminate of PVC, aluminium and orientated polyamide foils) and a thin, optionally varnished aluminium foil,
- 30 respectively.

The invention is illustrated further by the following, non-limiting examples.

## EXAMPLES

### EXAMPLE 1

*Determination of effective concentrations of hydrophilic antioxidants, hydrophobic  
5 antioxidants and cartilage extract.*

Various concentrations of grape seed extract (1-200 microg/ml), cartilage extract (0-  
1000mg/ml) and tomato extract (0-200 microg/ml) were tested in dose dependent manner  
in *in vitro* cultured human skin fibroblast. After evaluation of cell survival and growth rate  
10 under all culture conditions, a single optimal concentration for each ingredient was  
selected.

#### Method

Working solutions of cartilage extract, grape seed extract and tomato paste containing  
15 lycopene were prepared as follows:

#### Cartilage solution (40 mg/mL):

200 mg of Fish powder (cartilage extract prepared through enzymatic proteolytic  
hydrolysis of cartilage, filtration and spray drying of the hydrolysate) were dissolved in 5  
20 mL Hanks Buffered Saline Solution (Hanks) and sterile filtered.

#### Grape seed solution (40mg/mL):

200 mg of Grape seed extract (Indena, Milano, Italy) was dissolved in 5 mL Hanks  
Buffered Saline Solution (Hanks) and sterile filtered.

25

#### Tomato solution (pre-stock: 100 mg/mL)

Pro-stock: 400 mg of Tomato pasta (containing 40 mg Lycopene) is dissolved in 4 mL of  
tetrahydrofuran, sterile filtered and stored at -80°C until use.

#### 30 Tomato working solution (100 µg/mL):

Tomato working solution: Pre-stock is diluted 1:1000 just before use in cell medium  
DMEM.

Human fibroblast cells were cultured as follows:

10.000 cells/well were seeded in 24-well trays. Cells were allowed to attach overnight before the medium was changed to medium containing different concentrations of cartilage extract (F), grape seed extract (G) and tomato extract (T). Cell medium, DMEM, (10% Foetal Calf Serum, +Glutamine, Penicillin/streptomycin) was changed every second 5 to third day, except for medium containing TE which was renewed everyday. Cells were grown to confluence (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity) and counted every second day using 300 µL Trypsin/EDTA pr.well to detach the cells during a 10 min stay in the incubator at 37°C, where 200 µL were used to count cells/mL.

10 Cell survival and cell growth were evaluated after up to 15 days.

Cell survival was evaluated by measuring the MTT take-up in cells. The level of uptake corresponds to levels of mitochondrial activity which can be used as a sign of cell viability. The MTT is reduced to a blue coloured compound, formazan, which is detected by UV/VIS absorption at 595 nm with 655 nm as a reference

15

Cell growth was evaluated as a number of cells per culture flask which was counted using an electronic Counter Coulter®.

### Results

- 20 Cell cultures supplemented with 70 µg/mL of cartilage extract, 10 µg/mL of grape seed extract and 10 µg/mL of tomato extract (= 1.0 µg/mL lycopene) provided an optimal environment for cell growth. These concentrations had no toxic effect nor did change the rate of cell divisions. This results was further confirmed by a long term cultivation of fibroblasts in culture medium supplemented with the selected combination (above) over a 25 period of 50 days. The monitored cumulative population doubling levels (CPDL) that correspond to number of cell divisions and cell growth are not affected by the tested ingredients . The results are depicted in Table 1 and Figure 1.

Table 1

| Day | O     | F     | FGT   | GT    |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| 0   | 18    | 18    | 18    | 18    |
| 3   | 19,17 | 19,34 | 18,87 | 18,8  |
| 9   | 21,4  | 21,52 | 21,28 | 21,32 |
| 14  | 23,08 | 22,93 | 23,05 | 23,02 |
| 21  | 25,65 | 25,87 | 25,59 | 25,67 |
| 28  | 27,53 | 27,57 | 27,73 | 27,78 |
| 35  | 28,88 | 28,88 | 29,2  | 29,15 |
| 42  | 31,45 | 31,54 | 31,4  | 32,03 |
| 50  | 32,98 | 33,14 | 33,42 | 33,39 |

EXAMPLE 2**5** *Effect of composition on collagen synthesis*

In vitro test system was established to test the influence of F, G and T on the synthesis of collagen. The synthesis of collagen was evaluated by measuring the incorporation of radioactive proline ( $[^{14}\text{C}]$ -Proline) into proline-containing proteins, which are mostly regarded to be collagen, where the number of proline residues constitutes over 30% of the total number of amino acids. Various combinations of F, G and T in optimum concentrations determined as described in example 1) were added to the cell medium and the radioactivity of secreted and labelled proteins was measured after 24 hours.

**15** Method

Extracts of F, G and T were produced as in Example 1.

The incorporation of radiolabelled proline in cell human fibroblast cell cultures was carried out as follows (Test Method A): Various combinations of F, G and T were added on the day after seeding and cells were grown to confluence (approx. 1 week). The culture medium was exchanged daily. At confluence, the medium was changed to 0.5 mL radioactive solutions (25  $\mu\text{Ci}$ ) + 2.5 mL medium without F, G or T.

Cells were left in the incubator for the next 24h and then the medium was collected and subjected to the following procedure to measure the radioactivity:

*TCA precipitation:* 5  $\mu$ L of medium was mixed with 20  $\mu$ L BSA (0.5g/L) and 1 mL TCA (10%) and left at -20°C for 30 min. The samples were thawed and put through a

5 nitrocellulose filter to separate free radioactive proline from labelled proteins. The filter was transferred to a tube to which 2.5 mL of scintillation liquid was added. The tube was left in the dark for 1 h after which the radioactivity of the 5  $\mu$ L sample was measured on the scintillation counter.

10 Results

Summary of results are shown in Table 2a and 2b. Cell cultures containing the GT extract resulted in a decrease in the degree of incorporation of proline compared to the control: 3.6% incorporation compared with 4.8% in the control, a 25% decrease. Cell cultures containing the FT extract had no significant influence on the proline incorporation, since 15 the degree of incorporation was 5.0 % compared with 4.8% in the control, a 4 % increase, only. Cell cultures containing the FG extract resulted in a small increase in the degree of incorporation of proline: 5.5% incorporation, a 10% increase compared to the control.

Cell cultures containing the F extract resulted in an increase in the degree of incorporation 20 of proline: 6.2% incorporation, a 29 % increase. FGT extracts, however, surprisingly resulted in a dramatic 80% increase in proline incorporation: (8.4% of proline incorporated).

In this type of experiments, a difference above 30% is considered significant.

25

Table 2

| Treatment | Activity in dpm | Activity in $\mu$ Cl<br>Output | % incorporated<br>proline | Result relative<br>to control |
|-----------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| GT        | 4516            | 0.0015                         | 3.6                       | 20% decrease                  |
| Control   | 5787            | 0.0020                         | 4.8                       | -                             |
| FT        | 4516            | 0.0021                         | 5.0                       | no change                     |
| FG        | 5137            | 0.0023                         | 5.5                       | 10% increase                  |
| F         | 5787            | 0.0026                         | 6.2                       | 30% increase                  |
| FGT       | 7738            | 0.0035                         | 8.4                       | 80% increase                  |

**EXAMPLE 3***Effect of composition on human fibroblasts upon UV exposure*

UVA exposure is responsible for a number of degenerative changes in skin that lead to the visible signs of ageing (photo-ageing). The potential protective effect of F, G and T extracts and their combinations against UV induced damage was tested by monitoring biochemical markers associated with photoageing (levels of MMP-1 and AGEs) in skin fibroblast culture upon UV irradiation.

- 10 Cell cultures of human fibroblast were exposed to one dose of UVA radiation each day for 4 consecutive days. Two different doses were used (5 and 7.5 J/cm<sup>2</sup>) and corresponds to the maximal dose tolerated by cells before cell death occur.

- The cell culture was supplemented with various combinations of F, G and T (F, FG, FT, GT and FGT) using the optimum concentrations of F, G and T (as determined and described in Example 1) and the MMP-1 activity and AGE formation was measured after 1 day and 4 days.

**Methods**

- 20 Extracts were produced as described in Example 1.

Culturing of cells was carried out as follows:

- Cells with a given passage were changed to a medium containing the combinations of F, G and T treatment. At confluency they were split 1:4 to obtain 4 flasks for each treatment.
- 25 At confluency one (1:4 split) or two (1:2 split) were serially passaged to four new flasks.

UVA irradiation of cell culture was carried out as follows

- An UVA dose was produced using a 6x Philips 40W UVA Cleo Performance tubes. A Hagner UVA meter was used to measure the dose in W/m<sup>2</sup> and to calculate the needed time of exposure to achieve a wanted dose of 5, 7.5, 10 and 15 J/cm<sup>2</sup>. Preliminary experiments show that the optimum dose of irradiation not causing cell death was 7.5 J/cm<sup>2</sup>.

Determination of MMP-1 activity (endogeneous activity plus latent levels) was performed using a commercially available test system from APBiotech, Code RPN 2629 (Test Method B).

5 Determination of AGEs was based on ELISA technique (Test Method C):

Day 1: Microplates were coated with 50 ng of AGE/well, diluted in carbonate buffer, overnight at +4 °C.

Day 2: The wells were washed 4 times with PBST (PBS and 0.05% Tween 20) and then blocked in 200 µL/well of PBS-milk (6%) for 2h at room temperature (RT). Wells  
10 were then washed 4 times with PBST, before, firstly, the addition of 50 µL AGE standard (20-20.000 units/well) or 50 µL of sample (50 µg protein/mL) to the wells, followed by 50µL of the AGE polyclonal antibody (dilution 1/1000). The plate was placed at fast agitation for 2h at RT. The wells were washed 4 times with PBST before the addition of the second antibody (Polyclonal Rabbit, HRP, dilution  
15 1/1000) with 50 µL/well and placed on agitation for 2h at RT. Finally, the wells were washed 4 times in PBST, before the addition of the substrate (1 OPD table/3 mL ddH<sub>2</sub>O + 1/1000 (v/v) of hydrogen peroxide (35%) with 100 µL/well. The plate was left in a dark place, and after the development of appropriate colour, the reaction was stopped by the addition of 50 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). Plate absorbance was  
20 read at 490 nm (ref. 655 nm)

Results

Results for MMP-1 activity and AGE formation are shown in Figures 2 and 3, respectively.

25 1. MMP-1 Activity

UVA irradiation was shown to induce MMP-1 activity in untreated cells (control) in both the Day 1 and Day 4 studies, thereby confirming the capability of MMP1 induction in cultured fibroblasts by UVA. MMP-1 activity of the control cells approximately doubled during the  
30 photo-ageing process

Cells treated with GT showed a 34% and 58% increase on Days 1 and 4, respectively.

Conversely, MMP-1 activity was induced in cells supplemented with F. MMP-1 activity approximately tripled and quadrupled after UV exposure on Day 1 and Day 4, respectively.

- 5 Surprisingly, combining F with GT to form FGT resulted in a no increase in MMP-1 activity in UV exposed cells. Thus FGT treated cells have half of the MMP-1 activity as the control cells under identical conditions.

Table 3

10 Day1

|         | 0 J/cm <sup>2</sup> | 5 J/cm <sup>2</sup> | 7.5 J/cm <sup>2</sup> |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| control | 1                   | 2,01                | 1,80                  |
| GT      | 1                   | 1,34                | 1,34                  |
| FGT     | 1                   | 0,97                | 0,99                  |

Table 3a

Day 4

|         | 0 J/cm <sup>2</sup> | 5 J/cm <sup>2</sup> | 7.5 J/cm <sup>2</sup> |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| control | 1                   | 2,02                | 2,3                   |
| GT      | 1                   | 1,37                | 1,58                  |
| FGT     | 1                   | 1,04                | 0,99                  |

15 II. AGE Formation

- Results are depicted in Figure 3 and Table 4. Upon a single dose of exposure to UV radiation (5 J/cm<sup>2</sup>), the AGE level in non-supplemented control cells increased proximately 20 times compared to non-irradiated control cells. Under the same conditions,
- 20 the AGE level in cultures supplemented with F increased 40 times, which shows that F has no protective effect on AGE formation upon UV irradiation. From Figure 3 it appears that the AGE levels in cells supplemented with FG increased 72 units, which is in the same range as untreated irradiated control cells (a 10% decrease relative to the control).
- 25 Remarkably, FGT cells treated cells showed a surprising decrease in AGE level of approximately 22 units relative to non-irradiated cells, which translates to a 120% decrease in AGE concentration relative to non-treated irradiated cells.

Thus compositions of the present invention resulted in improvements in proline incorporation as well as providing beneficial effects in UV exposed cells in terms of MMP-1 activity and AGE formation.

5

Table 4

|         | 5 J/cm <sup>2</sup> | 7,5 J/cm <sup>2</sup> |
|---------|---------------------|-----------------------|
| control | 80,06               | 67,88                 |
| F       | 152,72              | 258,21                |
| FG      | 72,04               | 118,58                |
| FGT     | -21,94              | -34,92                |

EXAMPLE 4

10

Compositions according to the invention were prepared using the following ingredients mixed in the stated proportions (the amounts given are per final dosage unit):

Lycopene is sensitive to oxidation, mixing of granulate and handling, compressing of  
15 tablets, storage of tablets and packaging in alu-alu-blister cards are all performed under protective nitrogen.

Composition 1 (Tablet code SF)

- 105 mg of cartilage extract (prepared through enzymatic proteolytic hydrolysis of  
20 cartilage, filtration and spray drying of the hydrolysate);
- 100 mg plant extracts (containing ca. 1.5 mg lycopene extracted from tomatoes and ca. 14 mg flavonoids extracted from grape seeds, the remainder being soy fiber, tomato oil and silicon dioxide; Alextan® from Indena, Milano, Italy);
- 30 mg Acerola extract (containing ca. 7.5 mg ascorbic acid, the remainder being Acerola  
25 constituents and maltodextrin);
- 66 mg microcrystalline cellulose
- 4 mg silicon dioxide (particle size 2.4-3.6 µm).

The mixing was performed in a Lödige mixer for 6 minutes. The powder mixture was  
30 compressed into tablets with a weight of 305 mg.

Composition 2 (Tablet code SF-1)

- 105 mg of cartilage extract (prepared through enzymatic proteolytic hydrolysis of cartilage, filtration and spray drying of the hydrolysate);
- 5 - 100 mg plant extracts (containing ca. 1.5 mg lycopene extracted from tomatoes and ca. 14 mg flavonoids extracted from grape seeds, the remainder being soy fiber, tomato oil and silicon dioxide; Alextan® from Indena, Milano, Italy);
- 30 mg Acerola extract (containing ca. 7,5 mg ascorbic acid, the remainder being Acerola constituents and maltodextrin);
- 10 - 81 mg microcrystalline cellulose
- 4 mg silicon dioxide (particle size 2.4-3.6 µm).

The mixing was performed in a Lödige mixer for 6 minutes. The powder mixture was compressed into tablets with a weight of 320 mg.

15

Composition 3 (Tablet code SS)

- 105 mg of cartilage extract (prepared through enzymatic proteolytic hydrolysis of cartilage, filtration and spray drying of the hydrolysate);
- 100 mg plant extracts (containing ca. 1.5 mg lycopene extracted from tomatoes and ca. 14 mg flavonoids extracted from grape seeds, the remainder being soy fiber, tomato oil and silicon dioxide; Alextan® from Indena, Milano, Italy);
- 62 mg inulin
- 30 mg ascorbic acid
- 15 mg zinc gluconate
- 25 - 13 mg silicon dioxide (particle size 2.4-3.6 µm).

The mixing was performed in a Lödige mixer for 6 minutes. The powder mixture was compressed into tablets with a weight of 325 mg.

30 Typical composition

FE: 105 mg

GE: 13.75 mg

TE: 14.38 mg (from this lycopene is 10% = 1.44 mg)

**EXAMPLE 5**

The composition in Example 1 was tested in a consumer test to determine consumers' perception of changes in the skin.

5

129 volunteers entered a three-month study and took two tablets daily containing the composition in Example 1. They recorded their skin appearance and quality before entering the test. After 1, 2, and 3 months of supplementation they evaluated changes in skin appearance and quality according to the following codes: 0 - condition unchanged, 1  
10 - slightly improved, 2 - improved, 3 - much improved.

Figure 4 shows the results of the evaluation of the parameters "overall skin condition", "suppleness", quality of "skin around eyes" and "skin around mouth". Improvements are percentage of volunteers experiencing improvements.

15

**References**

1. Emonard, H. & Grimaud, J.A. Matrix metalloproteinases. A review.  
Cell Mol. Biol. 36, 131-153 (1990).
- 20 2. Fisher, G.J. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N. Engl. J. Med. 337, 419-428 (1997).
3. Fisher, G.J. & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention  
25 by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3, 61-68 (1998).
4. Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J. & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging  
30 in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. Photochem. Photobiol. 69, 154-157 (1999).
5. Hase, T. et al. Histological increase in inflammatory infiltrate in sun-exposed skin of female subjects: the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by  
35 inflammatory infiltrate on collagen degradation. Br. J. Dermatol. 142, 267-273 (2000).

6. Petersen, M.J., Hansen, C. & Craig, S. Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 99, 440-444 (1992).
- 5 7. Scharffetter, K. et al. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* 283, 506-511 (1991).
8. Wlaschek, M., Briviba, K. & Stricklin, P. Singlet Oxygen May Mediate Ultraviolet A-Induced Synthesis of Interstitial Collagenase. *J. Invest Dermatol.* 104, 194-198 (1995).
- 10 9. Fu, M.X., Knecht, K.J., Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes* 41 Suppl 2, 42-48 (1992).
10. Masaki, H., Okano, Y. & Sakurai, H. Generation of active oxygen species from  
15 advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 45-56 (1999).

**CLAIMS**

1. A composition for oral administration comprising plant extract and cartilage extract, wherein the plant extract comprises grape seed extract and tomato extract.
- 5 2. A composition according to claim 2, wherein the plant extract comprises grape seed extract and tomato extract in a weight/weight ratio of about 2:1 to 1:2, preferably about 1:1.
- 10 3. A composition for oral administration comprising plant extract and cartilage extract, wherein the plant extract comprises grape seed extract and lycopene in a weight/weight ratio of about 5:1 to 15:1, preferably about 10:1.
4. A composition according to any one of claims 1 to 3, wherein the cartilage extract and  
15 the plant extract are present in a weight/weight ratio of about 1:2 to 2:1, preferably about 1:1.
5. A composition according to any one of the preceding claims, wherein the cartilage extract comprises glycosaminoglycans selected from the group consisting of a chondroitin ester, a keratan ester, hyaluronic acid or an ester thereof, a dermatan ester, heparin, a  
20 heparan ester, and epimers and polymers thereof, each of which may be optionally bound to a peptide.
- 25 6. A composition according to claim 5, wherein the glycosaminoglycans are selected from the group consisting of chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulphate, and keratan sulphate, each of which may be optionally bound to a peptide.
7. A composition according to any one of the preceding claims, wherein the cartilage  
30 extract comprises chondroitin sulphate, optionally bound to a peptide.
8. A composition according to any one of the preceding claims comprising less than 1% weight/weight collagen, preferably less than 0.5%, particularly preferably less than 0.1%, most preferably being collagen-free.

9. A composition according to any one of the preceding claims 0.1 to 5 % of lycopene weight/weight, preferably 0.2 to 4% lycopene, such as 0.3 to 2% lycopene, most preferably 0.3 to 1% lycopene, particularly 0.3 to 0.8%, such as 0.3 to 0.6% lycopene.
- 5 10. A composition according to any one of claims 1 to 9, wherein said composition increases collagen synthesis by at least 35% as determined by Test Method A.
11. A composition according to any one of claims 1-9 wherein said composition reduces the harmful effects of oxygen free radicals by at least 40% as measured by MMP-1
- 10 activity compared to a control under the conditions of Test method B, such as at least 45%, such as a least 50%.
12. A composition according to any one of claims 1-9, wherein said composition decreases the formation of advanced glycosylation end products (AGE) by at least 10%
- 15 as measured by compared to a control under the conditions of Test Method C, such as at least 20%, such as at least 30%, 40%, 50%, or 60%, preferably least 70%, particularly at least 80, or 90%, most preferably at least 100 or 110%.
13. A composition for oral administration, said composition comprising
- 20 i) cartilage, one or more compounds extractable therefrom, or derivatives thereof,  
ii) one or more hydrophilic antioxidants, and  
iii) one or more lipophilic antioxidants;
- wherein said composition increases collagen synthesis by at least 35% as determined by Test Method A.
- 25 14. A composition according to claim 13 wherein one or more hydrophilic antioxidants is from grape seed extract.
15. A composition according to claim 13 wherein one or more lipophilic antioxidants is
- 30 from tomato extract.
16. A composition according to claim 13, wherein the one or more hydrophilic antioxidants are from natural or synthetic sources.

