



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTÁ - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

Bogotá D.C., 7 de abril de 2017

Señores

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Ciudad

REFERENCIA: Expediente No. 16 – 102.140
TÍTULO: “PRODUCTO COSMÉTICO CON PROPIEDADES REPARADORAS DEL ADN”

SOLICITANTE: DERMOPARTNERS, S.L.

TRÁMITE: Respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8.577 del 12 de junio de 2017.

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, en mi condición de apoderado de la sociedad **DERMOPARTNERS, S.L.**, dentro del término legal, presento respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8.577 del 12 de junio de 2017.

1. DE LA SOLICITUD DE PATENTE.

TÍTULO.

El Examinador objeta el título de la invención porque:

“El título no corresponde con el objeto de la solicitud porque la expresión “producto cosmético” hace referencia a una gran cantidad de composiciones que pueden cumplir con esta función y no se encuentran contenidas en la descripción. Por otra parte, la expresión “propiedades reparadoras del ADN” hace alusión al uso que se le puede dar a la invención solicitada, se recuerda que los usos no son patentables según el Art. 14 D 486, por lo cual se sugiere a la solicitante hacer la corrección necesaria”.



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

R/: El solicitante de acuerdo a la objeción del Examinador procedió a modificar el título de la solicitud como sigue:

“COMPOSICIÓN COSMÉTICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PANTAS Y MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN”

REIVINDICACIONES (Art. 30 D 486, Art. 22 PCT)

El Examinador objeto el capítulo reivindicatorio porque:

“La reivindicación 1 no contiene las proporciones de los componentes de la misma, a saber, las cantidades específicas de los principios activos y excipientes, lo cual hace que la materia reclamada no sea concisa”.

“Las reivindicaciones 1 - 6 no son claras porque la expresión “producto cosmético” hace referencia a una gran cantidad de composiciones que pueden cumplir con esta función y no se encuentran contenidas en la descripción”.

“Las reivindicaciones 1 y 4 no son claras porque arabidopsis thaliana, extracto de plancton, fermento lisado de bífida o lisado de micrococcus no son enzimas sino especies de plantas y microorganismos que pueden contener enzimas con características reparadoras del ADN”.

“Las reivindicaciones 1 y 3 no son claras porque las expresiones: “tales como”, “etc.”, “mayor del” precediendo una característica no es limitativo, porque hace opcional a la característica y no limita el alcance de la reivindicación. Se sugiere incluir las características opcionales o preferentes en una reivindicación dependiente”.

R/: El solicitante de acuerdo a las objeciones del Examinador procedió a modificar el capítulo reivindicatorio como sigue:



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIP – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

La **Reivindicación 1** se modifica de forma que se incluyen las cantidades de cada componente mencionado en las Reivindicaciones 4, 5 y 6.

La expresión “*producto cosmético*” se reemplaza por lo expresado en el título modificado, es decir “**Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN**”.

Con relación a los componentes que contienen enzimas reparadoras del ADN, se indican de forma clara en **la nueva Reivindicación 1**.

Se **suprimen o se concretan** las expresiones “*tales como*”, “*etc*” o “*mayor del*”.

Por lo expresado anteriormente, el solicitante considera que las **modificaciones mencionadas superan las objeciones a las Reivindicaciones**, son claras y concisas, cumpliéndose así con el Art. 30 D 486. Por lo tanto el solicitante pone a consideración del Examinador Técnico de Patentes una **NUEVA DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN** donde se incluye el nuevo título de la invención en siete folios y un **NUEVO CAPITULO REIVINDICATORIO** el cual consta de **tres (3) nuevas reivindicaciones** en dos folios.

2. ANALISIS DE PATENTABILIDAD.

Nivel Inventivo (Art 18 D486)

El Examinador objeto el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 y 3 con los documentos **D1 (US 2003/0223982)** y **D2 (ES 2423760)** porque:

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

“El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga una composición cosmética o farmacéutica que comprende fotoliasa y/o T4 endonucleasa V, al menos una sustancia seleccionada de vitaminas, provitaminas o vitaminas precursoras de vitamina B, al menos un extracto de planta y al menos otra sustancia inhibidora de colagenasa MMP 1 (Pág. 14, Reiv. 14); c”.

