



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 005**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03007876 .0**

96 Fecha de presentación : **07.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1354593**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54 Título: **Utilización de un extracto de bacteria filamentosas no fotosintética y no fructificante como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa.**

30 Prioridad: **08.04.2002 FR 02 04339**

73 Titular/es: **L'Oréal**
14, rue Royale
75008 Paris, FR

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

72 Inventor/es: **Mahe, Yann y**
Meybeck, Alain

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 361 005 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa

5

La presente invención se relaciona con la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa (SOD), para prevenir y/o limitar la formación de radicales libres y/o eliminar los radicales libres presentes en las células.

10

En el transcurso del tiempo, aparecen diferentes signos sobre la piel, muy característicos del envejecimiento, que se traducen especialmente en una modificación de la estructura y de las funciones cutáneas.

15

Este envejecimiento de naturaleza fisiológica es el resultado de la acción de dos grandes clases de componentes, un componente endógeno que resulta especialmente de la producción natural de iones superóxido, en particular producidos durante la respiración celular.

20

El otro componente es exógeno. En efecto, el envejecimiento puede acelerarse por factores medioambientales, tales como una exposición repetida de la piel a la luz solar, y especialmente a las radiaciones ultravioletas A, a la polución, especialmente a las partículas de diésel, y al humo de cigarrillo.

25

Se sabe que la toxicidad de los contaminantes atmosféricos, especialmente de los contaminantes gaseosos, tales como el dióxido de azufre, el ozono y los óxidos de nitrógeno, sobre los constituyentes de la piel (fibras, células, enzimas) y sobre el sebo segregado por la piel está ligada especialmente a su actividad de iniciadores de radicales libres, fuente de fenómenos de oxidación que provocan entre los seres vivos daños celulares.

30

Las células vivas, que están en contacto directo y permanente con el medio exterior (especialmente la piel, el cuero cabelludo y ciertas mucosas) son particularmente sensibles a estos efectos de los contaminantes gaseosos, que se traducen especialmente en un envejecimiento acelerado de la piel, con una tez que carece de brillo y una formación precoz de arrugas o de arrugas de pequeño tamaño, y también en una disminución del vigor y un aspecto apagado del cabello.

35

Se sabe igualmente que los fenómenos de irritación provocados por la exposición a los rayos ultravioleta dan lugar también al fenómeno de envejecimiento celular acelerado.

40

Tanto si tienen un origen endógeno como exógeno, los radicales libres provocan daños oxidativos importantes, especialmente en las membranas celulares (peroxidación de lípidos que provoca una degradación de la permeabilidad de las membranas), los núcleos de las células (destrucción del ADN) y los tejidos, en particular el tejido conjuntivo (degradación de las fibras de elastina y de colágeno, despolimerización de las fibras poliurónicas). Estos daños dan lugar especialmente a una desecación y a una pérdida de firmeza y de elasticidad de la piel (Grinwald et al., 1980, Agren et al., 1997).

45

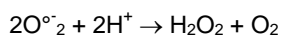
Los especialistas consideran actualmente que una de las causas del envejecimiento celular es la disminución de las capacidades de defensa contra los radicales libres y contra los fenómenos de oxidación (especialmente la formación de iones superóxido) que inician.

50

El ion superóxido $O^{\circ-2}$ (oxígeno activo) es un ion-radical cuya inestabilidad y cuya reactividad hacen de él un compuesto tóxico, ya que genera, especialmente en presencia de iones metálicos, radicales libres hidroxilo (OH°) altamente nocivos. Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que ejercen un efecto protector especialmente capturando los iones superóxido, y constituyen así un sistema biológico de defensa contra los efectos nocivos de los radicales libres.

55

Las superóxido dismutasas son capaces de inducir la dismutación de los iones superóxido, según la reacción:



60

Se conocen numerosas superóxido dismutasas. Por ejemplo, se han descrito ya superóxido dismutasas extraídas de eritrocitos de buey (Markovitz, J. Biol. Chem. 234, p. 40, 1959) y superóxido dismutasas extraídas de *Escherichia coli* (Keele y Fridovich, J. Biol. Chem., 245, p. 6176, 1970). En el documento FR-A-2.225.443, se describen superóxido dismutasas extraídas de cepas bacterianas marinas, así como su procedimiento de preparación.

Las superóxido dismutasas permiten, en particular, proteger la piel y el cabello, especialmente manteniendo la integridad de la estructura queratínica natural, como lo describe, por ejemplo, el documento FR-A-2.287.899. Además, las superóxido dismutasas mejoran la respiración celular cutánea y mantienen o mejoran las cualidades de

la piel, tales como la suavidad al tacto, la flexibilidad y la elasticidad.

Las superóxido dismutasas protegen también la piel contra los fenómenos de inflamación causados por las radiaciones ultravioletas, así como contra el envejecimiento acelerado de la piel, especialmente bajo la influencia de tales radiaciones.

Debido a estas propiedades interesantes, se conoce la adición de superóxido dismutasas a composiciones cosméticas, en particular composiciones destinadas a una aplicación tópica (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente EP 0.673.643 y EP 0.636.360).