17. A composition according to claim 16, wherein the natural source is selected from the group consisting of pine bark, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silybum marianum*.

5 18. A composition according to claim 13, wherein the one or more hydrophilic antioxidants is an oligomeric procyanidol.

19. A composition according to any one of claims 13 to 18, wherein the one or more hydrophilic antioxidants are extractable from grape seeds of *Vitis vinifera*.

10

20. A composition according to claim 13, wherein the one or more lipophilic antioxidants are from a natural or synthetic source.

21. A composition according to claim 20, wherein the natural source is a tomato variety.

15

22. A composition according to claim 20, wherein tomato extract is the sole source of the lipophilic antioxidant.

23. A composition according to claim 21, wherein the tomato variety is *Lycopersicum*

20 *aesculentum*.

24. A composition according to any one of claims 13 to 23, wherein the lipophilic antioxidant comprises a carotenoid selected from the group consisting of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene,  $\delta$ -carotene, lycopene ( $\psi, \psi$ -carotene), zeaxanthin, cryptoxanthine,

25 luteine, and xanthophyll.

25. A composition according to any one of claims 13 to 24, wherein one of the one or more lipophilic antioxidants is lycopene.

30 26. A composition according to any one of claims 13 to 25 comprising 0.1 to 5 % of lycopene weight/weight, preferably 0.2 to 4% lycopene, such as 0.3 to 2% lycopene, most preferably 0.3 to 1% lycopene, particularly 0.3 to 0.8%, such as 0.3 to 0.6% lycopene.

27. A composition according to claim 20, wherein the natural source of one or more  
35 lipophilic antioxidants comprises about

- 5-12% of lycopene;  
1-1.5% of tocopherols;  
0.05-0.25% of beta-carotene;  
0.5-0.75% of phytoene; and  
5 0.5-0.55% of phytofluene.

28. A composition according to any of the preceding claims comprising less than 0.025 % beta-carotene, preferably less than 0.02% beta-carotene, particularly less than 0.01% beta-carotene.

10

29. A composition according to any one of claims 13 to 28, wherein the increase in collagen synthesis is at least 40%, at least 45%, such as at least 50%, at least 55%, preferably at least 60%, such as at least 65%, at least 70%, most preferably at least 75% or at least 80%.

15

30. A composition according to any one of claims 13 to 29, wherein the composition reduces the harmful effects of oxygen free radicals by at least 40% as measured by MMP-1 activity compared to a control under the conditions of Test Method B, such as at least 45%, such as at least 50%.

20

31. A composition according to claim 30, wherein the harmful effects are due to UV exposure.

32. A composition according to any one of claims 13 to 31, wherein said composition  
25 decreases the formation of advanced glycosylation end products (AGE) by at least 10% as measured by compared to a control under the conditions of Test Method C, such as at least 20%, such as at least 30%, 40%, 50%, or 60%, preferably least 70%, particularly at least 80, or 90%, most preferably at least 100 or 110%.

30 33. A composition according to any one of claims 13 to 32, wherein the hydrophilic and the lipophilic antioxidants are present in a wt/wt ratio in the range from about 1:1 to about 200:1, such as from 2:1 to 100:1, in particular from 5:1 to 50:1, especially from 5:1 to 20:1, preferably from 5:1 to 15:1, most preferably about 7:1 to 12:1, such as about 10:1.

34. A composition according to any one of claims 13 to 33, wherein the cartilage, one or more compounds extractable thereof and the hydrophilic antioxidants are present in a wt/wt ratio in the range from about 1:1 to about 200:1, such as from 2:1 to 100:1, in particular from 5:1 to 50:1, especially from 5:1 to 20:1, preferably from 5:1 to 15:1, most preferably about 7:1 to 12:1, such as about 10:1.

35. A composition according to any one of claims 13 to 34 comprising 0.25-15 mg of lycopene and 2.5-100 mg of grape seed extract, preferably from 0.5-5 mg of lycopene and 5-50 mg of grape seed extract, particularly 0.75-2.5 mg of lycopene and 10-30 mg of grape seed extract, particularly 1-2.5 mg of lycopene and 10-25 mg of grape seed extract.

36. A composition according to any one of claims 13 to 35, comprising 1-2.5 mg of lycopene, 5-50 mg of grape seed extract and 50-200 mg of cartilage extract.

37. A composition according to any one of claims 1-36, comprising  
20-40% cartilage extract, such as 25-35%, preferably 27-35%, such as 30-35% cartilage extract, weight/weight;  
1-10% grape seed extract, such as 2-8%, preferably 3-7%, such as 3-5% grape seed extract weight/weight; and  
1-10% tomato extract, such as 2-8%, preferably 3-7%, such as 3-5% tomato extract, weight/weight.

38. A composition according to any one of claim 1-37, further comprising *Acerola* extract.

39. A composition according to any one of the preceding claims comprising  
100-110 mg of fish extract  
95-105 mg of plant extracts  
25-35.00 mg of *Acerola* extract  
60-90 mg of microcrystalline cellulose  
3.5-4.5 mg of silicon dioxide  
wherein the plant extracts comprise an oligomeric procyanidol and lycopene and the fish extracts comprise a glycosaminoglycan.

40. A composition according to any one of claims 1-38 comprising  
100-110 mg of fish extract

95-105 mg of plant extracts

60-65 mg of inulin

25-35.00 mg of ascorbic acid

10-20 mg of zinc gluconate.

5 10-15 mg of silicon dioxide

wherein the plant extracts comprise an oligomeric procyanidol and lycopene and the fish extracts comprise a glycosaminoglycan.

41. A composition according any one of the preceding claims, wherein the grape seed  
10 extract is formulated for slow release and the lycopene is formulated for normal release.

42. A composition according to any one of the preceding claims for use as an oral cosmetic product, a food or food supplement, a pharmaceutical or a dietetic.

15 43. A composition according to any one of the preceding claims suitable for the general maintenance of healthy skin, to prolong the onset of the degeneration of skin due to ageing or UV exposure, and for the treatment of the signs of ageing in skin.

44. A composition according to any of the preceding claims for use in treating ageing skin,  
20 skin exposed to sunlight or other forms of UV radiation, dry skin, rough skin, discoloured skin, skin with acne, scared skin, skin with stretch marks, eczema and psoriasis.

45. A composition according to any of the preceding claims, wherein the composition is administered in the form of a solid dosage form such as tablets, powders, granules,  
25 granulates, capsules, sachets or in a form of a liquid dosage form such as solutions, suspensions, tonics or syrups.

46 A method for the cosmetic or prophylactic treatment of ageing skin, skin exposed to sunlight or other forms of UV radiation, dry skin, rough skin, discoloured skin, skin with  
30 acne, scared skin, skin with stretch marks, eczema and psoriasis, comprising the oral administration of a composition defined in any of claims 1 to 41.

47. A method for the cosmetic or prophylactic treatment of skin against the signs of skin ageing, and damage resulting from exposure to UV radiation comprising the oral  
35 administration of a composition defined in any of claims 1 to 41.

48. A method of increasing collagen synthesis or lessening the decrease in collagen synthesis in the dermis comprising the oral administration of a composition defined in any of claims 1 to 41.

5

49. Use of a composition defined in any one of claims 1-41 for the preparation of an agent for the preventing or slowing the signs of skin ageing, preventing or lessening the harmful effects of UV radiation exposure, for treating stretch marks, for treating acne, for lessening the symptoms of eczema, for assisting in scar formation, for reducing scarring, for  
10 lessening the symptoms of psoriasis, or for treating rough, discoloured or dry skin.

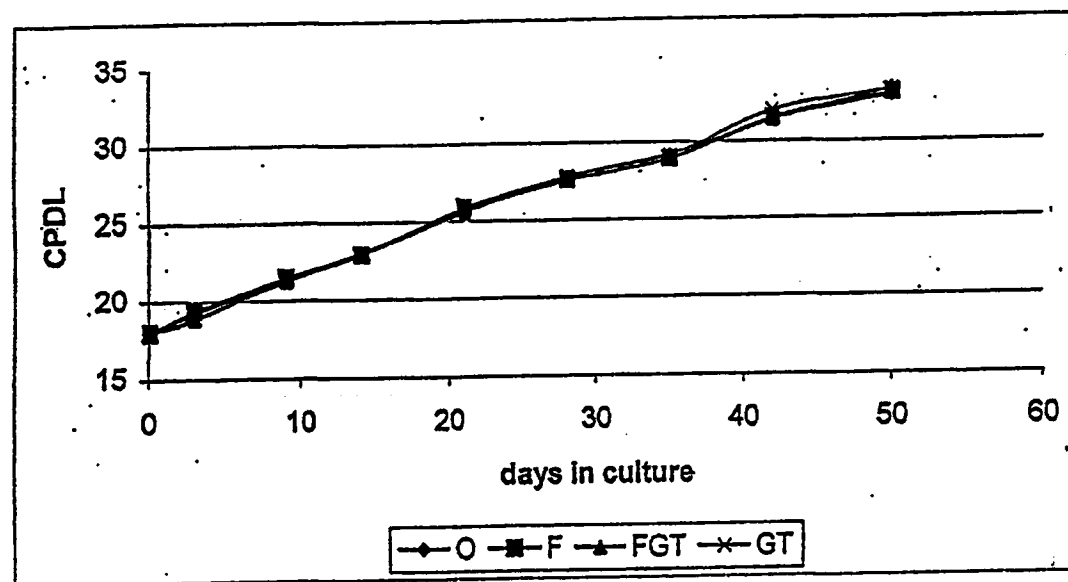
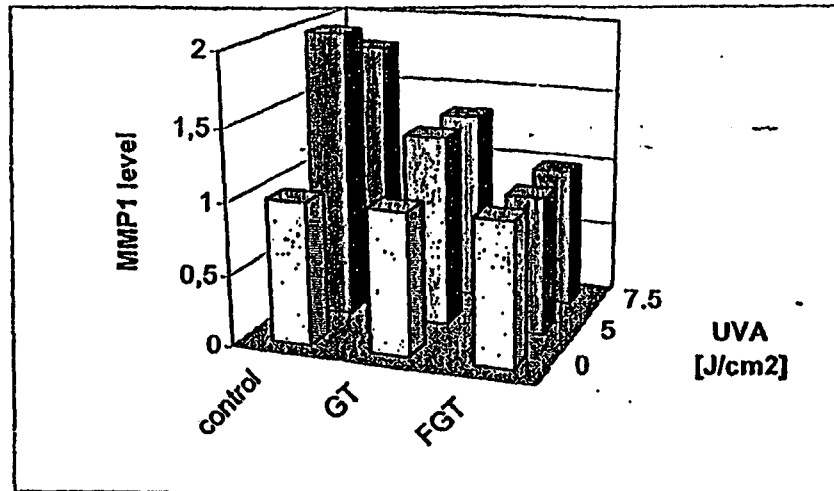


Fig. 1.

1/4

2/4

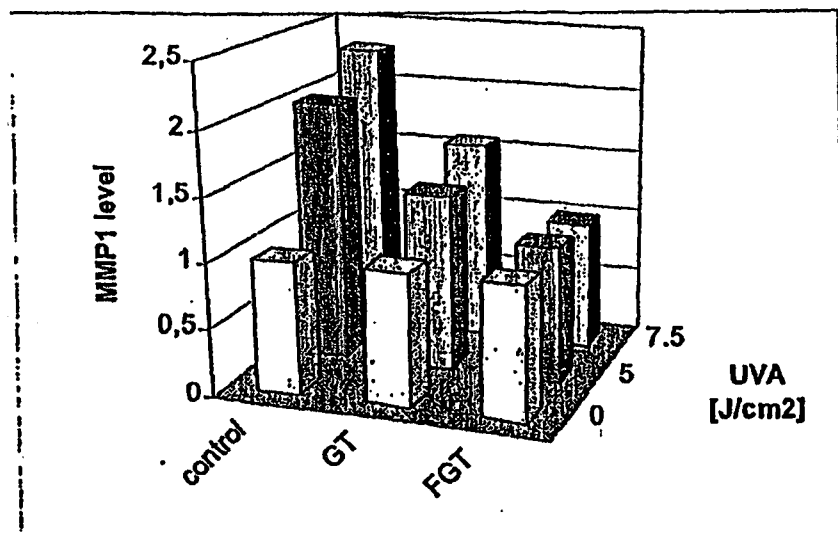
MMP1 levels



Day1

Fig. 2a

MMP1 levels



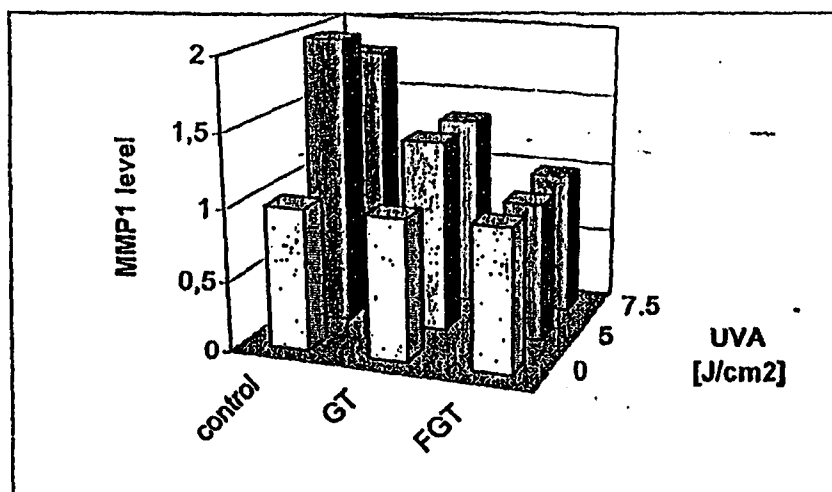
Day 4

Fig. 2b

106

2/4

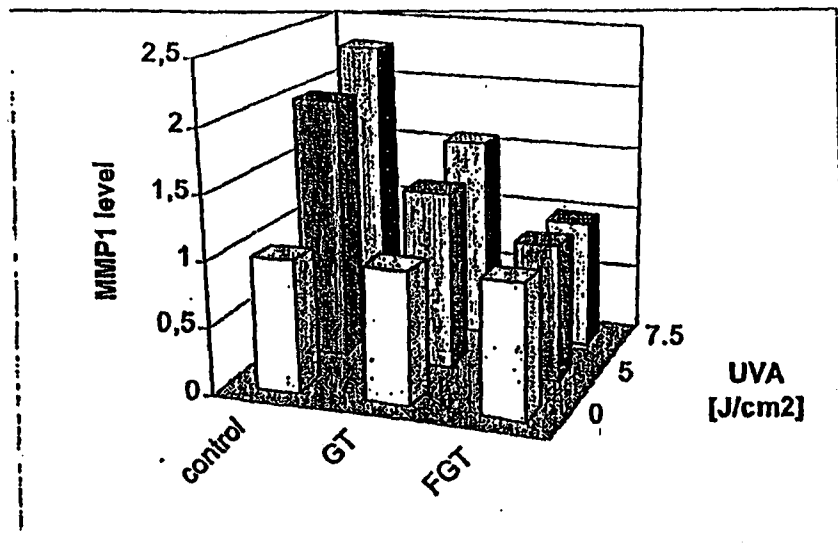
MMP1 levels



Day1

Fig. 2a

MMP1 levels



Day 4

Fig. 2b

3/4

AGE concentration - day 1

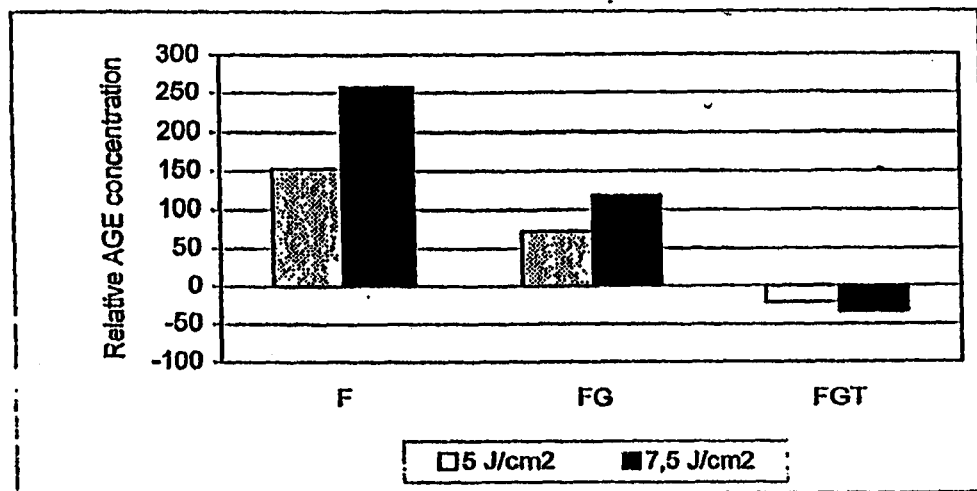


Fig. 3

100

4/4

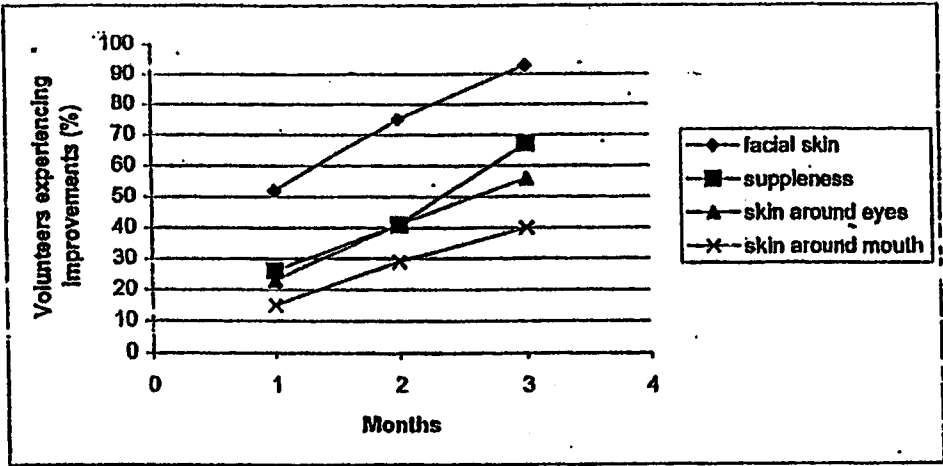


Fig. 4

## COMPOSICIONES DE COMBINACIONES MARINAS Y EXTRACTOS DE PLANTAS CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención concierne a composiciones de uso oral, dichas composiciones contienen cartílago o compuestos extraíbles del cartílago, así como antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los radicales libres se forman en el cuerpo, e.g. en la piel, como el resultado de radiación UV, contaminación, alcohol, etc. El exceso de radicales libres puede causar daños severos en la estructura de los tejidos, incluyendo la estructura de la piel, y así mismo los signos de envejecimiento empiezan a aparecer.

Así ha surgido el uso de antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos en combinación, para disminuir la tensión oxidativa causada por los radicales libres en la piel (Maffei Facino et al. ("Free Radical Scavenging and Anti-enzyme Activities of Procyanidines from *Vitis Vinifera*" *Arzeneim.-Forsch./Drug Res.*, 44(1), Nr 5 )1994), pp 592-601).

US 5,648,277 divulga formulaciones orales que comprenden ambos antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

JP 09 241637 divulga composiciones que comprenden una depuración activa de radicales libres y ácidos urónicos o mucopolisacáridos .

Esta establecido también que la administración de complejos de proteínas que contienen mucopolisacaridos derivados de fuentes de cartílago marinas tiene la habilidad de mejorar la textura de la dermis de la piel, haciéndola mas densa y firme (Kieffer ME, Efsen J., J. Eur.Acad. Dermatol. Venéreol, 1998 Sep; 11 (2):129 – 136).

### RESUMEN DE LA INVENCION

Los presentes investigadores han encontrado que una combinación única de extracto de cartílago, con una mezcla especial de extractos de plantas, produce una composición

sorprendentemente efectiva para incrementar la síntesis de colágeno en la piel, así como también una notable reducción de la oxidación mediada por radicales libres, en la dermis. La disminución en la síntesis de colágeno y la oxidación por radicales libres están ambas asociadas con los procesos de envejecimiento de la piel.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición para administración oral que comprende extractos de plantas y extracto de cartílago, en la cual el extracto de plantas está compuesto por extracto de semillas de uva y extracto de tomate.

La invención puede ser definida alternativamente como una composición para administración oral, que comprende extracto de plantas y extracto de cartílago, donde el extracto de plantas, contiene extracto de semillas de uva y licopeno, en una relación peso/peso de cerca de 5:1 a 15:1, preferiblemente cerca de 10:1.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición para administración oral, dicha composición contiene:

- i) cartílago, uno o más compuestos extraíbles de él, o derivados del mismo
- ii) uno o más antioxidantes hidrofílicos, y
- iii) uno o más antioxidantes lipofílicos

Dicha composición incrementa la síntesis de colágeno, en al menos un 35% en una célula modelo.