“La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición divulgada en D1 consiste en la inclusión de liposomas individuales para cada principio activo en la composición cosmética”.

“Sin embargo, la utilización de liposomas individuales para cada principio activo en una composición cosmética, ya está divulgada en el documento D2 para garantizar la estabilidad de sus composiciones (Pág. 2, párrafo [0005]); adicionalmente, divulga una composición cosmética que comprende liposomas de revestimiento que incluyen tres o cuatro liposomas con diferentes sustancias activas cosméticas y el procedimiento para la fabricación (Pág. 2, líneas 1 - 2). Por otro lado, el documento D2 revela también, que entre los fosfolípidos adecuados como agente formador de liposomas se encuentran fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, lecitina, hemisuccinato de colesterol entre otros (Pág. 5, líneas 6 - 14). Por lo tanto la reivindicación 1 de la solicitud se considera obvia y, en consecuencia, no tiene nivel inventivo”.

“En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el uso de los liposomas individuales para cada principio activo de la composición del documento D3 en la composición divulgada en el documento D1 para así llegar al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia”.

“Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 – 3 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas”.

“Las reivindicaciones 1 – 3 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18)”.

R/: La solicitante discrepa respetuosamente de la opinión del Examinador a la **falta de nivel inventivo de la presente invención**, y para valorar si sería obvio la combinación de las características divulgadas en los documentos **D1 y D2/D3** exponemos a continuación varios aspectos:

En primer lugar en el examen de patentabilidad se indican una serie de características de los antecedentes señalados como coincidentes con las de la patente de referencia cuando, a nuestro juicio, no es así.

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

Es el caso de las sales de zinc que incluye la composición cosmética objeto de la presente invención y que se incluye como un principio activo en forma de sales como cloruro, gluconato, clorhidrato o análogas. Esta característica en la presente patente se ha descrito y reivindicado como uno de los principios activos y que como los otros dos tipos de principios activos se encuentra encapsulado en liposomas por separado.

Sin embargo en el antecedente más próximo señalado documento **D1**, se hace mención a la inclusión de ciertos aminoácidos como “glicina, serina, treonina, cisteina, asparagina, glutamina, ácido piroglutámico, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, triptófano, fenilalanina, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina e histidina y también sus sales se Zinc”, pero en ningún momento se considera que las sales de zinc de estos aminoácidos puedan presentar algún tipo de ventaja por la inclusión de este metal.

Es más, en el documento **D1**, la mención que se hace a los aminoácidos es como sustitutos de un hidrolizado de proteínas, indicando una relación de estos aminoácidos y sus sales de zinc, pero siempre en referencia a los aminoácidos como sustitutos de un hidrolizado de proteínas.

Ninguno de los ejemplos o realizaciones preferentes del documento **D1** indica entre sus componentes sales de zinc y mucho menos como un principio activo que produzca algún efecto o mejora.

En todo caso se hace mención en el antecedente documento **D1** a la utilización de óxido de zinc como integrante de ciertos pigmentos inorgánicos



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIP – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

que actúan como filtro solar (página 6, párrafo 61) pero la referencia que se hace al usarse como sal de los aminoácidos es como si se usa una sal de Calcio, Magnesio, etc, es decir, que el principio activo es el aminoácido y no el metal.