Una composición como la definida aquí, para el mantenimiento de una piel saludable, para retrasar el comienzo de la degradación de la piel debida al envejecimiento o a la exposición a rayos UV, y para el tratamiento de las señales producidas por los procesos de envejecimiento, es aún otro aspecto de la invención

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, el término hidrofílico como es aplicado a los antioxidantes hidrofílicos, generalmente significa que el antioxidante es suficientemente soluble en, y por lo tanto capaz de funcionar en los medios acuosos del cuerpo. En el

presente contexto, se considera que un antioxidante es hidrofílico, si tiene una solubilidad en agua por encima de 0.05 g por 100g de agua. Un antioxidante hidrofílico tiene preferiblemente una solubilidad en agua por encima de 0.5 g, más preferiblemente por encima de 1 g, particularmente por encima de 5 g, más particularmente por encima de 10 g, más particularmente por encima de 25 g, especialmente por encima de 50 g, tal como 100 g por 100 g de agua.

De manera similar el término lipofílico, como es aplicado a los antioxidantes lipofílicos, generalmente significa que son suficientemente solubles y capaces de actuar en los medios lipídicos del cuerpo, esto también significa que tienen una muy baja solubilidad en agua. En el presente contexto un antioxidante es considerado lipofílico, si tiene una solubilidad en agua, por debajo de 0.005 g por 100 g de agua. Un antioxidante lipofílico, tiene preferiblemente una solubilidad en agua por debajo de 0.005 g, en particular por debajo de 0.0005 g por 100 g de agua.

El término "extracto de cartílago", pretende incluir como cartílago, componentes que pueden ser extraídos de él y derivados de él, incluyendo formas sintéticos de compuestos extraíbles de cartílago y derivados preparados sintéticamente. Los compuestos denominados "extracto de cartílago", pueden también ser encontrados en otros tejidos que contienen tejido conectivo, e.g la piel o pellejo y pueden ser extraídos de ellos. El cartílago, puede ser seleccionado del grupo de animales marinos cartilaginosos, peces cartilaginosos, moluscos cartilaginosos, mamíferos terrestres cartilaginosos. Los animales marinos pueden ser seleccionados del grupo de ballenas, delfines y focas; los peces pueden ser seleccionados del grupo de los tiburones, salmones, atunes, bacalao y otros peces conocidos: los moluscos pueden ser calamares y los mamíferos terrestres, pueden ser seleccionados del grupo de bovinos, porcinos, aves como pollos, patos y pavos.

El cartílago o sus extractos son preferiblemente seleccionados del cartílago de bovinos, del cartílago de porcinos, del cartílago de tiburón, del cartílago de calamar, del cartílago de pollo y del cartílago el salmón.

El cartílago puede ser utilizado por sí solo. Típicamente es utilizado en su forma seca, e.g. cartílago triturado, liofilizado. Los extractos útiles de los tipos de cartílago y de los otros tejidos antes mencionados, contienen los componentes apropiados, que pueden ser

46  
112

preparados por medio de una hidrólisis enzimática proteolítica parcial, del tejido "cocido" seguido de una filtración y un secado del hidrolizado, e.g. a través de un secador por aspersión o por liofilización. Tales extractos tienen la ventaja de ser parcial o totalmente solubles en medios acuosos. (preparado de acuerdo con US. 3,862,003).

El extracto de cartílago contiene típicamente de uno o más compuestos extraíbles de cartílago, y preferiblemente comprende glicosaminoglicanos, opcionalmente unidos a un péptido. El extracto de cartílago preferiblemente contiene sulfato de condroitina, sulfato de queratano, ácido hialurónico, o sulfato de dermatano o mezclas de los mismos. El término "extracto de cartílago" pretende incluir compuestos obtenibles del cartílago, pero realmente estos compuestos pueden ser obtenidos de otras fuentes. Una fuente particularmente preferida de cartílago, es el cartílago de tiburón.

El término "extracto de cartílago" se puede relacionar con componentes extraídos del cartílago o derivados de él. Como se estableció, el extracto de cartílago puede venir de otras fuentes naturales pero puede también venir de una fuente sintética, i.e. la cual puede ser preparada sintética o semi-sintéticamente. Preferiblemente, el extracto de cartílago es extraído de fuentes naturales, más preferiblemente el extracto es extraíble del cartílago, particularmente preferiblemente el extracto es extraído de cartílago.

Como se estableció, la invención refiere en un primer aspecto, una composición para administración oral que comprende extracto de plantas y extracto de cartílago, en la cual el extracto de plantas contiene extracto de semillas de uva y extracto de tomate en una proporción peso/peso de cerca de 2:1 a 1:2, preferiblemente cerca de 1:1. Los presentes investigadores han encontrado que una combinación única de extracto de cartílago con una mezcla especial de extracto de plantas produce una composición sorprendentemente efectiva, en el incremento de la síntesis de colágeno en la piel, al igual que reduce a un notable nivel la radiación UV y el estrés oxidativo, tal como la oxidación por radicales, relacionada con procesos de degeneración en la dermis.

Los efectos benéficos de la combinación de extracto de semillas de uva y extracto de tomate como antioxidantes fueron inesperada y dramáticamente mejorados, con la adición de extracto de cartílago. Los resultados fueron sorprendentemente en parte pues el extracto de cartílago no tiene actividad antioxidante por si mismo.

Típicamente, los extractos de cartílago y de plantas están presentes en una proporción peso/ peso de cerca de 1:2 a 2:1, preferiblemente cerca de 1:1.

El extracto de cartílago preferiblemente comprende glicosaminoglicanos seleccionados del grupo consistente de un éster de condroitina, un éster de queratano, ácido hialurónico o un éster del mismo, un éster de dermatano, heparina, un éster de heparán. Todos éstos unidos a un péptido o una proteína, o como las formas de polímeros o epímeros de un éster de condroitina, un éster de queratano, ácido hialurónico o un éster del mismo, un éster de dermatano, heparina, un éster de heparán, preferiblemente sulfato de condroitina, sulfato de queratano, ácido hialurónico o un éster del mismo, o sulfato de dermatano, una heparina, un sulfato de heparán.

Los glicosaminoglicanos pueden ser seleccionados del grupo que contienen condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, y queratano-sulfato, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente unido a un péptido. Mas preferiblemente la composición de la presente invención comprende extracto de cartílago, que contiene sulfato de condroitina, opcionalmente unido a un péptido.

Una formulación típica de la presente invención es aquella en la cual el extracto de cartílago contiene entre el 5 y el 100% peso/peso de sulfato de condroitina.

En una formulación preferencial, la composición de la presente invención contiene menos del 1% peso/peso de colágeno, preferiblemente menos del 0.5 % y particularmente preferible menos que el 0.1% de proteína de colágeno. En la forma típica en que se prepara el extracto de cartílago, no contiene cantidades apreciables de colágeno. El extracto se prepara preferiblemente por hidrólisis enzimática proteolítica, de tal forma que las proteínas de colágeno, son degradadas a péptidos. La composición que contiene el nivel de colágeno más bajo muestra efectos benéficos inesperados. En consecuencia es preferible no agregar a la composición de la presente invención el colágeno o una fuente del mismo, se prefiere una formulación que esté esencialmente libre de colágeno.

De manera similar una composición típica de la presente invención, contiene menos del 0.025 % de  $\beta$ -caroteno, preferiblemente menos que 0.02% de  $\beta$ -caroteno, particularmente

48  
14

menos que 0.01% de  $\beta$ -caroteno. Por lo tanto otro aspecto de la invención se refiere a una composición que alcance los efectos benéficos descritos por *infra*, es aquella que tiene muy pequeñas cantidades o esencialmente sin  $\beta$ -caroteno.

Inversamente el entendimiento actual que el contenido de licopeno, relativa, o absolutamente es particularmente importante en los efectos benéficos inesperados de la composición de la presente invención. Los extractos de plantas, particularmente el extracto de tomate, contiene licopeno. Preferiblemente el extracto de tomate contiene cerca de 5 a 12%, típica y aproximadamente el 10% de licopeno peso/peso. El extracto de tomate puede ser de un sólo tomate o de la mezcla de tomates.

En una formulación típica la variedad de tomate que se usa para elaborar el extracto es, *lycopersicum aesculentum*, por eso es conveniente suministrar niveles absolutos y relativos de licopeno.

En una formulación preferida de la presente invención la composición es de 0.1 a 5% de licopeno peso/peso, preferiblemente del 0.2-4% de licopeno, tal como 0.3-2% de licopeno, más preferiblemente de 0.3-1% de licopeno, y particularmente de 0.3-0.8% de licopeno, tal como 0.3-0.6% de licopeno.

En una definición alternativa de la composición de la presente invención, la composición contiene extracto de plantas y extracto de cartílago, en la cual el extracto de plantas esta comprendido por semillas de uva y licopeno, en una relación peso/peso de cerca de 5:1 a 15:1, preferiblemente cerca de 10:1. Como se estableció el licopeno en dicha relación esta de acuerdo con el estado actual de la invención y tiene una importancia significativa para alcanzar lo efectos benéficos antioxidantes.

En una formulación conveniente, la actividad antioxidante  $IC_{50}$  del antioxidante lipofílico es más baja que  $1.2 \times 10^{-7}$ , para la depuración de radicales  $R/ROO\cdot$ , en la peroxidación lipídica de un fosfolípido insaturado en medio acuoso. Típicamente el antioxidante lipofílico que muestra una actividad antioxidante  $IC_{50}$  a lo sumo de  $1.2 \times 10^{-7}$ , para depuración de radicales  $R/ROO\cdot$ , en la peroxidación lipídica de un fosfolípido insaturado en medio acuoso es el compuesto carotenoide licopeno ( también denominado  $\Psi$ - $\Psi$  caroteno). El licopeno puede ser obtenido típicamente por extracción desde ciertas frutas frescas, tales como

tomate, patilla, uvas rojas, guayaba de la manera conocida *per se*, o puede ser preparado sintéticamente de la manera conocida.

Los efectos benéficos de la composición oral de la presente invención son el resultado de una novedosa combinación de tres componentes: extracto de cartílago, extracto de semillas de uva y extracto de tomate. El extracto de semilla de uva proporciona antioxidantes hidrofílicos, el extracto de tomate proporciona antioxidantes lipofílicos. La invención entonces relaciona una novedosa combinación de antioxidantes con compuestos extraídos del cartílago.

Otro aspecto de la presente invención, relaciona una composición para administración oral. Dicha composición comprende

- i) cartílago, uno o más compuestos extraíbles o derivados del mismo
- ii) Uno o más antioxidantes hidrofílicos, y
- iii) Uno o más antioxidantes lipofílicos

Dicha composición incrementa la síntesis de colágeno al menos en un 35 %, como se determinó por el test del método A.

La síntesis de colágeno se disminuye notablemente en células de piel vieja. La disminución del colágeno en la piel produce cambios en la textura y las propiedades reológicas de la piel y los típicos signos del envejecimiento como las arrugas, disminución de la suavidad y pérdida de elasticidad y firmeza.

Como se muestra en el ejemplo 2, la composición de la presente invención produjo un sorprendente y dramático incremento en la síntesis de colágeno, en comparación con otras combinaciones y componentes individuales. La síntesis de colágeno fue evaluada midiendo la incorporación de prolina radiactiva ( $[^{14}\text{C}]$  – prolina) dentro de proteínas que contienen prolina las cuales en su mayoría se considera que son colágeno, en donde 30% del total de aminoácidos es prolina.

Fibroblastos de la dermis de la piel cultivados en un medio conteniendo una combinación de extracto de semillas de uva (G), extracto de tomate (T), GT ( como la divulgada en US5, 648, 277), muestran una disminución del grado de incorporación de prolina comparada con el control: 3.6 % de incorporación comparado con 4.8 % en el control, un 25 % de disminución.

Cultivos de células que conteniendo una combinación de extracto de pescado (F) y extracto de tomate (T) no tuvieron una influencia significativa en la incorporación de prolina, como se aprecia en los resultados con un 5 % de incorporación, comparado con 4.8% de incorporación en el control. Con un incremento de sólo el 4 %. Cultivos de células que contienen una combinación de pescado(F), extracto de uva (G), FG producen un pequeño incremento en el grado de incorporación de prolina: 5.5 % de incorporación equivalente a un 10% de incremento comparado con el control. Cultivos de células que contenían sólo extracto de pescado (F) producen un incremento en el grado de incorporación de prolina, de 6.2% de incorporación, un 29 % de incremento.

Células cultivadas con una composición de acuerdo con la presente invención que comprende extracto de pescado (F), extracto de semillas de uva (G), y extracto de tomate (T), FGT, producen sorprendentemente un dramático incremento del 80 % en la incorporación de prolina : ( 8.4 % de prolina incorporada) . Dado que el extracto de GT produce 25 % de disminución en la síntesis de colágeno y el extracto F produce un 29 % de incremento en la síntesis de colágeno, un 80% de incremento al usar F con GT es sorprendente.

Uno o más de los antioxidantes hidrofílicos de las composiciones de la presente invención pueden ser de fuentes naturales o sintéticas, preferiblemente de fuentes naturales. En una formulación típica la fuente natural es seleccionada del grupo que consiste de corteza de pino *Vitis Vinifera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silybum marianum*..

En una adecuada formulación uno o más antioxidantes hidrofílicos son extraíbles de las semillas de uva del *Vitis Vinifera*.

La fuente natural de uno o mas antioxidantes hidrofílicos contiene típicamente hasta el 25 % peso/peso de catequina, epicatequina y ácido gálico; hasta 90% p/p de dímeros, trímeros y/o tetrámeros de epicatequina y/o galatos del mismo; y hasta 10% p/p de pentámero, hexámero y /o heptámero de epicatequina y/o galatos de los mismos.

Uno o mas antioxidantes hidrofílicos pueden ser seleccionados del grupo que consiste en polifenoles o ésteres del mismo; ácido ascórbico ( vitamina C) y ésteres del mismo; y sales farmacéuticamente aceptadas de los mismos. Los polifenoles son típicamente catequinas;

leucoantocianidinas y flavononas; flavaninas, flavones y antocianinas; flavonoles, flavonolignanos y oligómeros de los mismos.

En una formulación preferible los antioxidantes hidrofílicos son la catequina seleccionada del grupo que consiste en proantocianina A2 y procianidol oligomérico (OPC), mas preferiblemente un procianidol oligomérico.

Los flavonolignanos típicos son la silimarina o uno de los componentes de la misma tal como silibina, silidianina, silieristina e isosilibina.

En la composición de la invención, el antioxidante hidrofílico es típicamente uno que presenta una actividad antioxidante  $IC_{50}$  a lo sumo de  $5 \times 10^{-7}$ , para depuración de radicales  $R/ROO^{\cdot}$ , en la peroxidación lipídica de un fosfolípido insaturado en medio acuoso.

Como se estableció, el antioxidante hidrofílico preferido particularmente es un extracto de semillas de uva p. ej semillas de *Vitis Vinifera*, dicho extracto ha sido típicamente obtenido por extracción de semillas de uva usando solventes orgánicos como acetona y/o acetato de etilo o similares, evaporando los solventes, re-disolviendo el residuo en agua, filtrando e.g, secando por aspersión ó liofilizando. En una formulación particularmente preferida, el extracto típico contiene hasta del 25% peso/peso de catequina, epicatequina y ácido gálico; hasta del 90% peso/peso, de dímero, trímero y/o tetrámeros de epicatequina y/o galatos del los mismos, y hasta 10% peso/peso, de pentámero, hexámero y/o heptámero de epicatequina, y/o galatos de los mismos.

Los uno o más antioxidantes lipofílicos pueden ser de fuentes naturales o fuentes sintéticas, típicamente de una fuente natural. El antioxidante lipofílico puede ser una mezcla de antioxidantes tales como un extracto de fuente natural comprendiendo una mezcla compleja de antioxidantes lipofílicos, fuente natural conveniente de antioxidantes lipofílicos es la variedad de tomate *lycopersicum aesculentum*.

Los uno o más antioxidantes lipofílicos son típicamente carotenoides, pro-carotenoides, tocoferoles, fitoesteroles, y ubiquinonas. Los carotenoides son particularmente antioxidantes lipofílicos interesantes, y pueden ser seleccionados del grupo consistente de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -

caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno, licopeno ( $\Psi, \Psi$ -caroteno), zeaxantinas, criptoxantina, luteína y xantofilas.

Como se estableció el licopeno carotenoide es un antioxidante lipofílico especialmente interesante. La composición de la presente invención contiene más preferiblemente licopeno. Los extractos que sirven como fuentes de antioxidantes lipofílicos comprenden preferiblemente entre el 5-12% de licopeno, tal como el 7-12% de licopeno, preferiblemente aproximado al 10% de licopeno, este puede ser típicamente traducido a una composición de la presente invención que contiene entre el 0.1-5% de licopeno peso/peso, preferiblemente 0.2 a 4% de licopeno, tal como 0.3 a 2% de licopeno, más preferiblemente 0.3 a 1% de licopeno, particularmente 0.3-0.8%, tal como 0.3-0.6% de licopeno peso/peso.

Una fuente natural de antioxidantes lipofílicos, normalmente contiene:

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 5-12%      | licopeno          |
| 1-1.5%     | Tocoferoles       |
| 0.05-0.15% | $\beta$ -caroteno |
| 0.5-0.75%  | fitoenos          |
| 0.5-0.55%  | fitofluenos       |

Más preferiblemente contiene:

|              |                   |
|--------------|-------------------|
| 7 - 12%      | licopeno          |
| 1 - 1.5%     | tocoferoles       |
| 0.05 - 0.15% | $\beta$ -caroteno |
| 0.5 - 0.75%  | fitoenos          |
| 0.5 - 0.55%  | fitofluenos       |

La fuente de uno o más antioxidantes lipofílicos, preferiblemente, contiene menos de 1% de  $\beta$ -caroteno, tal como menos que 0.75 %, o tal como menos que 0.5%, preferiblemente menos que 0.25%, más preferiblemente menos que 0.2%, y particularmente menos que 0.15%. De manera similar una composición típica de la presente invención, contiene menos de 0.025% de  $\beta$ -caroteno, preferiblemente menos que 0.2% y particularmente menos que 0.01%.

Otro aspecto de la invención está relacionado con la composición que puede alcanzar los efectos benéficos como los describe *infra* con muy pequeñas cantidades de  $\beta$ -caroteno o esencialmente sin  $\beta$ -caroteno.

En una formulación típica, la única fuente del antioxidante lipofílico es proporcionada por el extracto de tomate. Alternativamente, el antioxidante lipofílico es el extracto del tomate.

En una formulación típica de la invención, la composición comprende 20-40 % extracto de cartilago, tal como 25-35%, preferible 27-35% como 30-35% de extracto de cartilago, peso /peso;

1-10% de extracto de semillas de uva peso /peso; y tal como 2-8%, preferiblemente 3-7% como 3-5% de extracto de semillas de uva, peso /peso.

1-10% de extracto de tomate, tal como 2-8%, preferiblemente 3-7% como 3-5% de extracto de tomate, peso /peso.

Una composición típica de la presente invención, contiene extracto de pescado (F), extracto de semillas de uva (G) y extracto de tomate (T) en una relación en peso de cerca de 5:1:1 a 15:1:1, tal como cerca de 10:1:1.

Como se estableció la composición de la presente invención es capaz de aumentar la síntesis de colágeno por lo menos en un 35% como se determinó por el test del método A. Preferiblemente sin embargo el uso de la composición bajo las condiciones del método A, resulta en un incremento en la síntesis de colágeno de por lo menos 40%, como al menos 45%, como al menos 50%, al menos 55%, preferiblemente al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%.

Así otro aspecto de la invención se refiere a un método de incremento en la síntesis de colágeno o a aminorar la disminución en la síntesis de colágeno en la dermis y comprende la administración oral de una composición como la definida aquí.

Los presentes investigadores han encontrado que no solo hace novedosa la composición de la presente invención el resultado del incremento en la síntesis de colágeno, sino que también tiene otros indicadores de su utilidad en el tratamiento del envejecimiento de la piel,

exposición a la radiación UV. De acuerdo con una formulación adecuada, la composición reduce los efectos dañinos de los radicales libres al menos en un 40 % medidos por la actividad de la MMP – 1 comparada con un control bajo las condiciones de test del método B, tal como al menos en un 45 % tal como al menos en un 50 %. Los radicales libres de oxígeno y el efecto dañino de ellos son normalmente debidos a la exposición a la radiación UV, pero también pueden ser ocasionados por otros factores ambientales, fisiológicos o genéticos.

La sobreproducción de MMPs inducida por la exposición a la radiación UV es considerada una de las principales causas del fotoenvejecimiento. La radiación UV activa las células de la dermis para la sobreproducción de MMPs, las cuales son enzimas que degradan el colágeno y otras proteínas que componen la matriz extracelular de la dermis. La degradación de la dermis (pérdida de las funciones), es seguida por la reparación que es imperfecta: la reparación imperfecta produce un déficit en la integridad estructural de la dermis y se repite con cada exposición intermitente a la radiación UV, conduciendo a la acumulación de cicatrización dérmica y finalmente a las señales visibles del fotoenvejecimiento (2-5). El efecto de la luz UV sobre la inducción de las MMPs fue confirmado también *in vitro* en cultivos de fibroblastos (6,7). Otros estudios enfocados al mecanismo de la inducción de las MMPs por la radiación UV, sugieren que la radiación UV induce un oxígeno singlete (especies reactivas del oxígeno) que tienen un efecto directo en las células que da como resultado la producción de MMPs (8). Por lo tanto los antioxidantes y específicamente aquellos que depuran los oxígeno singlete contrarestan la síntesis de MMP estimulada por luz UV. Sin embargo, no se puede excluir el hecho que también otras especies de radicales libres están involucrados en la estimulación de la síntesis de MMPs. Células viejas en cultivos, así como también células de piel expuestas al sol o a radiación UV, producen grandes cantidades de MMPs. La reducción en la actividad de la MMP – 1, como resultado de el uso de la composición de la presente invención, es por lo tanto un indicador de su utilidad en el mantenimiento de una piel saludable.

Además la composición de la presente invención disminuye la formación de los productos finales de la glicosilación (AGE) al menos en un 10 % como se midió bajo las condiciones de test del método C, en comparación con un control, tal como por lo menos 20%, al menos 30%, 40%, 50% o 60%, preferiblemente al menos 70%, particularmente al menos 80 % o 90%, mas preferiblemente 100% o 110 %.

Los AGE (productos finales de la glicosilación prematura, también conocidos como producto *Amadori*) son el resultado de la glicación ( glico-oxidación) una reacción de unión no específica entre proteínas y carbohidratos . El acumulado de AGE tanto en las células individuales como en la matriz extracelular de tejidos consta de proteínas de larga vida tal como el colágeno en la piel. Las proteínas unidas a los AGE son proteínas no funcionales y tienden a agregarse en la matriz extracelular o en el citoplasma de las células y se cree tienen un efecto nocivo sobre las síntesis de todas las proteínas. Inicialmente en una etapa temprana el producto *Amadori* se forman cuando la glucosa reacciona con las proteínas , luego sufren reordenamientos para formar en una etapa tardía los pigmentos café que pueden entrecruzarse con las proteínas. Después del reordenamiento, los productos de la etapa tardía continúan acumulándose en proteínas de larga vida, tal como colágeno, en largos períodos de tiempo con altos entrecruzamientos de proteínas. La formación de los AGE *in vivo* se ha visto aumentada en organismos con envejecimiento celular tanto en vivo como *in vitro* . *In vivo*, la acumulación de AGEs se piensa que se refleja en los niveles de glucosa del suero. Un papel crítico en la formación de los AGEs en la etapa tardía de es atribuida a la oxidación, subsecuentemente la glicación en si misma es un proceso reversible. La oxidación, sin embargo, es responsable por el permanente daño químico y la pérdida de funcionalidad de las proteínas debido a la permanente formación de enlaces entrecruzados (9) . Aparte de no ser eficientes y teniendo un efecto en la disminución de la síntesis de todas las proteínas, los AGEs mostraron ser cromóforos después de ser irradiados con luz UV, generando cantidades significativas de radicales oxígeno activos (10). El estrés oxidativo, contribuye así a la formación de AGEs.

En una dosis de exposición a la radiación ultravioleta (  $5 \text{ j/cm}^2$ ), el nivel de AGE en células control no suplementadas , aumentó aproximadamente 20 veces comparada con células control no irradiadas. Bajo las mismas condiciones el nivel de AGE en cultivos suplementados con F, se aumento aproximadamente 40 veces más , indicando que F no tiene efecto protector sobre la formación de AGEs por irradiación UV. El incremento en los niveles de AGE en células tratadas con F, fueron en un más dramático  $7.5 \text{ j/cm}^2$ . En la figura 3 aparece que el nivele de AGEIs, en células suplementadas con FG aumentó 72 unidades lo cual está en el mismo que las células de control no tratadas s (un 10% menos en relación con el control).

122

Notablemente las células tratadas con FGT, mostraron una sorprendente disminución en los niveles de AGE, de aproximadamente 22 unidades en relación con células no irradiadas, lo cual se traduce a un 120% de disminución en la concentración de AGE en relación con células no tratadas e irradiadas.

Así composiciones de la presente invención, produjeron mejoras en la incorporación de prolina así como también proporcionaron efectos benéficos en la células expuestas a radiación UV, en términos de actividad de MMP-1, y la formación de AGE.

Así otro aspecto de la invención se refiere a la composición adecuada para el tratamiento cosmético de las señales de envejecimiento de la piel y para el mantenimiento general de una piel saludable. Las señales de envejecimiento pueden ser el resultado de numerosos factores tales como, luz solar, tiempo, dieta y otras condiciones ambientales.

Típicamente una composición de la presente invención comprende:

- 1-80% p/p de componentes extraíbles del cartílago, peso/peso
- 0.1-75% p/p de extracto de semillas de uva, peso/peso; y
- 0.002-25%% p/p de licopeno, peso/peso

Más preferiblemente una composición de la presente invención comprende :

- 27-35% p/p típicamente 30-35% de extracto de cartílago, peso/peso
- 1-10% p/p extracto de semillas de uva, tal como 3-5% extracto de semillas de uva peso/peso; y
- 0.1-5% p/p de licopeno, típicamente 0.2-1% de licopeno, peso/peso

Los presentes investigadores han preparado adecuadas composiciones que comprenden:

- 100-110mg de extracto de pescado
- 95-105mg de extracto de plantas
- 25-35mg de extracto de Acerola
- 60-90mg de celulosa microcristalina
- 3.5-4.5mg de dióxido de silicio

En la cual el extracto de plantas comprende un procianidol oligomérico y licopeno, y los extractos de pescado comprenden glicosaminoglicanos.

Además una composición adecuada de acuerdo con la invención comprende:

100-110mg de extracto de pescado

95-105mg de extracto de plantas

60-65mg de inulina

25-35.00mg de ácido ascórbico

10-20mg de gluconato de zinc

10-15mg de dióxido de silicio

En la cual el extracto de plantas comprende un procianidol oligomérico y licopeno, y el extracto de pescado comprende glicosaminoglicanos.

Así una composición de la presente invención puede además comprender de otros componentes tales como suplementos nutricionales, tales como: vitaminas, minerales aminoácidos y carbohidratos. En una formulación preferida la composición además comprende una vitamina C o un extracto conteniendo vitamina C, tal como comprendiendo extracto de Acerola.

Como se estableció las cantidades relativas y absolutas de los constituyentes están bajo el entendimiento actual de la presente invención, de gran importancia para lograr los sorprendentes efectos benéficos de la composición de la presente invención. De acuerdo con esto los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos están preferiblemente presentes en una relación peso/peso en el rango desde cerca de 1:1 a cerca de 200:1, tal como desde 2:1 a 100:1, en particular desde 5:1 a 50:1, especialmente desde 5:1 a 20:1, preferiblemente desde 5:1 a 15:1, más preferiblemente cerca de 7:1 a 12:1, tal como cerca de 10:1.

Similantemente el cartílago, uno o más compuestos extraíbles de él y los antioxidantes hidrofílicos están preferiblemente presentes en una relación peso/peso en el rango desde cerca de 1:1 a cerca de 200:1, tal como desde 2:1 a 100:1, en particular desde 5:1 a 50:1, especialmente desde 5:1 a 20:1, preferiblemente desde 5:1 a 15:1, más preferiblemente cerca de 7:1 a 12:1, tal como cerca de 10:1.

Generalmente un aspecto importante de la presente invención se refiere a una composición en la cual el i)cartílago, uno o más componentes extraíbles del mismo o derivados del mismo ii)uno o más antioxidantes hidrofílicos; y iii)uno o más antioxidantes lipofílicos están presentes en cantidades suficientes, para suprimir la actividad MMP-1, suprimir la formación de AGEs o incrementar la síntesis de colágeno en células de fibroblastos humanos cultivados *in vitro*.

Similarmenete otro aspecto importante de la presente invención se refiere a la composición en la cual el i)cartílago, uno o más componentes extraíbles del mismo o derivados del mismo ii)uno o más antioxidantes hidrofílicos; y iii)uno o más antioxidantes lipofílicos Están presentes en una relación adecuada para suprimir la actividad de las MMP-1, para suprimir la formación de AGEs o para incrementar la síntesis de colágeno de las células de fibroblastos humanos cultivados *in vitro*.

En una combinación de la formulaciones preferida, la composición puede comprender 0.25-15mg de licopeno y 2.5-100mg de extracto de semillas de uva, preferiblemente desde 0.5-5mg de licopeno y 5-50mg de extracto de semillas de uva, particularmente 0.75-2.5mg de licopeno y 10-30mg de extracto de semillas de uva, particularmente 1-2.5mg de licopeno y 10-25mg de extracto de semillas de uva.

En otra combinación de formulaciones preferida, la composición puede comprender 1-2.5 mg de licopeno, 5-50mg de extracto de semillas de uva y 50-200mg de extracto de cartílago.

Las composiciones de la invención son para administración oral y pueden ser administradas en la forma de dosis sólidas, tales como tabletas, polvos, gránulos, cápsulas, sobres, o en una forma de una dosis líquida tal como soluciones, suspensiones, tónicos y jarabes. Tales formas dosificadas pueden ser preparadas en la forma conocida en el arte de la tecnología farmacéutica y puede contener uno o mas excipientes los cuales pueden ser algunos de aquellos comunmente usados en el arte. Para las composiciones sólidas cualquiera de los excipientes sólidos no tóxicos convencionales pueden ser incluidos, pero no limitados e.g. a grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, fibra de soya, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa tal como microcelulosa cristalina, glucosa, sacarosa, dióxido

de silicio, carbonato de magnesio o similares. Las formas de las dosis líquidas pueden ser obtenidas por disolución, dispersión de los componentes activos y un adyuvante farmacéutico opcional en un excipiente tal como agua o líquidos a base de agua como jugos, aceites o alcohol, para si formar la solución o suspensión. Si se desea, la composición oral de acuerdo con la invención puede también contener cantidades menores de aditivos conocidos en el arte, tales como humectantes o agentes emulsificantes, amortiguadores o similares. Tales formas de dosificación pueden ser formuladas de acuerdo con los principios bien conocidos en el arte, cf. También e.g. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishin Company, Easton Pennsylvania 15th Edition, 1975; or Martindale, *The Extra Pharmacopeia*, The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 31th Edition, 1996.

La composición puede ser tal que el antioxidante lipofílico, tal como el extracto de tomate o un extracto que contenga licopeno sea formulado para una descarga normal y el antioxidante hidrofílico, tal como extracto de semillas de uva sea formulado para una descarga retardada o lenta.

Como se ilustra en el ejemplo 5 cuando la composición cuando es tomada oralmente, tiene un visible efecto sobre la condición de la piel. La figura 4 también muestra que aquellos voluntarios que tomaron una composición de la presente invención mostraron una notable mejoría en todas las condiciones de la piel, la flexibilidad y la calidad de la piel alrededor de los ojos y la boca. Por lo tanto los resultados mostrados en los ejemplos 1 a 4 se traducen como un éxito *in vivo*, actuando aparentemente de manera sistemática cuando se toma oralmente.

Las composiciones de la presente invención pueden ser usadas como productos cosméticos orales, en alimentos o suplementos alimenticios o dietéticos.

Otro aspecto de la invención, se refiere a una composición para uso en el mantenimiento general de la piel saludable, la disminución del daño y la degeneración de la piel debida al envejecimiento por exposición a la radiación UV, y para el tratamiento de las señales de envejecimiento en la piel. Las composiciones de la presente invención son adecuadas en el tratamiento del envejecimiento de la piel, para pieles expuestas a luz solar u otras formas

de radiación UV, piel seca, piel áspera, piel descolorida, piel con acné, piel con cicatrices, piel con marcas de estiramiento, eczema y psoriasis.

Un método para el tratamiento cosmético o profiláctico de la piel contra las señales del envejecimiento de la piel, y el daño resultante de la exposición a la radiación UV, comprende la administración oral de una composición definida *supra*, y es un aspecto importante de la invención.

Similarmenete un método para el tratamiento cosmético o profiláctico del envejecimiento de la piel, piel expuesta a la luz solar u otras formas de radiación UV, piel seca, piel áspera, piel descolorida, piel con acné, piel con cicatrices, piel con marcas de estiramiento, eczema y psoriasis, comprende la administración oral de una composición definida *supra*, y es un aspecto de la invención.

El uso de la composición definida *supra* en la preparación de un agente para prevenir o disminuir las señales de envejecimiento de la piel, prevenir o disminuir los efectos dañinos de la exposición a la radiación UV, para el tratamiento de las marcas de estiramiento, para el tratamiento del acné, para la disminución de los síntomas del eczema, para ayudar en la formación de cicatrices y curación de heridas, para reducir las cicatrices, para disminuir los síntomas de la psoriasis, o para el tratamiento de pieles secas, ásperas y descoloridas, se anticipa.

En esos usos, la dosis típica diaria para una persona adulta promedio es de 55 a 3700 mg de las mezclas antes definidas con componente de cartílago, antioxidante hidrofílico y antioxidante lipofílico, tal como de 70 a 1000 mg. La administración puede tomarse en una dosis diaria o puede ser dividida en dosis a lo sumo para tomar cuatro veces al día, así como una, dos, tres, o cuatro veces, preferiblemente una o dos veces al día.

Las composiciones pueden ser empacadas de acuerdo con los principios bien conocidos en el arte, tal como contenedores de tabletas, paquetes de ampollitas o botellas. En el evento de que un componente sea sensible a la luz como es el caso particular del antioxidante lipofílico licopeno, es aconsejable protegerlo de la luz. En el caso de e.g paquetes de ampollitas se deben atar cuidadosamente si el paquete de ampollitas esta empacado de la forma usual de dos hojas de lamina de aluminio y unidas a una lamina plástica

respectivamente, tal como una forma (formando depresiones) laminada de plástico y aluminio (e.g lamina PVC , aluminio y orientado con laminas de poliamida) y una capa opcionalmente de lamina de aluminio barnizada, repectivamente.

La invención es ilustrada además por los siguientes ejemplos no limitantes:

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

*Determinación de la concentración efectiva de antioxidantes hidrofílicos, antioxidantes hidrofóbicos y extracto de cartílago.*

Varias concentraciones de extracto de semillas de uva (1-200 microg/mL), extracto de cartílago (0-1000mg/ml) y extracto de tomate (0-200 microg/mL) fueron ensayados en dosis de manera dependiente en cultivos *in vitro* de fibroblastos de piel humana. Después de la evaluación de las células sobrevivientes y la velocidad de crecimiento bajo las condiciones del cultivo, se seleccionó una única concentración óptima para cada ingrediente.

### Método

Las soluciones de trabajo de extracto de cartílago, extracto de semillas de uva y pasta de tomate que contiene licopeno se prepararon como se describe a continuación:

#### Solución de cartílago (40mg/mL):

200mg de polvo de pescado (extracto de cartílago preparado por hidrólisis enzimática proteolítica de cartílago, filtración y secado del hidrolizado por aspersión ) se disolvieron en 5 mL de solución salina de buffer de Hanks y se esterilizó el filtrado.

#### Solución de semillas de uva (40 mg/mL):

200mg de extracto de semillas (Indena, Milano, Italy) se disolvieron en 5 mL de solución salina de buffer de Hanks y se esterilizó el filtrado.

#### Solución de tomate (pre-stock 100 mg/mL)

Pre-stock: 400mg de pasta de tomate (que contienen 40mg de licopeno) se disuelven en 4 ml de tetrahidrofurano, el filtrado se esteriliza y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta usar.

Solución de trabajo de tomate (100  $\mu\text{g/mL}$ ):

Solución de trabajo de tomate: el pre-stock se diluye en 1:1000 justo antes de usar en el medio celular DMEM.

El cultivo de células de fibroblastos humanos fue hecho como se describe a continuación: Se sembraron 10.000 células / pozo en 24 bandejas, se permitió que las células se unieran durante la noche antes que el medio fuera cambiado a medios conteniendo diferentes concentraciones de extracto de cartílago (F), extracto de semillas de uva (G) y extracto de tomate (T) . El medio celular DMEM, (10% de suero fetal de ternero +Glutamina, penicilina/estreptomicina) se cambió cada segundo o tercer día excepto para medios conteniendo TF los cuales fueron removidos todos los días. La células crecieron a confluencia (a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , y 95% de humedad), y fueron contadas cada segundo día usando 300 $\mu\text{L}$  de Tripsina/EDTA, por pozo durante 10 minutos, para destacar las células, estando en la incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  y se usaron 200  $\mu\text{L}$  para contar el número de células/mL.

Las células sobrevivientes y el crecimiento celular fueron evaluados después de 15 días. Las células sobrevivientes fueron evaluadas mediante la medición de la MTT que tuvo lugar en ellas. El nivel de captación corresponde a los niveles de actividad mitocondrial, la cual puede ser usada como señal de viabilidad celular. La MTT es reducida a un compuesto de color azul: formazan, que es detectado por absorción UV/VIS a 595nm con referencia a 655nm.

El crecimiento celular fue evaluado como un número de células por frasco de cultivo, usando un contador electrónico: Coulter ®.

Resultados

63  
124

Los cultivos celulares suplementados con 70µg/mL de extracto de cartílago, 10 µg/mL de extracto de semillas de uva y 10 µg/mL de extracto de tomate (equivalente a 1.0 µg/mL de licopeno), proporcionan un ambiente óptimo para el crecimiento celular. Estas concentraciones no tienen efectos tóxicos y no producen cambios en la velocidad de división celular . Estos resultados fueron además confirmados por un gran número de siembras de cultivos de fibroblastos en medios suplementados con la combinación antes mencionada, por un período de 50 días. El monitoreo acumulativo de niveles de población dobles (CPDL) que corresponde al número de divisiones celulares y al crecimiento celular, no son afectados por los ingredientes del ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Ffigura 1

Tabla 1

| Día | O     | F     | FGT   | GT    |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| O   | 18    | 18    | 18    | 18    |
| 3   | 19,17 | 19,34 | 18,87 | 18,8  |
| 9   | 21,4  | 21,52 | 21,28 | 21,32 |
| 14  | 23,08 | 22,93 | 23,05 | 23,02 |
| 21  | 25,65 | 25,87 | 25,59 | 25,67 |
| 28  | 27,53 | 27,57 | 27,73 | 27,78 |
| 35  | 28,88 | 28,88 | 29,2  | 29,15 |
| 42  | 31,45 | 31,54 | 31,4  | 32,03 |
| 50  | 32,98 | 33,14 | 33,42 | 33,39 |

**EJEMPLO 2**

*Efecto de la composición sobre la síntesis de colágeno*

Se estableció un sistema de ensayo *in vitro* para ensayar la influencia de F, G y T sobre la síntesis de colágeno. La síntesis de colágeno se evaluó midiendo la incorporación de prolina radiactiva ([<sup>14</sup>C]-prolina) dentro de proteínas que contienen colágeno, las cuales en su mayoría se consideran que son colágeno en donde el número de residuos de prolina constituye por encima del 30 % del número total de aminoácidos. Varias combinaciones de F, G y T en concentraciones óptimas, determinadas según lo descrito en el ejemplo 1, se

adicionaron a los medios celulares y la radioactividad de las proteínas secretadas y marcadas fue medida después de 24 horas.

### Método

Los extractos de F, G y T fueron producidos igual que en el ejemplo 1.

La incorporación de prolina marcada radiactivamente en cultivos de células de fibroblastos humanos fue llevada a cabo como sigue (test del método A): varias combinaciones de F, G y T fueron adicionadas el día después de la siembra y las células fueron creciendo a confluencia (aproximadamente 1 semana). El medio de cultivo fue cambiado diariamente. A confluencia el medio de cultivo fue cambiado a 0.5 mL de soluciones radiactivas (25  $\mu$ Ci) + 2.5 mL de medio sin F, G o T.

Las células fueron dejadas en la incubadora por las siguientes 24 horas y luego se recogió el medio y se sometió al siguiente procedimiento de medición de la radioactividad.

*Precipitación con TCA:* Se mezclaron 5  $\mu$ L del medio con 20  $\mu$ L de BSA (0.5 g/L) y 1 mL de TCA (10%) y se dejó a -20 °C por 30 minutos, las muestras fueron tratadas pasándolas a través de un filtro de nitrocelulosa para separar la prolina radioactiva de las proteínas marcadas. El filtrado fue transferido a un tubo en el cual se adicionaron 2.5 mL de líquido de centelleo. El tubo se dejó en la oscuridad por una hora después de la cual se midió la radioactividad en muestras de 5  $\mu$ L en un contador de centelleo.