El óxido de zinc junto con el dióxido de titanio se usan como filtros solares físicos junto con muchos otros filtros solares químicos como se muestran en la tabla adjunta:

FILTROS SOLARES					
	NOMBRE	UVB	UVA	IR	λ
Físicos	Titanium dioxide (dióxido de titanio)	X			---
	Óxido de zinc	X	X		---
Químicos	4-methylbenzylidene camphor	X			302
	Ethylhexylmethoxycinnamate	X			310
	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	X			304
	Butyl methoxydibenzoylmethane		X		358
	Ethylhexyl salicylate	X			305
	Octocrylene	X			303
	Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	X	X		388
	Benzophenone-3	X	X		340

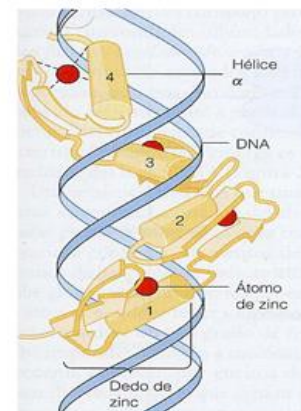
Pero en el caso que nos ocupa la inclusión de una sal de zinc no es como filtro solar sino como una sal de zinc encapsulada en liposomas por si sola, sin formar una sal con los aminoácidos, y que actúa para la reparación de

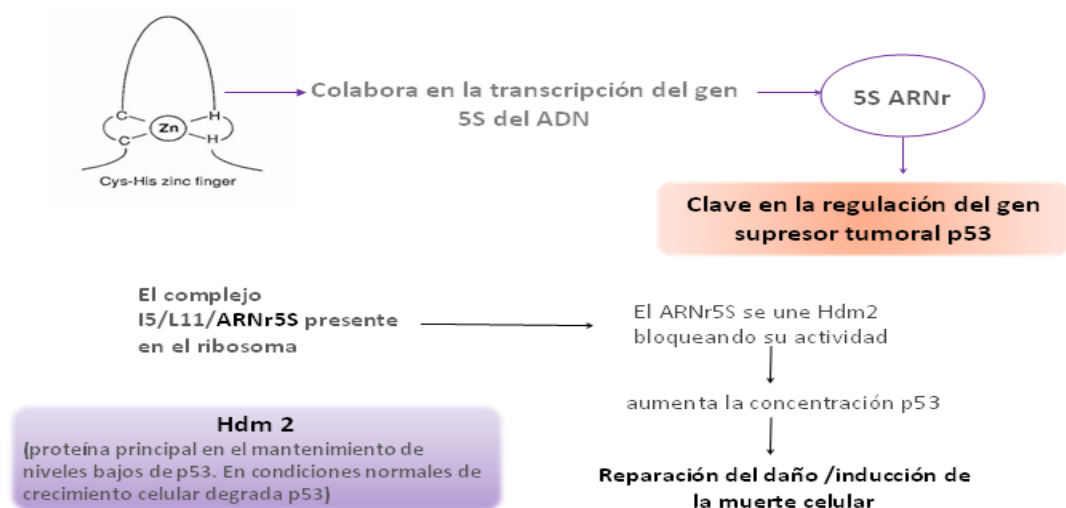
los daños producidos por la radiación UV que dañan el ADN de las células de la piel.

Es decir no se trata de evitar que los rayos UV lleguen al ADN de las células sino de la reparación de los daños causados por estos rayos en el ADN.

El cloruro de zinc, por ejemplo, que incluye la presente patente como principio activo se incorpora a las células y contribuye sustancialmente en la formación de los “zinc fingers” o “dedos de zinc” que son estructuras proteicas con un átomo de zinc que ayudan a estabilizar las cadenas de ADN y colaboran en la transcripción del ARN tal y como se muestra en las figuras siguientes:

-  Esta estructura proteica se une a la cadena de ADN
 - Ayuda a estabilizar la cadena de ADN
 - Colabora en la transcripción del gen 5S del ADN 5SARN
-
-  Alteraciones estructurales en estos dominios aumentan la carcinogénesis y otros procesos malignos





Además de ser útiles en lectura, escritura y transcripción de ADN, existen hormonas que hoy usan dedos de cinc. Son estas las mismas hormonas que están fuertemente asociadas con la homeostasis de crecimiento de todo el organismo.