### Resultados

El resumen de los resultados se muestra en la Tablas 2 a y 2 b. En los cultivos de células que contenían extractos GT produjeron una disminución en el grado de incorporación de prolina, comparado con el control: 3.6% de incorporación, comparado con 4.8% del control, un 25 % de disminución. En los cultivos de células que contenían extracto FT no hubo una influencia significativa en la incorporación de prolina : ya que el grado de incorporación fue 5.0% comparado con 4.8 % del control, un 4 % de incremento solamente. En los cultivos de células con extractos FG se produjo un pequeño incremento en el grado de incorporación de prolina: 5.5 % de incorporación , un 10 % de incremento comparado con el control.

68  
B1

En los cultivos de células que contenían extracto F, se produjo un incremento en el grado de incorporación de prolina: 6,2 % de incorporación, un 29 % de incremento en comparación con el control. Sin embargo extractos con FGT, sorprendentemente produjeron un dramático 80% de incremento en la incorporación de prolina ( 8.4 de prolina incorporada).

En este tipo de experimentos una diferencia como la anterior del 30 % se considera significativa

**Tabla 2**

| TRATAMIENTO | ACTIVIDAD EN<br>dpm | ACTIVIDAD EN<br>µCi<br>rendimiento | % de PROLINA<br>INCORPORADA | RESULTADOS<br>DEL CONTROL |
|-------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| GT          | 4516                | 0.0015                             | 3.6                         | 20% de disminución        |
| CONTROL     | 5787                | 0.0020                             | 4.8                         | -                         |
| FT          | 4516                | 0.0021                             | 5.0                         | No cambio                 |
| FG          | 5137                | 0.0023                             | 5.5                         | 10% de incremento         |
| F           | 5787                | 0.0026                             | 6.2                         | 30% de incremento         |
| FGT         | 7738                | 0.0035                             | 8.4                         | 80% de incremento         |

**EJEMPLO 3**

*Efecto de la composición sobre fibroblastos humanos expuestos a radiación UV*

La exposición a la radiación UVA es la responsable de un número de cambios degenerativos en la piel que lidera las señales visibles de envejecimiento de la piel. Los efectos protectores de los extractos F, G y T y sus combinaciones, contra el daño inducido por la radiación UV fueron ensayados por monitoreo de los productos bioquímicos marcados que están asociados con el fotoenvejecimiento (niveles de MMP-1 y AGEs), en cultivos de fibroblastos sometidos a radiación UV.

En los cultivos de células que contenían extracto F, se produjo un incremento en el grado de incorporación de prolina: 6,2 % de incorporación, un 29 % de incremento en comparación con el control. Sin embargo extractos con FGT, sorprendentemente produjeron un dramático 80% de incremento en la incorporación de prolina ( 8.4 de prolina incorporada).

En este tipo de experimentos una diferencia como la anterior del 30 % se considera significativa

**Tabla 2**

| TRATAMIENTO | ACTIVIDAD EN<br>dpm | ACTIVIDAD EN<br>µCi<br>rendimiento | % de PROLINA<br>INCORPORADA | RESULTADOS<br>DEL CONTROL |
|-------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| GT          | 4516                | 0.0015                             | 3.6                         | 20% de disminución        |
| CONTROL     | 5787                | 0.0020                             | 4.8                         | -                         |
| FT          | 4516                | 0.0021                             | 5.0                         | No cambio                 |
| FG          | 5137                | 0.0023                             | 5.5                         | 10% de incremento         |
| F           | 5787                | 0.0026                             | 6.2                         | 30% de incremento         |
| FGT         | 7738                | 0.0035                             | 8.4                         | 80% de incremento         |

**EJEMPLO 3**

*Efecto de la composición sobre fibroblastos humanos expuestos a radiación UV*

La exposición a la radiación UVA es la responsable de un número de cambios degenerativos en la piel que lidera las señales visibles de envejecimiento de la piel. Los efectos protectores de los extractos F, G y T y sus combinaciones, contra el daño inducido por la radiación UV fueron ensayados por monitoreo de los productos bioquímicos marcados que están asociados con el fotoenvejecimiento (niveles de MMP-1 y AGEs), en cultivos de fibroblastos sometidos a radiación UV.

Cultivos de fibroblastos de células humanas se expusieron a una dosis de radiación UVA diaria durante cuatro días consecutivos. Se usaron dos dosis diferentes ( 5 y 7.5 J/cm<sup>2</sup> ), equivalentes a la máxima dosis tolerada por las células antes que ocurra la muerte celular

Los cultivos de las células se suplementaron con varias combinaciones de F, G y T (F, FG, FT, GT y FGT) usando las concentraciones óptimas de F, G y T ( como se determino y describió en el ejemplo 1) y luego se midió después de uno y cuatro días, la actividad de las MMP – 1 y la formación de AGE.

### Métodos

Los extractos se obtuvieron según lo descrito en el método 1.

Los cultivos celulares se prepararon como se describe a continuación:

Las células con una transferencia dada se cambiaron a un medio que contenía las combinaciones de los tratamientos de F, G y T. A confluencia ellas fueron repartidas 1:4 para obtener cuatro frascos para cada tratamiento. A confluencia uno (repartido 1:4) o dos (repartidos 1:2) fueron transferidos en serie a cuatro nuevos frascos.

La radiación UVA sobre los cultivos de células se hizo como se describe a continuación:

Una dosis de radiación UVA se produjo usando tubos de alto rendimiento Philips 6x 40W UVA Cleo. Se utilizó un medidor Hgner UVA para medir la radiación en W/m<sup>2</sup> y se calculó el tiempo necesario de exposición para alcanzar la dosis deseada de 5, 7.5, 10 y 15 J/cm<sup>2</sup>. Inicialmente el experimento mostró que la dosis óptima de radiación que no causa muerte celular fue 7.5 J/cm<sup>2</sup>.

La determinación de la actividad de la MMP-1 (actividad endógena mas niveles latentes) se midió usando un sistema de análisis comercialmente disponible de APBiotch., código RPN 2629 ( test del método B)

La determinación de AGEs se basó en la técnica de ELISA (test del método C):

Día 1: los microplatos fueron bien cubiertos con 50 ng de AGE/pozos, diluidos en buffer de carbonato y se dejaron toda la noche a +4°C,

Día 2 : Las pozos se lavaron cuatro veces con PBST (PBS y 0.05% de Tween 20) y entonces se bloquearon con 200 µL/pozo de PBS-leche (6%) por dos horas a temperatura ambiente (RT). Posteriormente los pozos se lavaron cuatro veces con PBST antes de la adición de 50 µL de patrón de AGE (20 – 20.000 unidades/pozo) o 50 µL de muestra (equivalente a 50 µg de proteína/mL), seguida de la adición de 50 µL de anticuerpos de AGE policlonados (dilución 1/1000). Los platos se colocaron en agitación rápida por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente los pozos se lavaron cuatro veces con PBST antes de la adición del segundo anticuerpo (conejo policlonado, HRP, dilución 1/1000) 50 µL/pozo y se colocaron nuevamente en agitación por dos horas a temperatura ambiente. Finalmente los pozos se lavaron cuatro veces con PBST antes de la adición del 100 µL/pozo de sustrato: 1tableta de OPD / 3 mL ddH<sub>2</sub>O + 1/1000 (v/v) de peróxido de hidrógeno (35%). Los platos se dejaron en un lugar oscuro y después del desarrollo el color apropiado, se detuvo la reacción por adición de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M), la absorbancia del plato se leyó a 490 nm (ref 655 nm).

## Resultados

Los resultados para la actividad de la MMP-1 y la formación de AGE, se muestran en las Figuras 2 y 3 respectivamente

### 1. Actividad de la MMP-1

La radiación UVA indujo la actividad de las MMP-1 en las células no tratadas (control) en ambos días el 1 y el 4, confirmando así la capacidad de la radiación UVA para inducir la actividad de las MMP-1 en cultivos de fibroblastos del control en aproximadamente el doble durante los períodos de foto-envejecimiento.

Las células tratadas con GT muestran un 34% y un 58% de incremento en los días 1 y 4 respectivamente.

Recíprocamente, la actividad de las MMP-1 en las células suplementadas con F se triplico y cuádruplico después de la exposición a la radiación UV en el día 1 y el día 4 respectivamente.

Sorprendentemente, las combinaciones de F con GT para formar FGT no produjeron incremento en la actividad de las MMP-1 en células expuestas a la radiación UV . Así las células tratadas con FGT tienen la mitad de la actividad que las del control bajo idénticas condiciones.

**TABLA 3**

Día 1

|         | 0 J/cm <sup>2</sup> | 5 J/ cm <sup>2</sup> | 7.5 J /cm <sup>2</sup> |
|---------|---------------------|----------------------|------------------------|
| Control | 1                   | 2.01                 | 1.80                   |
| GT      | 1                   | 1.34                 | 1.34                   |
| FGT     | 1                   | 0.97                 | 0.99                   |

**Tabla 3ª**

Día 4

|         | 0 J/ cm <sup>2</sup> | 5 J/ cm <sup>2</sup> | 7.5 J/ cm <sup>2</sup> |
|---------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Control | 1                    | 2,02                 | 2,3                    |
| GT      | 1                    | 1,37                 | 1,58                   |
| FGT     | 1                    | 1,04                 | 0,99                   |

**II: FORMACIÓN DE AGE**

Los resultados se muestran en la Figura 3 y la tabla 4. En las células de control no suplementadas, bajo una única dosis de exposición a la radiación UV ( 5 J/ cm<sup>2</sup> ) incrementó la producción de AGE en aproximadamente 20 veces más que en la células de control no irradiadas. Bajo las mismas condiciones , el nivel de AGE en cultivos suplementados con F se incremento en 40 veces , lo cual muestra que F no tiene efecto protector sobre la formación de AGE por radiación UV. En la figura 3 se aprecia que los

niveles de AGE en células suplementadas con FG se incrementaron en 72 unidades , el cual está en el mismo rango de las células de control no tratadas e irradiadas ( un 10 % de disminución comparado con el control)

Notablemente, Las células tratadas con FGT muestran una sorprendente disminución en el nivel de AGE, de aproximadamente 22 unidades frente a las células de control no irradiadas, lo cual se traduce en un 120 % de disminución en la concentración a de AGE respecto a las células no tratadas e irradiadas.

Así composiciones de la presente invención producen mejoras en la incorporación de prolina, así como también proporcionan efectos benéficos en células expuestas a la radiación UV, expresados en términos de la actividad de la MMP-1 y formación de AGE.

**Tabla 4**

|         | 5 j/ cm <sup>2</sup> | 7,5 J/ cm <sup>2</sup> |
|---------|----------------------|------------------------|
| Control | 80.06                | 67,88                  |
| F       | 152,72               | 258,21                 |
| FG      | 72,04                | 118,58                 |
| FGT     | -21,94               | -34.92                 |

**EJEMPLO 4**

Se prepararon composiciones de acuerdo con la presente invención usando laos siguientes ingredientes mezclados en las proporciones establecidas (las cantidades están dadas por unidad de dosis final):

El licopeno es sensible a la oxidación en el manejo de mezclado y granulación , en la compresión de tabletas, en el almacenamiento de tabletas y en el empacado de las tarjetas de ampolletas, por lo tanto todos los procesos deben hacer en atmósfera protectora de nitrógeno.

31  
13Composición 1 (Tableta código SF)

- ❖ 105mg de extracto de cartílago ( preparado por hidrólisis enzimática proteolítica de cartílago, filtración y secado por aspersión del hidrolizado);
- ❖ 100mg de extracto de plantas ( que contienen ca. 1.5mg de licopeno extraído de tomates y ca.14mg de flavonoides extraídos de semillas de uva, el resto es fibra de soya, aceite de tomate, dióxido de silicio, Alextan® de Indena, Milano, Italia);
- ❖ 30mg de extracto de Acerola ( que contiene ca. 7.5mg de ácido ascórbico, siendo el resto los demás constituyentes del extracto de Acerola y maltodextrina);
- ❖ 66mg de celulosa microcristalina
- ❖ 4mg de dióxido de silicio (tamaño de partícula 2.4 – 3.6 µm).

La mezcla se colocó en un mezclador Lödige por 6 minutos. El polvo mezclado se comprimió para formar tabletas de 305mg de peso.

Composición 2 (Tabletas código SF-1)

- ❖ 105mg de extracto de cartílago (preparado por hidrólisis enzimática, proteolítica de cartílago, filtración y secado por aspersión del filtrado)
- ❖ 100mg de extracto de plantas ( que contiene ca. 1.5mg de licopeno extraído de tomates y ca.14mg de flavonoides extraídos de semillas de uva , el resto es fibra de soya , aceite de tomate, dióxido de silicio; Alextan® de Indena, Milano, Italia ).
- ❖ 30mg de extracto de Acerola ( que contiene ca. 7,5mg de ácido ascórbico , siendo el resto los demás constituyentes del extracto de Acelora y maltodextrina):
- ❖ 81mg de celulosa microcristalina
- ❖ 4mg de dióxido de silicio ( tamaño de partícula 2.4 – 3.6 µm).

La mezcla se colocó en un mezclador Lödige por 6 minutos. El polvo mezclado se comprimió en tabletas de 320mg de peso.

Composición 3 (Tabletas código SS)

- ❖ 105mg de extracto de cartilago (preparado por hidrólisis enzimática, proteolítica de cartilago, filtración y secado por aspersión del filtrado)
- ❖ 100mg de extracto de plantas ( que contiene ca. 1.5mg de licopeno extraído de tomates y ca.14mg de flavonoides extraídos de semillas de uva , el resto es fibra de soya , aceite de tomate, dióxido de silicio; Alextan® de Indena, Milano, Italia ).
- ❖ 62mg de inulina
- ❖ 30mg de ácido ascórbico
- ❖ 15mg de gluconato de zinc
- ❖ 13mg de dióxido de silicio ( tamaño de partícula 2.4 – 3.6 µm)

La mezcla se colocó en un mezclador Lödige por 6 minutos. El polvo mezclado se comprimió en tabletas de 325mg de peso.

#### Composición Típica

FE : 105 mg

GE : 13.75 mg

TE : 14.38 mg ( de los cuales 1.44 mg son de licopeno = 10 %)

#### EJEMPLO 5

La composición del ejemplo 1 se ensayo en un consumidor de ensayo, para evaluar la percepción de los consumidores, en los cambios de la piel.

129 voluntarios entraron a un estudio de tres meses durante los cuales tomaron dos tabletas diarias de la composición del Ejemplo 1. Ellos registraron la apariencia y calidad de su piel antes de iniciar el ensayo. Después de 1,2 y 3 meses de suplementación ellos evaluaron nuevamente los cambios en la apariencia de su piel y la calidad de acuerdo con los siguientes códigos: 0 : condición sin cambio, 1: ligeramente mejorada, 2: mejorada, 3: muy mejorada..

La figura 4 muestra los resultados de la evaluación de los parámetros , " sobre todas las condiciones de la piel", " flexibilidad", "calidad de la piel alrededor de los ojos" y " alrededor de la boca". Las mejoras están evaluadas en porcentaje de voluntarios que experimentan mejoras.

### Referencias

1. Emonard, H. & Grimaud, J.A. Matrix metalloproteinases . A riview. Cell Mol. Biol. 36,131-153 (1990)
2. Fisher, G. J. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N. Engl. Med. 337, 419 – 1428 (1997)
3. Fisher, G. J. & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP Kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. J. investing. Dermatol. Symp. Proc. 3, 61 –68 (1998)
4. Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. Phochem. Photobiol. 69, 154 – 157 (1999)
5. Hase, T, et al. Histological increase in inflammatory infiltrate in sun-exposed skin of female subjects: the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by inflammatory infiltrate on collagen degradation. Br. J. Dermatol. 142, 267-273 (2000)
6. Petersen, M.J., Hansen, C. & Craig, S. Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultures human fibroblasts. J. Invest Dermatol. 99, 440 – 444 (1992)
7. Scharffetter, K. et al UVA irradiation induces collagenase in human dermal in vitro and in vivo fibroblasts. Arch. Dermatol. Res 283, 506 –511 (1991)
8. Wlaschek, M, Briviba K & Stricklin, P. Singlet oxygen May Mediate Ultraviolet A induced synthesis of interstitial Collagenase. J. invest. Dermatol. 104, 194 – 198 (1995).
9. Fu, M.X. Knecht K.,J., Thorpe , S.R. & Baynes ., J. W. Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. Diabetes 41 suppl 2, 42 – 48 (1992).

10. Massaki, H., Okano, Y. & Sakurai, H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet A light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 45 – 56 (1999).

78  
141

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para administración oral que comprende extracto de la plantas y extracto del cartílago, en la que el extracto de plantas comprende extracto de semillas de uva y extracto de tomate.
2. Una composición según la reivindicación 2, en la que el extracto de plantas comprende extracto de semillas de uva y extracto de tomate en una relación peso/peso de aproximadamente 2:1 a 1:2, preferiblemente cerca de 1:1.
3. Una composición para administración oral que comprende extracto de la plantas y extracto del cartílago, en la que el extracto de plantas comprende extracto de semillas de uva y licopeno en una relación peso/peso de aproximadamente 5:1 a 15:1, preferiblemente cerca de 10:1
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el extracto del cartílago y el extracto de plantas están presentes en una relación peso/peso, de aproximadamente 1:2 a 2:1, preferiblemente cerca de 1:1
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el extracto del cartilago comprende glicosaminoglicanos seleccionados del grupo consistente de un éster de la condroitina, un éster del queratano, ácido hialúronico o un éster del mismo, un éster del dermatano, heparina o un éster de la heparano, y epímeros y polímeros de los mismos, cada uno de los cuales pueden estar opcionalmente unidos a un péptido.
6. Una composición según la reivindicación 5, en la que los glicosaminoglicanos se seleccionan del grupo consistente en condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, y sulfato de queratano, cada uno de los cuales puede opcionalmente estar unido a un péptido.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el extracto del cartílago comprende sulfato de condroitina, opcionalmente unido a un péptido.

8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende menos del 1% peso/peso de colágeno, preferiblemente menos del 0.5%, particularmente preferiblemente menos del 0.1%, más preferiblemente siendo libre de colágeno.

9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que haya entre 0.1 a 5 % de licopeno peso/peso, preferiblemente 0.2 a 4% de licopeno, tal como 0.3 a 2% de licopeno, mas preferiblemente 0.3 a 1% de licopeno, particularmente 0.3 a 0.8% de licopeno, tal como 0.3 a 0.6% de licopeno.

10. Una composición según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 9 , en la que dicha composición incrementa la síntesis de colágeno al menos en un 35%, determinado por el test del método A.

11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la que dicha composición disminuye el efecto dañino de los radicales libres de oxígeno, al menos en un 40%, medido por la actividad MMP-1, y comparado con un control bajo las condiciones del test del método B, tal como al menos el 45%, tal como al menos el 50%.

12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha composición disminuye la formación de los productos finales de la glicosilación avanzada (AGE), en al menos un 10% medido y comparado contra un control, bajo las condiciones del test del método C, tal como al menos 20%, tal como al menos 30%, 40%, 50% o 60 %, preferiblemente al menos 70%, particularmente al menos 80%, o 90% más preferiblemente al menos 100 o 110%.

13. Una composición para administración oral, dicha composición comprende:

- i) cartílago, uno o más componentes extraíbles de él, o derivados del mismo
- ii) uno o más antioxidantes hidrofílicos, y
- iii) uno o más antioxidantes lipofílicos;

74  
103

La cual incrementa la síntesis de colágeno al menos en un 35% determinado según el test de método A.

14. Una composición según la reivindicación 13, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos es del extracto de semillas de uva.

15. Una composición según la reivindicación 13, en la cual uno o más antioxidantes lipofílicos es del extracto de tomate.

16. Una composición según la reivindicación 13, en la cual uno o más antioxidantes lipofílicos son de fuentes naturales o sintéticas.

17. Una composición según la reivindicación 16, en la cual la fuente natural es seleccionada del grupo que consiste de corteza de pino , *Vitis vinífera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silybum marianum*.

18. Una composición según la reivindicación 13, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos es un procianidol oligomérico.

19. Una composición según las reivindicaciones 13 a 18, en la cual uno o más antioxidantes lipofílicos son extraíbles de las semillas de uva de *Vitis vinífera*.

20. Una composición según la reivindicación 13, en la cual uno o más antioxidantes lipofílicos son de una fuente natural o sintética.

21. Una composición según la reivindicación 20, en la cual la fuente natural es una variedad de tomate.

22. Una composición según la reivindicación 20, en la cual el extracto de tomate es la única fuente de antioxidante lipofílico.

23. Una composición según la reivindicación 21, en la cual la variedad de tomate es *Lycopersicum aesculentum*.

24. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en la cual el antioxidante lipofílico, comprende un carotenoide seleccionado del grupo que comprende  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno, licopeno ( $\psi, \psi$ -caroteno), zeaxantina, criptoxantina, luteína, y xantofilas.

25. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-24, en la cual uno de uno o más antioxidantes lipofílicos es licopeno.

26. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-25, que comprende 0.1 a 5% de licopeno peso/peso, preferiblemente 0.2 a 4% de licopeno, tal como 0.3 a 2% de licopeno, más preferiblemente 0.3 a 1%, particularmente 0.3 a 8%, tal como 0.3 a 0.6% de licopeno.

27. Una composición según la reivindicación 20, en la cual la fuente natural de uno o más antioxidantes lipofílicos comprende cerca de :

5-12% de licopeno

1-1.5% de tocoferoles

0.05-0.25% de  $\beta$ -caroteno

0.5-0.75% de fitoeno; y

0.5-0.55% de fitoflueno

28. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende menos de 0.025% de  $\beta$ -caroteno, preferiblemente menos que 0.02%, particularmente menos que 0.01% de  $\beta$ -caroteno.

29. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 28, en la cual el incremento en la síntesis de colágeno es al menos 40%, al menos 45%, tal como al menos 50%, al menos 55%, preferiblemente al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, o al menos 80%.

30. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 29, en la cual la composición reduce los efectos dañinos de los radicales libres de oxígeno, en al menos un

40% medidos como la actividad de la MMP-1 comparados con un control, bajo las condiciones del test del método B, tal como al menos 45%, tal como al menos 50%.

31. Una composición según la reivindicación 30, en la cual los efectos dañinos son debidos a la exposición a rayos UV.

32. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 31, en la cual dicha composición disminuye los productos finales de la glicosilación avanzada (AGE) en por lo menos 10% como se midió comparando con un control bajo las condiciones del test del método C, tal como al menos 20%, tal como por lo menos 30%, 40%, 50%, o 60%, preferiblemente al menos 70%, particularmente por lo menos 80 o 90%, más preferiblemente al menos 100 o 110%.

33. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 31, en la cual los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, están presentes en una proporción peso/peso, en un rango desde cerca 1:1 hasta 200:1, tal como desde 2:1 hasta 100:1, de una manera más particular 5:1 hasta 50:1, especialmente desde 5:1 hasta 20:1, preferiblemente desde 5:1 hasta 15:1, más preferiblemente cerca de 7:1 a 12:1, tal como 10:1.

34. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 33, en la cual el cartílago uno o más componentes extraíbles del mismo y los antioxidantes hidrofílicos están presentes en una proporción peso/peso en un rango desde 1:1 hasta 200:1, tal como desde 2:1 hasta 100:1, particularmente desde 5:1 hasta 50:1, especialmente desde 5:1 hasta 20:1, preferiblemente desde 5:1 hasta 15:1, más preferiblemente cerca 7:1 hasta 12:1, tal como cerca de 10:1.

35. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 34 que comprende 0.25-15mg de licopeno y 2.5-100mg de extracto de semillas de uva, preferiblemente entre 0.5-5mg de licopeno y 5-50mg de extracto de semillas de uva, particularmente 0.75-2.5mg de licopeno y 10-30mg de extracto de semillas de uva, particularmente 1-2.5mg de licopeno, y 10-25mg de extracto de semillas de uva.

36. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 35, que comprende 1-2.5mg de licopeno, 5-50mg de extracto de semillas de uva y 50-200mg de extracto de cartílago.

37. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, que comprende 20-40% de extracto de cartílago, tal como 25-35%, preferiblemente 27-35%, tal como 30-35% de extracto de cartílago peso/peso;

1-10% extracto de semillas de uva, tal como 2-8%, preferiblemente

3-7%, tal como 3-5% de extracto de semillas de uva peso/peso; y

1-10% extracto de tomate, tal como 2-8%, preferiblemente

3-7%, tal como 3-5% de tomate peso/peso.

38. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-37, además comprende extracto de *Acerola*.

39. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones que comprende:

100-110 mg de extracto de pescado

95-105 mg de extracto de plantas

25-35.00 mg de extracto de *Acerola*

60-90 mg de celulosa microcristalina

3.5-4.5 mg de dióxido de silicio

En la cual el extracto de plantas comprende un procianidol oligomérico y licopeno y el extracto de pescado comprende un glicosaminoglicano.

40. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-38 que comprende:

100-110 mg de extracto de pescado

95 -105 mg de extracto de plantas

60-65 mg de inulina

25-35.00 mg de ácido ascórbico

10-20 mg de gluconato de zinc

10-15 mg de dióxido de silicio

En la cual el extracto de plantas comprende un procianidol oligomérico y licopeno y el extracto de pescado comprende un glicosaminoglicano.

41. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en la cual el extracto de semillas de uva está formulado para descargue lento y el licopeno está formulado por descargue normal.

42. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, para uso como un producto cosmético oral, como un alimento o suplemento alimenticio, un producto farmacéutico, o dietético.

43. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones conveniente para el mantenimiento general de la piel saludable, para prolongar el comienzo de la degeneración de la piel debido al envejecimiento o a la exposición a rayos UV, y para el tratamiento de las señales de envejecimiento de la piel.

44. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, para uso en el tratamiento de el envejecimiento de la piel, piel expuesta a rayos solares u otras formas de radiación UV, piel seca, piel áspera, piel descolorida, piel con acné, piel con cicatrices, piel con marcas de estiramiento, eczema y psoriasis.

45. Una composición según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en la cual la composición es administrada en la forma de una dosis sólida tales como tabletas, polvos, gránulos, granulados, cápsulas, sobres o en forma de una dosis líquida tales como soluciones, suspensiones, tónicos o jarabes.

46. Un método para el tratamiento cosmético o profiláctico del envejecimiento de la piel, piel expuesta a rayos solares u otras formas de radiación UV, piel seca, piel áspera, piel descolorida, piel con acné, piel con cicatrices, piel con marcas de estiramiento, eczema y psoriasis, que comprende una administración oral de una composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

47. Un método para el tratamiento cosmético o profiláctico de la piel contra los signos de envejecimiento de la piel, como también del daño producido por la exposición a rayos UV que comprende una administración oral de una composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

48. Un método para incrementar la síntesis de colágeno o aminorar el decrecimiento de la síntesis de colágeno en la dermis, que comprende una administración oral de una composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

49. El uso de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para la preparación de un agente para prevenir o retardar los signos de envejecimiento de la piel, previniendo o disminuyendo los efectos dañinos de la exposición a rayos UV, para el tratamiento de marcas de estiramiento, para el tratamiento del acné, para disminuir los síntomas del eczema, para ayudar en la cicatrización y para reducir las cicatrices, para disminuir los síntomas de psoriasis, para el tratamiento de piel áspera, descolorida o seca.

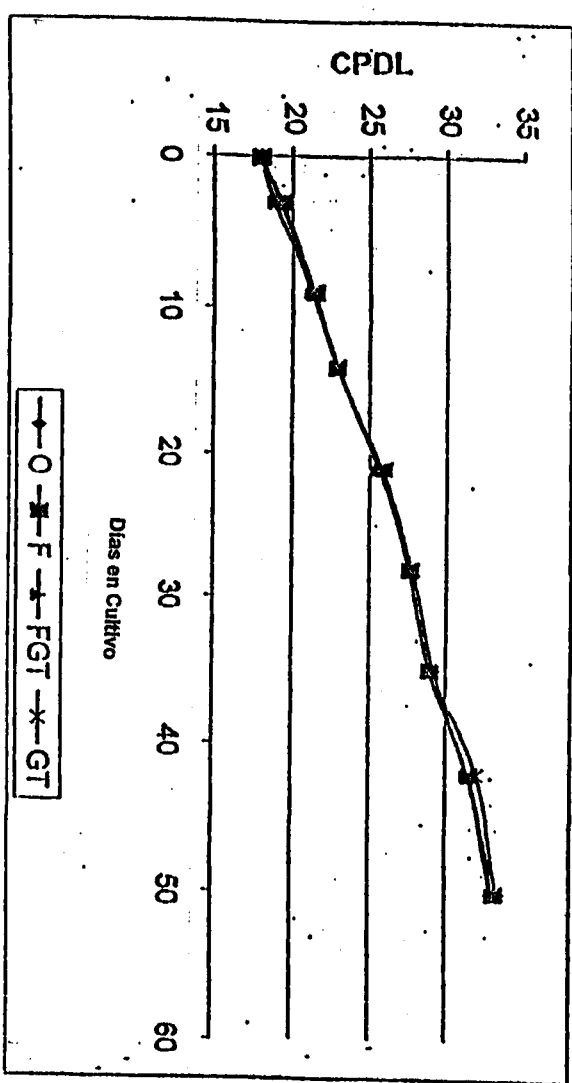


Fig. 1.

17618

88  
151

3/4

Concentración de Edad – Día 1

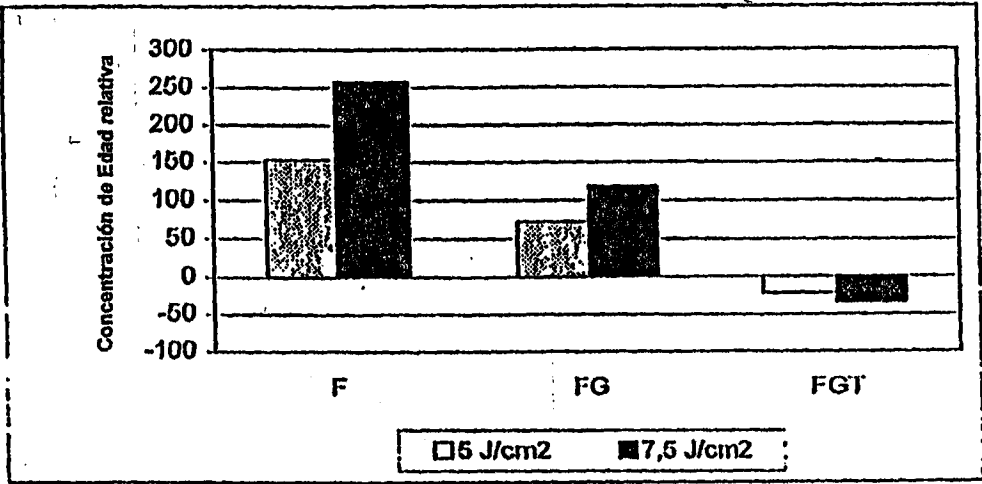


Fig. 3

88  
152

4/4

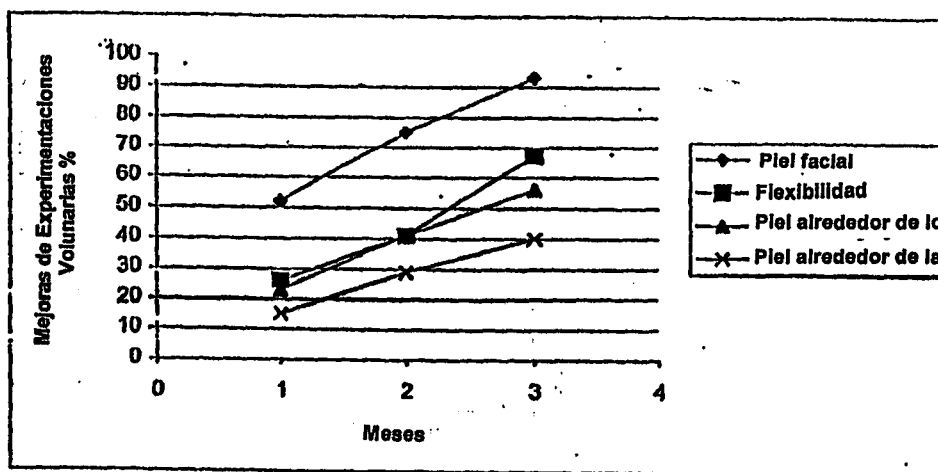


Fig. 4

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                       |                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>17790PC01                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)                                         |                                              |
| International application No.<br>PCT/DK01/00331                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | International filing date (day/month/year)<br>10/05/2001                                                                                                              | Priority date (day/month/year)<br>12/05/2000 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61K35/32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                       |                                              |
| Applicant<br>OLSON, Bengt Krister                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                       |                                              |
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 5 sheets.</p>                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                       |                                              |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul> |                                                                                                                                                                       |                                              |
| Date of submission of the demand<br><br>11/12/2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Date of completion of this report<br><br>08.07.2002                                                                                                                   |                                              |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br><br> European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Authorized officer<br><br>Peris Antoli, B<br><br>Telephone No. +49 89 2399 8476  |                                              |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DK01/00331

**I. Basis of the report**

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).*):

**Description, pages:**

1-27 as originally filed

**Claims, No.:**

1-44 as received on 30/04/2002 with letter of 30/04/2002

**Drawings, sheets:**

1/4-4/4 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).  
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:  
☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DK01/00331

☐ the drawings, sheets:

5. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

*(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)*

**see separate sheet**

6. Additional observations, if necessary:

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-19, 21-44 (in part); 42-44 (industrial applicability).

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 42-44 (industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):  
**see separate sheet**

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-19, 21-44 (in part) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):  
**see separate sheet**

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)

Yes: Claims 1-19, 21-44 (part)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DK01/00331

|                               |      |        |                                                |
|-------------------------------|------|--------|------------------------------------------------|
|                               | No:  | Claims |                                                |
| Inventive step (IS)           | Yes: | Claims | 1-19, 21-44 (part)                             |
|                               | No:  | Claims |                                                |
| Industrial applicability (IA) | Yes: | Claims | 1-19, 21-44 (part); 42-44 (see separate sheet) |
|                               | No:  | Claims |                                                |

2. Citations and explanations  
see separate sheet

**Re Item I****Basis of the report**

1. Claim 20 filed with the letter of 30.04.02 adds subject matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Art. 34(2)b PCT, because the in the original application (see p. 9, l. 19-29 or claim 27) the features "tocopherols", "phytoene" and "phytofluene" are only disclosed in connection with natural sources of lipophilic antioxidant comprising a determined percentage of said and other compounds. Said precise disclosure does not provide basis for generalization.
2. Thus, according to Rule 70.2 (c) PCT, this report has been established as if the referred claim 20 had not been filed.

**Re Item III****Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

3. According to the description (see e.g. p. 2, l. 3-7; p. 4, l. 15-24; p. 5, 13-24; p. 6, l. 6-11; p.6, l. 22-25) and as supported by the experimental data of the present application, the present **invention** is based on the finding that the particular combination of
  - (i) cartilage extract obtainable by enzymatic proteolytic hydrolysis;
  - (ii) grape seed extract containing hydrophilic antioxidants; and
  - (iii) lycopene or tomato extract containing lipophilic antioxidants, including lycopene;exerts synergistic effects in increasing collagen synthesis and in reducing free radical mediated oxidation.
- 3.1 However, the technical contents of the description in **no way support** the assumption that
  - the combination of any given compound extractable from cartilage by enzymatic proteolytic cleavage, with any given hydrophilic antioxidant extractable from grape seed, and lycopene, alone or in combination with other lipophilic antioxidants from natural sources, or

the combination of cartilage extract obtainable by enzymatic proteolytic cleavage with any given hydrophilic antioxidant extractable from grape seed, and lycopene, alone or in combination with other lipophilic antioxidants from natural sources,

will provide synergistic effects as indicated above.

- 3.2 Thus, as far as they encompass combinations others than that specified in item 3 above, the present claims 1-19, 21-44 are not adequately supported by the description. Said claims do therefore not meet the requirements of Art. 6 PCT (see Guidelines for Examination C-III, 6.3).
4. Due to the objections raised above, for the purpose of this report claims 1-19, 21-44 have been read as if they were restricted to compositions/methods/uses comprising/involving the combination specified in item 3 above.
- 4.1 Thus, only a partial opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability of claims 1-19, 21-44 will be established.
5. Claims 42-44 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

#### **Re Item V**

**Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

6. Reference is made to the following documents:

D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1998, no. 01 & JP 09 241637 A

D2: EP-A-0 659 402

7. Claims 1-19, 21-44 read as indicated in item 4 above meet the requirements of Art. 33(2) and 33(3) PCT because their subject matter is new and inventive over the prior art documents cited in the search report (see below).

**7.1 Novelty:**

None of the prior art documents cited in the search report discloses a composition comprising

- (i) cartilage extract obtainable by enzymatic proteolytic hydrolysis;
- (ii) grape seed extract containing hydrophilic antioxidants; and
- (iii) lycopene or tomato extract containing lipophilic antioxidants, including lycopene.

**7.2 Inventive step:**

D1 and D2 (see e.g. claims 1-5 in conjunction with p. 3, l. 23-25) teach that the combined use of hydrophilic antioxidants and lipophilic antioxidants produces synergistic effect in reducing oxidative damage. Said documents represent the closest prior art.

The present invention is based on the finding that the combination of components (i), (ii) and (iii) as specified in item 7.1 above exerts synergistic effects in increasing collagen synthesis and in reducing free radical mediated oxidation. [The experimental data of the application evidence that the combination of (i), (ii) and (iii) provides synergy in collagen synthesis and that it performs better than the combination of (ii) and (iii) in reducing oxidative damage induced by UV exposure].

Starting from D1-D2, the problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to provide improved means for the reduction of oxidative damage produced by free radicals.

Nothing in D1-D2 either alone or in combination with other prior art documents cited in the search report, suggests that the combination of (i), (ii) and (iii) as specified in item 7.1 above would solve the problem posed, and even provide synergistic effects in increasing collagen synthesis.

6. Claims 1-19 and 21-41 satisfy the criterion set forth in Art. 33(4) PCT because their subject matter is susceptible of industrial application.
7. For the assessment of the present claims 42-44 on the question whether they are

**INTERNATIONAL PRELIMINARY**

International application No. PCT/DK01/00331

**EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

---

industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

98  
16

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                        |                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Archivo de referencia del solicitante o del agente<br><b>17790PC01</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>PARA ACCION POSTERIOR</b><br>Ver Notificación de Transmisión del Informe del Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416) |                                                    |
| Solicitud internacional No.<br><b>PCT/DK01/00331</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Fecha de presentación internacional (día/mes/año)<br><b>10/5/01</b>                                                                    | Fecha de prioridad (día/mes/año)<br><b>12/5/00</b> |
| Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP<br><b>A61K35/32</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                        |                                                    |
| Solicitante:<br><b>OLSON, Bengt Krister</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                        |                                                    |
| <p>1 Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 36.</p> <p>2 Este INFORME consiste en un total de <u>8</u> hojas, incluyendo esta carátula.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Este informe también se acompaña de los ANEXOS, esto es, hojas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT</p> <p>Estos anexos consisten en un total de <u>5</u> hojas.</p>                                                                                                                                                       |                                                                                                                                        |                                                    |
| <p>3 Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Base del informe</p> <p>II <input type="checkbox"/> Prioridad</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Carencia de unidad de la invención</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Declaración razonada según artículo 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Ciertos documentos citados</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Ciertos defectos en la solicitud internacional</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</p> |                                                                                                                                        |                                                    |
| Fecha de presentación de la solicitud de examen<br><b>11/12/01</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Fecha de completamiento de este informe<br><b>08.07.2002</b>                                                                           |                                                    |
| Nombre y dirección de correo del IPEA/JP<br><b>Oficina Europea de Patentes<br/>D-80298 Munich<br/>Fax No. 49 89 2399-4465</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Funcionario autorizado<br><b>Peris Antoli, B</b><br><br>Teléfono No. <b>49 89 2399-8476</b>                                            |                                                    |

## INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/DK01/00331

### I. Base del Informe

- 1 Con relación a los elementos de la solicitud Internacional: (Las hojas de reemplazo que se han suministrado a la Oficina de Recepción en respuesta a una invitación según el artículo 14, se denominan en este informe como "presentadas originalmente" y no se anexan a este informe ya que ellas no contienen reformar (Regla 70.16 y 70.17)):

#### Descripción, páginas:

1-27 Como fueron originalmente presentadas

#### Reivindicaciones Nos.:

1-44 Como recibidas en 30/04/2002 con la comunicación de 30/04/2002

#### Dibujos, hojas:

1/4-4/4 Como fueron originalmente presentados

- 2 Con relación al idioma, todos los elementos antes marcados se pusieron a disposición y se suministraron a esta autoridad en el idioma en el que se presentó la solicitud internacional, a menos que se indique de otra forma en este punto.

Estos elementos se pusieron a disposición o se suministraron a esta autoridad en el siguiente idioma \_\_\_\_\_, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para fines de investigación internacional (según la Regla 23.1(b)).  
☐ el idioma de publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 48.3(b)).  
☐ el idioma de la traducción suministrada para fines de examen preliminar internacional (bajo la Regla 55.2 y/o 55.3)

- 3 Con relación a cualquier nucleótido y/o secuencia amino ácida revelada en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo con base en la lista de secuencia:

- ☐ contenida en la solicitud internacional en forma escrita  
☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma leíble en computador  
☐ suministrado con posterioridad a esta autoridad en forma escrita  
☐ suministrado luego a esta autoridad en forma leíble en computador  
☐ la declaración que el listado de secuencia escrito suministrado posteriormente no va más allá de lo revelado en la solicitud internacional tal como fue presentada  
☐ la declaración que la información grabada en forma leíble en computador es idéntica a la lista de secuencia escrita que ha sido suministrada

- 4 las modificaciones han dado como resultado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas \_\_\_\_\_.  
☐ las reivindicaciones, Nos. \_\_\_\_\_.  
☐ los dibujos, hojas/fig. \_\_\_\_\_.