Uno de los daños que produce la radiación solar sobre el ADN es la formación de dímeros de timina que impiden la replicación del ADN y la transcripción del ARN como se muestra en la Figura 1:

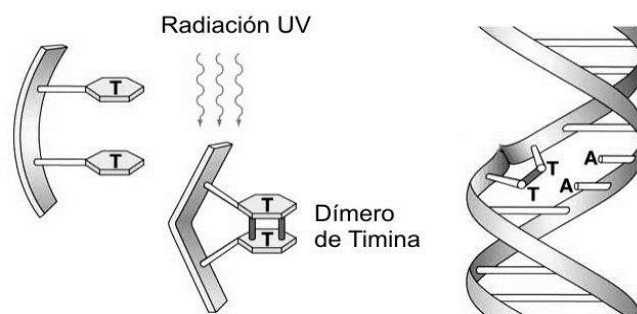


Fig. 1

Este daño en el ADN puede ser medido por los dímeros de timina (DT) o citosina que se producen en la cadena del ADN celular y la reducción de los mismos por los principios activos de la presente patente puede ser medida.

En la Figura 5 se muestra los niveles de DT, en el caso control, incluye la crema base sin los ingredientes activos, la E: incluye crema base con enzimas reparadoras, Z: crema base con aminoácidos y sal de Zn y E+Z: crema base con enzimas reparadoras + aminoácidos + sal de Zn. La combinación E+Z reduce la presencia de DT en un 36% respecto al control.

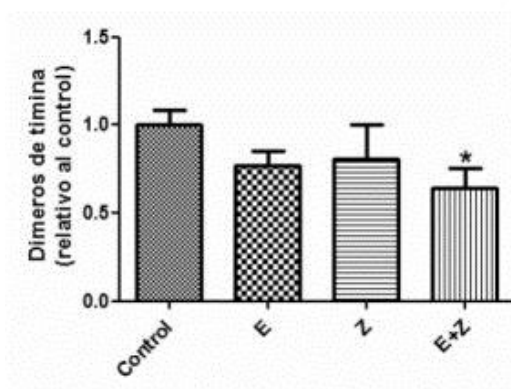


Fig. 5

Como se puede apreciar en la figura, en el caso E+Z, es decir cuando se utilizan los tres componentes es cuando la reducción de dímeros de timina es mayor.

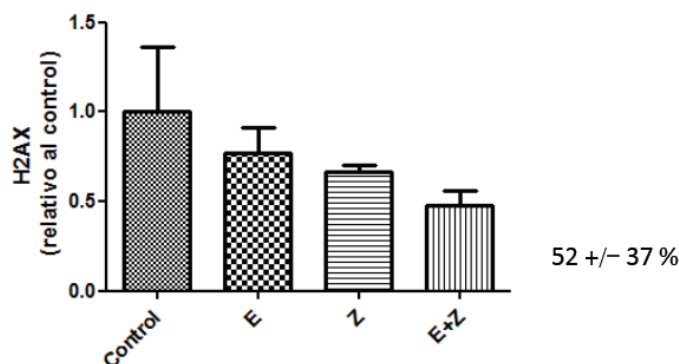
Algo semejante sucede en cuanto a que la radiación UV ionizante induce roturas que inducen a la vez a la fosforilación de la histona 2 AX. Esta es un indicativo del daño generado en el ADN. Se observa una disminución de H2AX y por lo tanto una disminución en la formación de dímeros de timina, hay un aumento de la reparación del ADN mayor usando la combinación de los tres componentes.



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI



Todo ello teniendo en cuenta que cada uno de los principios activos de la presente patente se encapsula en liposomas por separado lo que implica que en unos liposomas van los aminoácidos y en otros liposomas las sales de zinc.

Esta circunstancia implica que la utilización de sales de zinc de los aminoácidos tendría la misma proporción de aminoácidos que de sales de zinc y sin embargo en la presente invención la proporción de liposomas con sales de zinc es del 10-15% y la de aminoácidos es del 26-35%.

Otra característica diferenciadora entre la presente invención y el documento **D2** es la inclusión de liposomas de arabidopsis thaliana como principio activo que contienen enzimas reparadoras del ADN.