- 5 ☒ Este informe ha sido establecido como si (parte de) las modificaciones no han sido hechas, ya que se consideran que han ido más allá de lo revelado que fue presentado, como se indica en la casilla suplementaria (Regla 70.2 (c)). (Cualquier hoja de reemplazo que contenga tales modificaciones deben citarse en el ítem 1 y anexarse a este informe)  
**Ver hoja adjunta**

- 6 Observaciones adicionales, si fuera necesario:

## INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/DK01/00331

### III. No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial:

1 Las preguntas sobre si la invención reivindicada aparece ser novedosa, tener nivel inventivo (no ser obvio), o tener aplicabilidad industrial no han sido examinadas con respecto de:

- ☐ la solicitud internacional completa
- ☒ reivindicaciones Nos. 1-19, 21-44 (en parte); 42-44 (aplicación industrial)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 42-44 (aplicación industrial) se refieren a la siguiente materia la cual no requiere examinación preliminar internacional (se especifica):

**Ver hoja separada**

- ☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indican los siguientes elementos particulares) o dichas reivindicaciones Nos. 1-19, 21-44 (en parte), son tan confusos que no ha sido posible establecer una opinión significativa (se especifica):

**Ver hoja adjunta**

- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. \_\_\_\_\_, han sido tan inadecuadamente sustentadas en la descripción que no ha sido posible establecer una opinión significativa.
- ☐ ningún informe de búsqueda internacional ha sido establecido para dichas reivindicaciones Nos. \_\_\_\_\_.

2 No ha sido posible expedir un examen preliminar internacional significativo, debido a la falla de los listados de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos para cumplir con los estándares estipulados en el anexo C de las Instrucciones - Administrativas:

- ☐ el formato escrito no fue allegado o no cumple con los estándares
- ☐ el formato leíble de computador no fue allegado o no cumple con los estándares

98  
164

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/DK01/00331

V. Declaración razonada bajo el artículo 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: citas y explicaciones que apoyan tal declaración.

1 Declaración

Novedad (N)

Reivindicaciones 1-19, 21-44 (en parte) Si  
Reivindicaciones \_\_\_\_\_ No

Nivel inventivo (IS)

Reivindicaciones 1-19, 21-44 (en parte) Si  
Reivindicaciones \_\_\_\_\_ No

Aplicación industrial (IA)

Reivindicaciones 1-19, 21-44 (en parte); 42-44 (ver hoja separada) Si  
Reivindicaciones \_\_\_\_\_ No

2 Citas y explicaciones

Ver hoja separada

**EXAMEN PRELIMINAR DE CONSULTA  
INTERNACIONAL  
HOJA SEPARADA**

---

Aplicación internacional No PCT/DK01/00331

**Re ítem I  
Bases del reporte**

1. La reivindicación 20 radicada con la carta 30.04.02, adiciona materia, que se extiende mas allá el contenido de la solicitud radicada, contrariamente al Artículo 34(2) b PCT, porque en la solicitud original (ver p. 9, l. 19-29 o reivindicación 27), los términos: "tocoferoles", "Fitoenos" y "Fitofluenos" son solamente divulgados en conexión con fuentes naturales de antioxidantes lipofílicos que comprenden un determinado porcentaje de los mencionados y otros componentes. Dicha divulgación no provee bases para la generalización .
2. Por lo tanto, de acuerdo con la regla 70.2 © PCT, este reporte ha sido establecido como si la referida reivindicación 20 no hubiera sido radicada.

**Re ítem III**

**No establecimiento de opinión con respecto a la novedad , al nivel inventivo y la aplicabilidad industrial.**

3. De acuerdo con lo descrito (ver p.ej. p. 2, l. 3-7; p. 4, l. 15-24; p.5, 13-24; p. 6, l. 6-11; p. 6, l. 22-25) y soportado con los datos experimentales de la presente solicitud, la presente invención está basada en el hallazgo de una combinación particular de:
  - (i) Extracto de cartílago obtenido por hidrólisis enzimática proteolítica,
  - (ii) Extracto de semillas de uva, que contiene antioxidantes hidrofílicos
  - (iii) Licopeno o extracto de tomate que contiene antioxidantes lipofílicos incluyendo licopeno.

**EXAMEN PRELIMINAR DE CONSULTA  
INTERNACIONAL  
HOJA SEPARADA**

---

Aplicación Internacional No PCT/DK01/00331

ejerciendo efectos sinérgicos, incrementando la síntesis de colágeno y reduciendo la oxidación mediada por radicales libres.

- 3.1. Sin embargo, los contenidos técnicos de la descripción de ninguna manera soportan el supuesto que:

La combinación de cualquier compuesto dado, extraíble de cartílago por descomposición enzimática proteolítica, con cualquier compuesto dado antioxidante hidrofílico extraído de las semillas de uvas, y licopeno sólo en combinación con otros antioxidantes lipofílicos, de fuentes naturales, o

la combinación de extracto de cartílago obtenido por degradación enzimática proteolítica, con un compuesto dado antioxidante hidrofílico extraído de las semillas de uva y licopeno sólo o en combinación con otros antioxidantes lipofílicos de fuentes naturales, proveerán efectos sinérgicos como los indicados anteriormente.

- 3.2 Por lo tanto, en tanto que ellos enmarcan otras combinaciones, aparte de las especificadas en el numeral 3 anterior, las presentes reivindicaciones 1-19, 21-44, no están adecuadamente soportadas por la descripción. Dichas reivindicaciones no satisfacen los requerimientos del Artículo 6 PCT (Ver las guías para examinación C-III, 6,3).

- 4 Debido a las objeciones citadas anteriormente, para el propósito de éste reporte de las reivindicaciones 1-19, 21-44 han sido leídas como si ellas estuvieran restringidas a la composición / métodos / usos comprendidos / que involucran las combinaciones especificadas en el numeral 3.

**EXAMEN PRELIMINAR DE CONSULTA**

Aplicación internacional No PCT/DK01/00331

**INTERNACIONAL  
HOJA SEPARADA**

---

- 4.1. Así, solamente será establecida una opinión parcial respecto de la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial de las reivindicaciones 1-19, 21-44.
5. Considera ésta autoridad que las reivindicaciones 42-44 relacionadas con la materia objeto de examen están comprendidas por las disposiciones de la regla 67.1 (iv) PCT. En consecuencia no será formulada una opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia de éstas reivindicaciones (artículo 34 (4)(a)(i)PCT).

**Re Item V**

**Declaración razonada bajo el artículo 35(2) con respecto a la novedad, al nivel inventivo o la aplicabilidad industrial. Citas y explicaciones que soportan esta exposición.**

6. Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1998, no. 01 & JP 09 241637 A

D2: EP-A-0 659 402

7. Las reivindicaciones 1-19, 21-44 leídas como lo indica el numeral 4, satisfacen los requerimientos del artículo 33 (2) y 33(3)PCT, por que su materia es nueva e inventiva frente a los anteriores documentos citados en el reporte de búsqueda del (ver abajo).

**7.1 Novedad**

Ninguno de los documentos anteriores citados en el reporte de búsqueda del estado del arte, divulga una composición que comprenda:

**EXAMEN PRELIMINAR DE CONSULTA  
INTERNACIONAL  
HOJA SEPARADA**

---

Aplicación internacional No PCT/DK01/00331

- i) Extracto de cartílago obtenido por hidrólisis enzimática proteolítica,
- ii) Extracto de semillas de uva, que contiene antioxidantes hidrofílicos,
- iii) Licopeno o extracto de tomate que contiene antioxidantes lipofílicos incluyendo licopeno.

**7.2 Nivel inventivo**

D1 y D2 (ver p.ej. las reivindicaciones 1-5 en unión con p.3, l. 23-25) enseñan que el uso combinado de antioxidantes hidrofílicos y antioxidantes lipofílicos produce un efecto sinérgico en la reducción del daño oxidativo. Dichos documentos representan lo mas cercano al arte previo.

La presente invención está basada en el hallazgo de una combinación de componentes (i), (ii), y (iii) como se especifico en el numeral 7.1, que ejerce efectos sinérgicos en el incremento de la síntesis de colágeno y la reducción de la oxidación mediada por radicales libres.

[Los datos experimentales de la solicitud evidencian que la combinación de (i), (ii) y (iii) proporcionan sinergia en la síntesis de colágeno y que su desempeño es mejor que el de la combinación de (ii) y (iii) en la reducción del daño oxidativo inducido por la exposición a rayos UV.

A partir de D1 y D2 el problema a ser resuelto por la presente invención, puede ser orientado a proveer mejoras, por medio de la reducción del daño oxidativo producido por radicales libres

Nada en D1 y D2 ni solos o en combinación con otros documentos citados en el reporte de búsqueda del estado del arte , sugiere que la combinación de (i), (ii) y (iii) como se especificó en el numeral 7.1 podría resolver el problema

104  
10

**TRADUCCION DEL NUEVO CAPITULO  
REIVINDICATORIO, EL CUAL DEBE SER TENIDO  
COMO EL CAPITULO REIVINDICATORIO DE LA  
PRESENTE SOLICITUD EN FASE NACIONAL EN  
COLOMBIA**

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- i) Extracto de cartílago obtenido por degradación enzimática proteolítica o formas sintéticas de compuestos extraíbles de cartílago por degradación enzimática proteolítica.
- ii) Uno o más antioxidantes hidrofílicos de los cuales los antioxidantes hidrofílicos son extraíbles de semillas de uva o son formas sintéticas de antioxidantes extraíbles de las semillas de uva; y
- iii) uno o más antioxidantes lipofílicos, de los cuales uno de ellos es licopeno, donde los antioxidantes lipofílicos son extraíbles de fuentes naturales o son formas sintéticas de antioxidantes lipofílicos extraíbles de fuentes naturales.

2 Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:

- i) Extracto de cartílago obtenible por degradación enzimática proteolítica
- ii) Uno o más antioxidantes hidrofílicos los cuales son extraíbles de la semillas de uva u obtenidos por procesos de síntesis
- iii) uno o más antioxidantes lipofílicos, de los cuales uno es licopeno, en donde los antioxidantes lipofílicos son extraíbles de fuentes naturales u obtenidos por procesos sintéticos.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:

- i) Extracto de cartílago obtenido por degradación enzimática proteolítica
- ii) Uno o más antioxidantes hidrofílicos los cuales son extraíbles de la semillas de uva u obtenidos por procesos de síntesis
- iii) uno o más antioxidantes lipofílicos, de los cuales uno es licopeno, en donde los antioxidantes lipofílicos son extraíbles de fuentes naturales u obtenidos por procesos sintéticos.

4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde el extracto de cartílago y los componentes extraíbles del cartílago, comprenden glucosaminoglicanos seleccionados del grupo y consistentes en un éster de condroitina, un éster de queratano, ácido hialurónico o un éster del mismo, un éster de dermatano.

Heparina, un éster de la heparina y epímeros y polímeros de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente unido a un péptido.

5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual los glucosaminoglicanos, son seleccionados a partir de un grupo consistente en condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato y sulfato de queratano, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente unido a un péptido.

6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el extracto de cartílago contiene sulfato de condroitina opcionalmente unido a un péptido.

7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene menos del 1% peso/peso de colágeno, preferiblemente menos que el 0.5%, particularmente preferible menos del 0.1% y siendo lo mejor que esté libre de colágeno.

8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos son extraídos del grupo consistente de corteza de pino, *Vitis vinífera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silybum marianum*.

9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos contienen un procianidol oligomérico.

10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos son extraídos de semillas de uva de *Vitis vinífera*.

11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos provienen de un extracto de semillas de uva.

12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la cual uno o más antioxidantes hidrofílicos son extraíbles de *Vitis vinífera*.

196  
24  
1

El ácido nucleico acorde con la presente invención se puede seleccionar sobre la base de la hibridación de dicho ácido nucleico. La capacidad de dos preparaciones de ácido nucleico de cadena simple para hibridarse entre sí constituye una medida de la complementariedad de sus secuencias de nucleótidos, por ejemplo, el apareamiento de bases entre los nucleótidos, tal como A-T, G-C, etc. Por consiguiente, la invención también se relaciona con ácidos nucleicos, y los complementos de los mismos, que se hibridizan con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como la que se muestra en la Figura 1. Una secuencia de nucleótidos que se hibridiza con esta última secuencia tendrá una cadena de ácido nucleico complementaria, o que actúa como templado, para una de ellas en presencia de una polimerasa (es decir, una enzima de síntesis de ácidos nucleicos apropiada). La presente invención incluye ambas cadenas del ácido nucleico, por ejemplo, una cadena en el sentido del marco de lectura y una cadena antisentido.

Se pueden elegir condiciones de hibridación que permitan seleccionar ácidos nucleicos que contengan la cantidad deseada de complementariedad de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de la Figura 1. Un ácido nucleico que se pueda hibridizar con dicha secuencia posee, preferentemente, por ejemplo un 85% aproximadamente, con mayor preferencia un 90%, 92% y con mayor preferencia aún 95%, 97% o 100% de complementariedad entre las secuencias. La presente invención se relaciona particularmente con secuencias de ácido nucleico que se hibridizan con la secuencia de nucleótidos que se muestra en el Figura 1 bajo condiciones poco o muy severas.

Los ácidos nucleicos que se hibridizan con las secuencias del IFN- $\beta$ 2 se pueden seleccionar de numerosas maneras. Por ejemplo, se pueden incubar

transferidos (es decir, matrices que contienen ácidos nucleicos), ordenamientos en chips y otras matrices que comprendan los ácidos nucleicos de interés, en una solución de prehibridación (SSC 6X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml, solución de Denhardt 5X y formamida 50%), a 30 °C, durante la noche y luego se pueden hibridizar con una sonda de oligonucleótidos detectable (véase más adelante) en una solución de hibridación (por ejemplo, SSC 6X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y formamida 50%), a 42 °C, durante la noche de acuerdo con los procedimientos conocidos. Los transferidos se pueden lavar bajo condiciones de gran severidad que permitan, por ejemplo, menos que un 5% de faltas de coincidencia (por ejemplo, dos lavados en SSC 0,1X y SDS 0,1% durante 30 min a 65 °C), es decir, se seleccionarán secuencias que poseen un 95% o más de identidad de secuencia. Otros ejemplos no limitantes de condiciones de gran severidad incluyen un lavado final a 65 °C en una solución amortiguadora acuosa que contiene NaCl 30 mM y SDS 0,5%. Otro ejemplo de condiciones de gran severidad consiste de hibridación en SDS 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 7, EDTA 1 mM a 50 °C, por ejemplo, durante la noche, seguido de uno o varios lavados con una solución de SDS 1% a 42 °C.

En tanto los lavados de gran severidad pueden permitir menos que un 5% de falta de coincidencia, las condiciones de lavado de baja severidad o relajado (por ejemplo, dos lavados en SSC 0,2X y SDS 0,5% durante 30 min a 37 °C) permiten hasta un 20% de falta de coincidencia. Otro ejemplo no limitante de condiciones de baja severidad incluye un lavado final a 42 °C en una solución amortiguadora que contiene NaCl 30 mM y SDS 0,5%. El lavado y la hibridación también se pueden llevar a cabo como se describe en Sambrook

et al., *Molecular Cloning*, 1989, Capítulo 9.

La hibridación también se puede basar en el cálculo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del híbrido formado entre la sonda y su blanco, como se describe en Sambrook et al. En general, la temperatura  $T_m$  a la cual un oligonucleótido corto (que contiene 18 nucleótidos o menos) se fundirá de la secuencia de interés está dada por la siguiente ecuación:  $T_m = (\text{cantidad de A y T} \times 2^\circ\text{C} + (\text{cantidad de C y G}) \times 4^\circ\text{C})$ . Para moléculas más grandes, la  $T_m = 31,5 + 16,6\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41(\%GC) - 600/N$ , donde  $[\text{Na}^+]$  es la concentración molar de iones de sodio, %GC es el porcentaje de pares de bases GC en la sonda y N es la longitud. La hibridación se puede llevar a cabo a varios grados por debajo de esta temperatura con el fin de asegurar que la sonda y el blanco se hibridicen entre sí. Se pueden permitir faltas de coincidencia disminuyendo aún más la temperatura.

Se pueden seleccionar condiciones severas para aislar las secuencias, y los complementos de las mismas, que tienen, por ejemplo, al menos un 95%, 97%, 93%, 99% aproximadamente de complementariedad de nucleótidos entre la sonda (por ejemplo, un oligonucleótido de un IFN- $\beta$ 2) y el ácido nucleico blanco.

De acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico o el polipéptido puede comprender una o varias diferencias en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se muestra en las Figuras 1 y 2. Los cambios o las modificaciones en la secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos se pueden efectuar utilizando cualquiera de los métodos disponibles, incluyendo mutagénesis dirigida o aleatoria.

El ácido nucleico que codifica un IFN- $\beta$ 2 de mamífero, tal como un IFN-

$\beta 2$  humano, acorde con la invención puede comprender nucleótidos que aparecen en un gen natural, por ejemplo, polimorfismos naturales, alelos normales o mutantes (de nucleótidos o aminoácidos), mutaciones que se descubren en una población natural de mamíferos, tal como seres humanos, monos, cerdos, ratones, ratas o conejos. El término "natural", significa que el ácido nucleico se puede obtener de una fuente natural, por ejemplo, tejido y células animales, fluidos corporales, células de cultivos tisulares, muestras forenses. Las mutaciones naturales incluyen supresiones (por ejemplo, un extremo amino o carboxilo terminal truncado), sustituciones, inversiones o adiciones de secuencias de nucleótidos. Estos genes pueden ser detectados y aislado por hibridación de ácidos nucleicos utilizando métodos conocidos por el especialista en el arte. La secuencia de nucleótidos que codifica un IFN- $\beta 2$  de mamífero de la invención puede contener los codones presentes en un ADNc, un transcripto o un gen natural, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, o puede contener codones degenerados que codifican las mismas secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, puede ser conveniente cambiar los codones en la secuencia con el fin de optimizar la secuencia para su expresión en el huésped deseado.

El ácido nucleico acorde con la presente invención puede comprender, por ejemplo, ADN, ARN, ácidos nucleicos sintéticos, ácidos nucleicos de péptidos, nucleótidos modificados o mezclas de los mismos. El ADN puede ser de cadena simple o doble. Los nucleótidos que comprenden el ácido nucleico se pueden unir mediante diversos enlaces conocidos, por ejemplo, enlaces éster, sulfamato, sulfamida, fosforotioato, fosforamidato, metilfosfonato, carbamato, etc., según el propósito deseado como por ejemplo resistencia a

nucleasas, tal como RNAasa H, mayor estabilidad *in vivo*, etc. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N°: 5.378.825.

Se puede efectuar numerosas modificaciones en los ácidos nucleicos, tal como unión de marcadores detectables (avidina, biotina, elementos radioactivos), grupos que mejoren la hibridación, detección o estabilidad. Los ácidos nucleicos también se pueden unir a soportes sólidos, por ejemplo, nitrocelulosa, microesferas magnéticas o paramagnéticas (por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N°: 5.411.863; la Patente de EE.UU. N°: 5.543.289; que comprenden, entre otros, elementos ferromagnéticos, supermagnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos, óxido de hierro y polisacáridos), nylon, agarosa, celulosa diazotizada, microesferas sólidas de látex, poliacrilamidas, etc., utilizando el método deseado. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N°: 5.470.967; 5.476.925; 5.478.893.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con sondas de oligonucleótidos o de ácido nucleico. Dichas sondas de oligonucleótidos o de ácido nucleico se pueden usar, por ejemplo, para detectar, cuantificar o aislar el ácido nucleico de un IFN- $\beta$ 2 de mamífero en una muestra de prueba o para identificar homólogos del IFN- $\beta$ 2. En una realización preferida, los ácidos nucleicos se pueden usar como sondas de oligonucleótidos, por ejemplo en una PCR, una expresión diferencial, en chips de genes (por ejemplo, Affymetrix GeneChips; Patente de EE.UU. N°: 5.143.854, Patente de EE.UU. N°: 5.424.186; Patente de EE.UU. N°: 5.874.219; PCT WO 92/10092; PCT WO 90115Q70) y otros métodos disponibles. La detección es conveniente para numerosos fines, incluyendo investigación, de diagnóstico y forenses. Para fines de diagnóstico, resulta deseable identificar la presencia o cantidad de una

secuencia de ácido nucleico en una muestra, donde dicha muestra se obtiene de tejidos, células, fluidos corporales, etc. En un método preferido, la presente invención se relaciona con un método para detectar un ácido nucleico que comprende, poner el ácido nucleico blanco presente en una muestra de prueba en contacto con un oligonucleótido bajo condiciones efectivas para la hibridación entre el blanco y el oligonucleótido; y detectar la hibridación. El oligonucleótido acorde con la invención también se puede usar en la amplificación de ácidos nucleicos sintéticos, tal como PCR (por ejemplo, Saiki et al., *Science*, 241: 53, 1983; Patente de EE.UU. N°: 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Nueva York, 1990); expresión diferencial (Véase, por ejemplo, Liang et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 3269-3275, 1993; Patente de EE.UU. N°: 5.599.672; WO 97/18454); PCR lineal; u otros métodos de amplificación.