Finalmente otra característica que diferencia a la presente invención del antecedente más próximo es la inclusión de fermento lisado de bífida que no se reivindica en ninguno de los dos antecedentes señalados.

Es decir, que las diferencias de la presente patente con el documento **D1** no es sólo la utilización de liposomas individuales para cada principio activo

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

sino que además incorpora sales de Zinc como principio activo por separado en su liposoma, la inclusión de liposomas de arabis thaliana y la inclusión de fermento lisado de bífida.

En conclusión una persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el uso de los liposomas individuales para cada principio activo de la composición del documento **D2** en la composición divulgada en el documento **D1** pero no llegaría al objeto de la Reivindicación 1 y siguientes de la solicitud. Por lo cual no debe considerarse obvia.

Por tanto, la solicitante considera que las **nuevas reivindicaciones a 3** **tienen NIVEL INVENTIVO** con respecto a los documentos del arte previo citados.

Por lo expresado anteriormente, el **Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN**, tal como se describe en la presente solicitud de patente de invención de nuestro poderdante, **no está comprendida en el estado de la técnica o anticipada**, ni se encuentran definidas ni mucho menos divulgada en los documentos **D1, D2 y D3** citados por el Examinador. Por lo tanto, la invención es **NOVEDOSA**, tiene **NIVEL INVENTIVO Y APLICACIÓN INDUSTRIAL**, es decir cumple con los requisitos de exigidos por la Decisión 486 del Acuerdo de la Comisión de la Comunidad Andina; además, estamos dando respuesta al Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8.577 del 12 de junio de 2017.

Por lo anteriormente mencionado, solicito respetuosamente se proceda a **CONCEDER** la Patente de Invención titulada: “**COMPOSICIÓN COSMÉTICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PANTAS Y**

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPi – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN” a nombre de la
sociedad **DERMOPARTNERS, S.L.**, para las nuevas Reivindicaciones 1 a 3 inclusive.
Atentamente,

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
C.C. No. 19.270.955 Bogotá
T.P. No. 43.308 C.S.J.

Anexo:
Nueva Descripción en siete folios.
Nuevas Reivindicaciones (3) en dos folios.
Resumen en un folio.

COMPOSICION COSMETICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOACIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN

OBJETO DE LA INVENCION

- 5 La invención que se propone se refiere a un nuevo producto cosmético con propiedades reparadoras del ADN que ha sufrido daños después de la exposición de la piel a la radiación UV y que tiene su aplicación en el sector de los centros de belleza, cosmética y dermatología.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Se conocen hasta la fecha diferentes preparaciones para reparar el ADN que incluyen principios activos de varios tipos, pero no se conocen preparaciones que incluyan liposomas unilamelares de naturaleza fosfolipídica con ingredientes activos como: aminoácidos, sales de Zinc y enzimas reparadoras del ADN.

- 15 Lo mas próximo conocido dentro del estado de la técnica es la patente EP0707844, en la que se describe un producto para la reparación del ADN celular después de la exposición a radiación UV, donde los principios activos son complejos de vitaminas y polipéptidos, tirosina o sus derivados, glicoproteínas con iones metálicos de cobre, zinc o magnesio y enzimas reparadoras del ADN.

- 20 El producto descrito en esta patente utiliza derivados de la tirosina, vitaminas en un complejo proteico y forskolin, a diferencia del producto descrito en la presente memoria, además de incorporar una fotoliasa.

- 25 Además encapsulan en un mismo liposoma varios principios activos a diferencia de la invención aquí descrita, en la que se encapsulan en los liposomas cada principio activo por separado, lo que proporciona mayor estabilidad a cada uno de los liposomas y por ello al producto final

No se conoce ningún producto para la reparación del ADN celular después de la exposición a radiación UV con las características de la presente invención.

La fosfatidilcolina empleada en la formulación del liposoma es una lecitina de pureza > 94%, mientras que la de la patente citada la pureza es del > 25%.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El producto que la invención propone consiste en una preparación liposomada en la que los liposomas incorporan, como principios activos, una mezcla de los aminoácidos arginina, glicina, prolina, fenilalanina, cisteína, serina, tirosina, glutamina, metionina, junto con sales de Zinc (cloruro, gluconato, clorhidrato, etc), además de otros principios activos que contienen enzimas reparadoras como arabidopsis thaliana, extracto de plancton, fermento lisado de bifida, lisado de micrococcus, etc.

Debido a sus rutas metabólicas podemos justificar la incorporación de los siguientes aminoácidos a la invención, pese a no estar en la fórmula:

10 Serina: es precursor de cisteína y glicina.

Tirosina: su precursor es fenilalanina. Se obtiene por hidroxilación de fenilalanina.

Metionina: producto intermedio de la síntesis de cisteína. Cisteína obtiene el átomo de azufre de metionina.

15 Glutamina: se sintetiza a través de la reacción química entre glutamato y el ion amonio y la glutamina puede convertirse en glutamato y la prolina se forma a partir de la cadena pentacarbonada del ácido glutámico.

La exposición de la piel a las radiaciones UV del sol da lugar a unos daños en el ADN de las células de la piel. Este daño puede ser medido, entre otras formas por los dímeros de timina o citosina que se producen en la cadena del ADN celular.

20 REALIZACION PREFERENTE DE LA INVENCION

Como realización preferente se propone un producto cosmético liposomado, que presenta distintas formas cosméticas como solución, serum, emulsión, suspensión etc. en el que los diferentes componentes se pueden encontrar en uno de los casos en las siguientes proporciones de ingrediente activo y de liposomas:

COMPONENTE INCI	% Total	% de Liposomas
AGUA	70-80	
GLICERINA	4-5	
LECITINA	4-5	
ALCOHOL	3-4	
ACEITE DE CASTOR HIDROGENADO PEG-40	2-3	
CICLOPENTASILOXANO	2-3	

POLISORBATO 20	1	
FENOXIETANOL	<1	
COLATO DE SODIO	<0,5	
CITRONELILO METILCROTONATO	<0,5	
PERFUME	<0,5	
ACETATO DE TOCOFEROL	<0,5	
ARGININA	<0,5	ARGININA 6-7%
DIMETICONA	<0,5	
ETHYLHEXYLGLYCERIN	<0,5	
POLISILICONA-11	<0,5	
GLICINA	<0,5	GLICINA 5-7%
PROLINA	<0,5	PROLINA 5-7%
BUTILENGLICOL	<0,5	
ACIDO LACTICO	<0,5	
EDTA DISODICO	0,1	
CLORURO DE SODIO	<0,1	
FERMENTO LISADO DE BIFIDA	<0,1	ENZIMAS BIFIDA 7-8%
CAPRILICO/CAPRICO TRIGLICERIDO	<0,1	
FENILALANINA	<0,1	FENILALANINA 5-7%
CISTEINA	<0,1	CISTEINA 5-7%
EXTRACTO DE ARABIDOPSIS THALIANA	<0,1	ARABIDOPSIS 10-12%
LISADO DE MICROCOCCUS	<0,1	MICROCOCCUS 10-12%
HIDROXIDO SODICO	<0,1	
EXTRACTO DE PLANCTON	<0,1	PLANCTON 6-7%
DECILGLUCOSIDO	<0,1	
CLORURO DE ZINC	<0,1	ZINC 10-12%
TEPRENONA	<0,1	TREPRENONA 7-8%
ACIDO CLORHÍDRICO	<0,1	
CAPRILILGLICOL	<0,1	
HEXILENGLICOL	<0,1	
	100,0000	

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando, y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, una serie de figuras.

Una parte de las figuras incluidas en esta memoria se corresponden con los ensayos realizados sobre embriones de peces de la especie Medaka, con este tipo de productos y que nos demuestran su capacidad reparadora del ADN.

Del mismo modo, veremos como el mecanismo de acción para dicha reparación del ADN, es la activación de la expresión de las proteínas P53 y P21, que mediremos por PCR cuantitativa (qPCR).