La detección se puede llevar a cabo en combinación con oligonucleótidos correspondientes a otros genes, por ejemplo, genes comprometidos en la transducción de señales, el crecimiento, cáncer, apoptosis o cualquiera de los genes ya mencionados o que se describirán más adelante, etc. Los oligonucleótidos también se pueden usar para evaluar mutaciones, por ejemplo, usando la tecnología de reparación de ADN con faltas de coincidencias que se describe en la Patente de EE.UU. N°: 5.683.577; la Patente de EE.UU. N°: 5.656.430; Wu et al., *Proc. Natl. Acad Sci.*, 89: 8779-9783, 1992.

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden comprender cualquier secuencia de nucleótidos continua de la Figura 1 o un complemento de la misma o cualquiera de las secuencias, o los complementos de las

mismas, descritas previamente. Estos oligonucleótidos (ácido nucleico) acordes con la presente invención pueden ser de cualquier tamaño deseado, por ejemplo, de aproximadamente 10-200 nucleótidos, 12-100, 12-50, 12-25, 14-16, al menos 15 aproximadamente, al menos 20 aproximadamente, al menos 25 aproximadamente, al menos 30 aproximadamente, etc. Los oligonucleótidos pueden contener nucleótidos que no son naturales, por ejemplo, inosina, AZT, 3TC, etc. Los oligonucleótidos pueden presentar un 100% de identidad o complementariedad con la secuencia de la Figura 1 o bien, puede presentar faltas de coincidencia o sustituciones de nucleótidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones. De acuerdo con la presente invención, el oligonucleótido puede comprender un juego de elementos, donde dicho juego de elementos incluye la solución amortiguadora deseada (por ejemplo, fosfato, Tris, etc), composiciones de detección, etc. El oligonucleótido puede estar marcado, o no, con las marcas radioactivas o no radioactivas conocidas en el arte.

Otro aspecto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que es única para un IFN- $\beta$ 2 de mamífero. El término secuencia única de un IFN- $\beta$ 2, hace referencia a un orden de nucleótidos definido que aparece en el IFN- $\beta$ 2, por ejemplo, en las secuencias de nucleótidos de la Figura 1, pero que aparecen raramente o con poca frecuencia en otros ácidos nucleicos, especialmente no en un ácido nucleico animal, preferentemente de mamífero, tal como humano, de rata, de ratón, etc. Las secuencias únicas de nucleótidos incluyen las secuencias, o los complementos de las mismas, que codifican los aminoácidos KHFFGTV, IIFQQRQV, KSLSP, FRANI, AEKLSGT, CLFFVFS y QGRPLNDMKQELTYEFRSPR, y fragmentos de los mismos, que se muestran

en la Figura 1. Dichas secuencias se pueden usar como sondas en cualquiera de los métodos descritos en este documento o incorporados al mismo a modo de referencia. Se incluyen las secuencias de nucleótidos orientadas en el sentido del marco de lectura y también las que son antisentido. El ácido nucleico único acorde con la presente invención se puede definir de manera rutinaria. Un ácido nucleico que comprende dicha secuencia única se puede usar como sonda de hibridación para identificar la presencia de, por ejemplo, un IFN- $\beta$ 2 humano o de ratón, en una muestra que comprende una mezcla de ácidos nucleicos, por ejemplo, en una transferencia Northern. La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones de gran severidad (véase la descripción previa) para seleccionar ácidos nucleicos (y los complementos de los mismos que pueden contener la secuencia de codificación) que presenten al menos un 93% de identidad (es decir, complementariedad) con la sonda, p

## NUEVO INTERFERÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los interferones son proteínas de señalamiento intercelular que cumplen una función importante en diversos procesos biológicos que comprenden, por ejemplo, proliferación celular y la respuesta inmune.

### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

En la Figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos del interferón-beta-2 humano, incluyendo las secuencias 5' y 3'.

En la Figura 2 se muestra la secuencia de aminoácidos del interferón-beta-2 humano. Se muestra también la traducción del marco de lectura abierto para IFN- $\beta$ 2. La secuencia señal se muestra con letras cursivas y los dos sitios potenciales de N-glicosilación, así como las cisteínas que pueden formar enlaces disulfuro, se muestran resaltados y subrayados.

En la Figura 3 se muestran las estructuras tridimensionales de los interferones de tipo I. Los tres IFN comparten el motivo de manojos 5-helicoidales comunes que es característico de los IFN de tipo I humanos. Además, el IFN- $\beta$ 1b y el IFN- $\beta$ 2 son similares entre sí en cuanto a la ubicación de los sitios potenciales de N-glicosilación y los enlaces disulfuro propuestos. La secuencia de aminoácidos única C-terminal solamente está presente en el IFN- $\beta$ 2.

La Figura 4 es una alineación de proteínas que permite comparar el interferón-beta-2 humano con otros tipos de interferón.

La Figura 5 es una comparación filogenética del IFN- $\beta$ 2 con los interferones de tipo I y de tipo II humanos. Sobre la base del patrón de

conservación de cisteínas, los sitios potenciales de N-glicosilación y un análisis filogenético, se observa que el IFN- $\beta$ 2 está más relacionado con el IFN- $\beta$  que con cualquiera de los demás interferones.

En la Figura 6 se muestra un ensayo con el informante ISRE-luciferasa dependiente de IFN tipo I para el interferón-beta-2 humano.

En la Figura 7 se muestran los resultados de la inhibición de la unión del IFN- $\beta$ 2 al receptor del interferón de tipo I humano con un anticuerpo policlonal anti-IFN- $\beta$ 2.

En la Figura 8 (A y B) se muestra el efecto de los interferones sobre la proliferación celular.

La Figura 9 ilustra las actividades antiproliferativas del IFN- $\beta$ 2 sobre células humanas.

En la Figura 10 se muestra la actividad antiviral de los interferones sobre células humanas.

En la Figura 11 se muestra la competencia entre el IFN- $\alpha$ 2 y el IFN- $\beta$ 2 por la unión al receptor interferón de tipo I.

La Figura 12 es la secuencia de nucleótidos genómica 5' del IFN- $\beta$ 2 humano.

La Figura 13 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región 5' del IFN- $\beta$ 2 humano.

La Figura 14 es la secuencia de polipéptidos 5' del IFN- $\beta$ 2 humano.

En la Figura 15 se muestra la antiproliferación de astrocitos de fetos humanos como respuesta al IFN- $\beta$ 2. (A) es el cultivo de cerebro de feto 1 sin estimulación y (B) es el cultivo cerebro de feto 1 estimulado con EGF; (C) es el cultivo de cerebro de feto 2 sin estimulación y (D) es el cultivo de cerebro de

feto 2 estimulado con EGF.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se han identificado nuevas secuencias de ácidos nucleicos, polipéptidos y reguladores de ácido nucleico de las mismas, que codifican el interferón-beta-2 ("IFN- $\beta$ 2"), una clase de polipéptidos de señalamiento intercelular que ejerce múltiples efectos biológicos, incluyendo, por ejemplo, acción antitumoral, acción antiviral y acción inmunoreguladora. Véase, por ejemplo, Cirelli y Trying, *Clin. Immunother.* 3, 27-87, 1995. El polipéptido del interferón de la presente invención, fragmentos del mismo y derivados del mismo, presentan una o varias de las siguientes actividades biológicas, incluyendo, por ejemplo, bioactividad de IFN- $\beta$ 2 y una actividad inmunogénica específica de IFN- $\beta$ 2.

Una "bioactividad de IFN- $\beta$ 2" se refiere, por ejemplo, a los efectos funcionales, tales como, alteraciones en las membranas celulares, regulación anti-oncogénica, actividad antitumoral, actividad antiviral, inhibición del crecimiento de células o actividad anticrecimiento, anti-proliferación, aumento de la citotoxicidad de linfocitos, actividad inmunoreguladora, inducción o inhibición de la diferenciación de las células de interés, activación de macrófagos, subsensibilización de oncogenes, etc.; efectos inmunológicos, tales como, reducción de la formación de anticuerpos, aumento de los componentes de la membrana celular (complejo mayor de histocompatibilidad, receptor Fc, microglobulina- $\beta$ 2), modulación de la inmunidad mediada por células, incremento en la producción de citoquinas (por ejemplo, interleuquinas), aumento de los efectos citotóxicos de células T, aumento de los efectos de macrófagos y aumento de muerte natural; actividad de unión al receptor de interferón, tal como unión al receptor de interferón de tipo I, en

particular la cadena IFNAR2c del mismo, y efectos celulares estimulados por dicha unión al receptor; activación y/o asociación con las moléculas de señalamiento intracelular, tal como Jak1, Tyk2, Stat1, Stat2, IRS-1, IRS-2, Crkl, CrklI, Vav, etc., y otros efectos posteriores (por ejemplo, MAPK). Véase, por ejemplo, Platanias y Fish, *Exp. Hematology*, 27: 1583-1592, 1999.

La frase "actividad anti-proliferativa", se refiere a que el IFN- $\beta$ 2 acorde con la presente invención inhibe el crecimiento de las células o induce la apoptosis. Esto se ilustra más adelante en los ejemplos. Véase, además, las Figuras. 8, 9 y 15. Por ejemplo, el IFN- $\beta$ 2 inhibe la proliferación de astrocitos en el cerebro. Esta actividad es de utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de la esclerosis múltiple, dado que la proliferación de astrocitos puede conducir a la inflamación neuronal característica de la enfermedad. Al inhibir el crecimiento de los astrocitos, el IFN- $\beta$ 2 reduce la inflamación y alivia los síntomas de la enfermedad. Por consiguiente, la presente invención se relaciona con métodos de tratamiento de la esclerosis múltiple que comprenden la administración de cantidades de IFN- $\beta$ 2 que son efectivas para inhibir la proliferación de astrocitos y/o para reducir la inflamación.

Una "actividad inmunogénica específica de IFN- $\beta$ 2" significa, por ejemplo, que un polipéptido IFN- $\beta$ 2 genera una respuesta inmunológica que es selectiva o preferencial para IFN- $\beta$ 2, por ejemplo, una respuesta inmunológica que sea selectiva para el IFN- $\beta$ 2 de mamíferos. Por consiguiente, la estimulación de anticuerpos, células T, macrófagos, células B, células dendríticas, etc., con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre un IFN- $\beta$ 2 de mamífero, por ejemplo, el IFN- $\beta$ 2 de la Figura 2, constituye una actividad inmunogénica específica. Estas respuestas se pueden medir

mediante pruebas de rutina.

El IFN- $\beta$ 2 es un polipéptido de longitud completa de mamífero que comprende una secuencia de aminoácidos que se puede obtener de una fuente natural y que presenta una o varias de las bioactividades mencionadas previamente. Puede tener la secuencia que se muestra en la Figura 2, con un marco de lectura abierto que comienza con un codón de inicio y finaliza con un codón de terminación. Incluye secuencias normales naturales, mutantes naturales y polimórficas naturales, incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), etc. Las fuentes naturales incluyen, por ejemplo, células vivas, tales como las que se obtienen de tejidos u organismos completos, líneas celulares cultivadas, incluyendo líneas celulares primarias e inmortalizadas, tejidos de biopsias, etc.

La presente invención también se relaciona con fragmentos de un IFN- $\beta$ 2 de mamífero. Se prefiere que los fragmentos sean "biológicamente activos". El término "biológicamente activos" significa que el fragmento de polipéptido presenta actividad en un sistema viviente o en componentes de un sistema viviente. Las actividades biológicas incluyen las que ya se mencionaron, por ejemplo, bioactividad IFN- $\beta$ 2 y actividad inmunogénica específica de IFN- $\beta$ 2. Los fragmentos se pueden preparar de acuerdo con cualquier método deseado, incluyendo, síntesis química, manipulación mediante ingeniería genética, productos de clivaje, etc. Un fragmento biológicamente activo de un IFN- $\beta$ 2 incluye polipéptidos en los cuales hubo supresión o modificación de secuencias de aminoácidos ya sea por el extremo carboxilo o amino terminal de la proteína.

Preferentemente, se excluyen los ácidos nucleicos, y fragmentos de los

mismos, de las Figuras 12 y 13. Se prefiere asimismo excluir los polipéptidos, y fragmentos de los mismos, de la Figura 14. No obstante, no se excluyen los polipéptidos que contienen o comprenden estas secuencias, por ejemplo, el IFN- $\beta$ 2 de longitud completa; un polipéptido que posee dos o varios de los fragmentos mencionados o un polipéptido que contiene uno de los fragmentos mencionados y secuencias de aminoácidos adicionales, ya sean del IFN- $\beta$ 2 o de otra fuente.

La presente invención también se relaciona con un IFN- $\beta$ 2 que posee la secuencia deducida de los aminoácidos 1 a 208 que se muestra en la Figura 2. El peso molecular calculado es de aproximadamente 23.000 daltons y el punto isoeléctrico predicho es de 8,1. Es una proteína estable en medio ácido con un peso molecular de 26.000 daltons aproximadamente medido por SDS-PAGE. La forma no glicosilada producida en *E. coli* tiene un peso molecular de 20.500 daltons aproximadamente. Véase, más adelante en los ejemplos.

Tal como se muestra en la Figura 2, tiene una secuencia señal predicha que comprende los aminoácidos -1 a -21, dos sitios potenciales de N-glicosilación que comprenden los aminoácidos 74-77 y 83-86, y residuos de cisteína en los aminoácidos 32, 142 y 154. Se predijo la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 32 y 142. Comprende una hélice A en las posiciones de aminoácidos 7-24, una hélice B en 55-69, una hélice C en 83-95, una hélice D en 118-134 y una hélice E en 143-158.

El IFN- $\beta$ 2 maduro se refiere a un IFN- $\beta$ 2 que no contiene los aminoácidos -1 a -21 como se muestra en la Figura 2 y que es de 187 aminoácidos de longitud. También posee una extensión única de 18 aminoácidos en el extremo C terminal cuando se compara con otros tipos de

interferón conocidos. Dicha extensión se puede usar como marcador para IFN- $\beta$ 2, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, y se puede fusionar a polipéptidos heterólogos.

El polipéptido IFN- $\beta$ 2 de la invención que posee, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2, se puede analizar mediante cualquier método adecuado para identificar otros dominios estructurales y/o funcionales en dicho polipéptido, incluyendo regiones que abarcan la membrana o regiones hidrofóbicas. Además, el polipéptido IFN- $\beta$ 2 se puede analizar mediante los métodos que se describen, por ejemplo, en Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105, 1982; *EMBL Protein Predict*; Rost y Sander, *Proteins*, 19: 55-72, 1994.

Se pueden obtener otros homólogos de los IFN- $\beta$ 2 de la presente invención provenientes de fuentes de mamíferos y que no son de mamíferos utilizando diversos métodos. Por ejemplo, por hibridación con oligonucleótidos (por ejemplo, con cebadores para amplificar la región de terminación -5'-ATG ATT ATC AAG CAC TTC TTT GGA-3' y 5'-CTA CCT CGG GCT TCT AAA CTC TGT-3'). Los cebadores utilizados para la expresión en *E. coli* fueron -5'-GGA ATT CCT ACT ACC TCG GGC TTC TAA-3' y 5'-GCG CGC GCA TAT GCT AGA TTT GAA ACT GAT TAT-3'. Para seleccionar homólogos, los cebadores para la secuencia de longitud completa conocida, incluyendo la secuencia genómica no traducida 5' y 3', que se pueden emplear son -5'-TTT AGG TGA CAC TAT AGA AT-3' y 5'-TAA AAT GGA TAG AAT ATA TAA-3'-, por ejemplo, como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Capítulo 11, 1989. Dichos homólogos pueden tener valores de identidad y similitud variables de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos con el IFN- $\beta$ 2. Los mamíferos

incluyen, por ejemplo, roedores, ratones, ratas, hámster, monos, cerdos, vacas, caballos, perros, gatos, etc. Los organismos que no son mamíferos incluyen, por ejemplo, vertebrados, invertebrados, cebra, pollos, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus*, levadura, tal como *S. pombe*, *S. cerevisiae*, ascáridos; procariontes, plantas, *Arabidopsis*; Crustáceos, artemia, virus, etc. Para seleccionar los oligonucleótidos para la hibridación, se debe emplear un método efectivo. Por ejemplo, se pueden identificar regiones específicas del IFN- $\beta$ 2 por comparación del IFN- $\beta$ 2 de la presente invención con otros tipos de IFN- $\beta$ 2 y selección de aquellas secuencias de aminoácidos que solamente aparecen en el primero (es decir, no conservadas o "específicas del" IFN- $\beta$ 2). Véase, por ejemplo, en la Figura A donde se muestran regiones conservadas y no conservadas entre los diferentes tipos de interferones. Se pueden seleccionar las secuencias de aminoácidos no conservadas (por ejemplo, KSLSP) y luego se pueden diseñar sondas degeneradas basadas en dichas secuencias. Véase, además, Venkataraman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 3658-3663, 1999. Se pueden hallar otras secuencias de aminoácidos específicas (es decir, no conservadas) y/o conservadas utilizando métodos de rutina, por ejemplo, mediante búsqueda en una base de datos de genes/proteínas con los conjuntos de programas para computadora BLAST.

La invención también se relaciona con secuencias de aminoácidos específicas de IFN- $\beta$ 2, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos definida presente en la secuencia particular que se muestra en las Figuras 2 y 4, pero no en otros tipos de interferón. Los polipéptidos preferidos son de al menos ocho aminoácidos contiguos aproximadamente, por ejemplo, de aproximadamente 9, 10, 12, 15, 20, 21, 22, 25, 30, 40, 50, etc. Dichos

polipéptidos pueden comprender, por ejemplo, KHFFGTV, IIFQQRQV, KSLSP, FRANI, AEKLSGT, CLFFVFS, y QGRPLNDMKQELTTEFRSPR, y fragmentos de los mismos. La secuencia o motivo de aminoácidos específico de IFN- $\beta$ 2 puede ser de utilidad para producir péptidos que actuarán como antígenos en la generación de una respuesta inmune específica de los mismos. Los anticuerpos obtenidos con dicha inmunización se pueden usar como una sonda específica para una proteína IFN- $\beta$ 2 de mamífero con fines de diagnóstico o de investigación, inclusive como marcadores de expresión.

Como ya se mencionó, los polipéptidos de la presente invención pueden comprender diversas secuencias de aminoácidos para un IFN- $\beta$ 2 (por ejemplo, una secuencia de longitud completa, es decir, que posee un codón de inicio y de terminación como se muestra en la Figura 1, una secuencia de aminoácidos madura (es decir, donde el polipéptido IFN- $\beta$ 2 es producido como un precursor que será procesado en un polipéptido maduro, o fragmentos del mismo). Los fragmentos que son de utilidad incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o que consisten esencialmente de, cualquiera de los dominios mencionados previamente y secuencias de aminoácidos específicas o conservadas, tal como las que se muestran en las Figuras 2 y 4.

El fragmento de un polipéptido de IFN- $\beta$ 2 de la presente invención se puede seleccionar para que tenga una actividad biológica específica, por ejemplo, actividad antiviral, inmunomoduladora, anticrecimiento, etc. La medición de estas actividades se puede llevar a cabo como es de conocimiento para el especialista. Véase, más adelante. Estos péptidos también se pueden identificar y preparar como se describe en la publicación EP 496 162.

El polipéptido de la presente invención también puede tener un 100% o

menos de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2. A los fines de la siguiente descripción, la identidad de la secuencia se refiere al mismo nucleótido o aminoácido que se halla en la secuencia de las Figuras 1 y 2 en la posición correspondiente de la o las secuencias comparadas. Un polipéptido que presenta menos que un 100% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos que se muestran en las Figuras 1 y 2 pueden contener numerosas sustituciones con respecto a la secuencia natural, incluyendo sustituciones de aminoácidos homólogas y no homólogas. Véase más adelante por ejemplos de sustituciones de aminoácidos homólogos. La suma de los residuos idénticos y homólogos dividida por la cantidad total de residuos de la secuencia con la cual se compara el polipéptido IFN- $\beta$ 2 es igual al porcentaje de similitud de secuencia. A los efectos de calcular la identidad y similitud de secuencia, las secuencias comparadas se pueden alinear y calcular utilizando cualquier método, algoritmo, programa para computadora, etc. que se deseara, incluyendo, por ejemplo, FASTA, BLASTA.

Un polipéptido que tenga menos que un 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 puede tener aproximadamente un 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 88%, 85%, 80%, 75%, 70% o tan poco como un 53% de identidad de secuencia.

La presente invención también se relaciona con muteínas de polipéptidos de un IFN- $\beta$ 2, es decir, cualquier polipéptido cuya secuencia difiera en cuanto a secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos que se puede obtener de una fuente natural (un fragmento de un IFN- $\beta$ 2 de