En estas figuras, con carácter ilustrativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra un esquema del efecto de la radiación UV sobre las cadenas de ADN y la formación de dímeros de timina, entre dos bases de una misma hélice de ADN.

Figura 2.- Presenta un esquema de los daños producidos en el ADN con respecto al control a tiempo 0 y a los 15 minutos. Este ensayo se realiza con muestras NO tratadas, donde aumenta el daño al ADN (tiempo= 0), pero la célula utiliza sus propios mecanismos endógenos para reparar este daño y a los 15' los niveles de DT son similares al control.

Figura 3.- Muestra la variación de la expresión de la Histona H2Ax y de los niveles de dímeros de timina con respecto al control a tiempo 0 y a los 15 minutos. Aunque sabemos que la H2Ax fosforilada actúa como reclamo de los compuestos enzimáticos de reparación del ADN. Los resultados a $t = 0$ y $t = 15'$, no son estadísticamente significativos.

Figura 4.- Representa la variación de las células en las fases del ciclo celular G0-G1, G2-M y S a tiempo 0 y a los 15 minutos. Los tratamientos No inducen cambios estadísticamente significativos en la distribución de células en las fases del ciclo celular que puedan afectar los resultados.

Figura 5.- Muestra los niveles de DT , en el caso control, incluye la crema base sin los ingredientes activos, la E: incluye crema base con enzimas reparadoras, Z: crema base con aminoácidos y sal de Zn y E+Z: crema base con enzimas reparadoras + aminoácidos+ sal de Zn. La combinación E+Z reduce la presencia de DT en un 36% respecto al control.

ESTUDIOS CLÍNICOS

Para determinar la eficacia del producto que la invención propone se realizan unos ensayos en los que utilizan tres preparaciones cosméticas E, Z y E+Z. El ensayo se realiza in vitro sobre embriones de peces Eleutheroembryos de 4 días de edad.

De los tres productos usados en el estudio, el producto E contiene una mezcla de liposomas con enzimas reparadoras (arabidopsis thaliana, extracto de plancton, fermento lisado de bifida, lisado de micrococcus), el producto Z contiene una mezcla de liposomas con aminoácidos (arginina, glicina, prolina, fenilalanina, cisteína) y cloruro de zinc y el producto E+Z la mezcla de liposomas con todas las enzimas reparadoras citadas en el producto E, más los AA y Zn del producto Z.

En primer lugar se analiza la posible toxicidad de las muestras y el tiempo de tratamiento a utilizar en los ensayos.

Se preparan muestras control sin irradiar, irradiadas sin tratar e irradiadas tratadas después de la irradiación. Los productos se aplicarán a los embriones antes y después de la irradiación para detectar la posible reparación del ADN tras la inducción del daño.

Para ello se hace un análisis de la presencia de dímeros de timina ya que la radiación UV induce la formación de dímeros de pirimidina en el ADN que pueden ser detectados por anticuerpos específicos para estos dímeros (bien de timina, bien de citosina). Utilizando un anticuerpo específico cuantificaremos la cantidad de dímeros de timina inducidos por la radiación UV. (ver Fig. 1)

Las muestras se fijan y procesan para su análisis por Citometría de flujo que se realiza de la siguiente forma:

Los embriones se disgregan con un tratamiento enzimático con tripsina para separar las células sin dañarlas. Se fijan con paraformaldehído y se tiñen con el

anticuerpo para dímeros de timina DT y para el compuesto para teñir ADN (Hoescht) y calcular su cantidad. A partir de la cantidad de ADN se determinan las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células.

Tras tratar las muestras con las cremas se exponen a la radiación UV y se
5 analiza el daño celular basándonos en la presencia de dímeros de timina inducidos por UV, la activación de la histona H2Ax y alteraciones en el ciclo celular.

Tras la exposición a la radiación UV aumenta el daño al ADN (tiempo = 0) respecto a las muestras no tratadas (C). La célula utiliza sus propios mecanismos para reparar este daño (34 %) y a los 15 min. (t=15) los niveles de DT son similares al control.
10 (Ver Fig. 2)

Tras la exposición a la radiación UV aumenta la expresión de H2AX (tiempo = 0) y a t=15 se observa que los niveles de H2AX disminuyen de manera similar a como lo hacen los niveles de DT a t=15, indicando una correlación entre la expresión de H2AX y la presencia de DT. Sin embargo, debido a la alta variabilidad detectada en el control, la
15 disminución no es estadísticamente significativa. (Ver Fig. 3)

La fase G0-G1 es la etapa de reposo de la célula o preparación para entrar en división. La fase G2-M es la de separación de cromátidas y división celular (mitosis). La fase S es la de síntesis de ADN. E+Z parece aumentar ligeramente la fase G2-M, pero la diferencia no es significativa. (ver Fig. 4)

20 La combinación de E+Z reduce la presencia de dímeros de timina en un 36 ± 14 % (22-50 %) respecto al control.

La crema control ("vacía") es la misma que para E, Z y E+Z pero sin estos componentes. Las muestras se tratan con las cremas, se irradian y se analizan, tomando como referencia (C) la cantidad de DT detectados en la muestra tratada con la
25 crema "vacía". (ver Fig. 5)

Por último cabe destacar, el ensayo realizado para comprobar la activación de los mecanismos de acción que provoca dicha reparación. Elegimos 2 proteínas, la P53 y P21, ambas intervienen en este mecanismo de acción y se activan por la radiación UV.

El experimento se realiza por duplicado, utilizando 10 embriones, con un grupo
30 control, sin tratar con crema, de los cuales la mitad se tratan con radiación UV 15' y la otra mitad no. Y el grupo tratado donde se aplica la crema durante 1H.

Tras el análisis por qPCR los resultados son: Tras la irradiación con luz UV, los embriones tratados con E+Z aumentan la expresión génica de p53 en un 46%. Del mismo modo, el tratamiento con E+Z aumenta la expresión de p21 a los 15' de la irradiación en un 130%.

- 5 Una vez descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, solamente queda por añadir que dicha invención puede sufrir ciertas variaciones en los componentes y porcentajes, siempre y cuando dichas alteraciones no varíen sustancialmente las características que se reivindican a continuación:

REINVINDICACIONES

1. Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN,

5 **CARACTERIZADA PORQUE** comprende:

 - un principio activo que consiste en una mezcla de liposomas que tienen en su interior los siguientes componentes con enzimas con propiedades reparadoras del ADN y en los siguientes porcentajes:
 - liposomas de extracto de plancton 5-10%
 - 10 - liposomas de lisado de micrococcus 10-20%
 - liposomas de arabidopsis thaliana 10-20%
 - liposomas de lisado de bifida 5-10%
 - un segundo principio activo que consiste en una mezcla de diferentes porcentajes de liposomas que incorporan en su interior los aminoácidos y en las proporciones siguientes:
 - 15
 - liposomas de arginina 6-7%
 - liposomas de glicina 5-7%
 - liposomas de prolina 5-7%
 - liposomas de fenilalanina 5-7%
 - 20 - liposomas de cisteína 5-7%
 - un tercer principio activo son unos liposomas en un porcentaje del 10 - 15% con una sal de zinc (cloruro, gluconato, clorhidrato o análogas).
2. Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN de acuerdo la Reivindicación 1, **CARACTERIZADA PORQUE** los liposomas encapsulan cada uno de los aminoácidos, los componentes con enzimas reparadoras o la sal de zinc por separado.

25

3. Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN de acuerdo la Reivindicación 1 **CARACTERIZADA PORQUE** la fosfatidilcolina empleada en la formulación de los liposomas es una lecitina de pureza entre el 94 - 99%.

RESUMEN

- Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN demostradas
- 5 que cuenta con una mezcla de liposomas que incorporan como principios activos diferentes enzimas reparadoras del ADN y una combinación de aminoácidos y sal de zinc además de otros componentes de uso cosmético.