La Solicitante descubrió un nuevo medio para luchar contra los efectos nefastos provocados por los radicales libres induciendo la síntesis endógena de superóxido dismutasa. En efecto, descubrió de un modo totalmente sorprendente que un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante provocaba el aumento de la síntesis endógena de superóxido dismutasa.

La utilización tópica de sustancias con actividad superóxido dismutasa, si bien puede ser ventajosa en ciertas condiciones de utilización, presenta, no obstante, el inconveniente de necesitar una estabilidad y una biodisponibilidad cutánea particulares de estas formas de SOD. Por otra parte, se sabe que existe una distribución particular de las SOD en las células; especialmente, se localizan fisiológicamente en el interior de las células y más particularmente en proximidad directa a las entidades celulares fuertemente generadoras de iones superóxido, que son las mitocondrias. Así, cuando se utilizan medios para neutralizar los iones superóxido producidos en el exterior de la célula, es porque los daños celulares oxidativos son ya muy importantes y porque el anión superóxido ha salido del control de su ambiente intracelular. La utilización de SOD exógena tiene, pues, la misión de impedir la propagación de los daños oxidativos a otras entidades celulares, pudiendo cumplir una función a la vez curativa y reparadora.

La Solicitante presenta aquí un medio para inducir a las células a producir su propia actividad antioxidante y a reforzar así sus defensas naturales. La ventaja de la utilización según la presente invención con respecto a la utilización de una sustancia exógena que presente una actividad SOD es que permite, tras el contacto de las células con el extracto de membranas de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante, inducir la producción de enzima SOD según una localización (especialmente mitocondrial) que respeta las condiciones fisiológicas y sobre todo induce a la célula a protegerse del interior gracias a su propio metabolismo oxidativo. Además, la SOD, cuando captura radicales libres, sufre a su vez una oxidación y pierde progresivamente su resistencia a los daños oxidativos; esto es aún más manifiesto cuando la enzima ha salido de su contexto intracelular. La inducción de SOD en respuesta a la aplicación de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante permite así a la célula autorreconstituirse y acelerar la renovación fisiológica de su stock intracelular de SOD.

Aumentar la síntesis endógena de superóxido dismutasa presenta numerosas ventajas con respecto al aporte exógeno de la enzima. En efecto, cuando se realiza la aplicación tópica de composiciones que contienen SOD, una proporción importante de SOD se desnaturalizan especialmente por proteasas presentes en la superficie de la piel y/o no atraviesan las membranas celulares debido a su gran peso molecular (17 kD para la Cu/ZnSOD y 23 kD para la MnSOD). Además, para obtener el efecto deseado, es generalmente necesario aumentar la cantidad de SOD en la composición.

Otro inconveniente de la aplicación tópica de proteína exógena, tal como la enzima SOD, es el riesgo de alergia que representa cuando la concentración de proteína es demasiado elevada.

La presente invención tiene, pues, por objeto la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa.

Los extractos de bacterias según la invención son preparados a partir de bacterias filamentosas no fotosintéticas y no fructificantes, tal como se definen según la clasificación del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 3, sección 23, 9ª edición, 1989), entre las cuales se pueden citar las bacterias pertenecientes al orden de las Beggiatoales, y más particularmente las bacterias pertenecientes a los géneros Beggiatoa, Vitreoscilla, Flexithrix o Leucothrix.

Se podrán utilizar diferentes extractos; en particular, se preferirá utilizar como extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante un aislado de lipopolisacáridos que podrá, por ejemplo, ser obtenido según uno de los métodos descritos en el ejemplo 1.

La bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante preferida según la presente invención es *Vitreoscilla filiformis*, en particular la cepa ATCC 15551.

Las células humanas sintetizan dos tipos de superóxido dismutasa. La superóxido dismutasa de tipo 1, también llamada Cu/ZnSOD o SOD del citosol, es una enzima que se encuentra en el citosol de las células. La superóxido dismutasa de tipo 2, MnSOD, se encuentra en las mitocondrias de las células. La Solicitante constató de un modo totalmente sorprendente que el extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante era particularmente eficaz para aumentar la síntesis de MnSOD por una vía transcripcional que implica el aumento de producción del ARN mensajero, precursor de su síntesis proteica.

También una variante de la invención se relaciona con la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa de tipo 2 (MnSOD).

En las composiciones según la invención, se puede utilizar de un 0,001 a un 10%, y en particular de un 0,01 a un 1%, en peso de extracto seco de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante con respecto al peso de la composición.

En formas de aplicaciones particulares de tipo balneoterapia, se pueden contemplar igualmente aplicaciones de lisados bacterianos nativos o reconstituidos en proporciones superiores, que pueden alcanzar el 100%.

Estas composiciones pueden contener el extracto de *Vitreoscilla filiformis* en forma de dispersión en un vehículo apropiado, tal como, por ejemplo, el agua, los solventes orgánicos, los cuerpos grasos, incluidos los aceites, y sus mezclas, especialmente emulsiones.

Según otro objeto de la presente invención, y para todas las aplicaciones descritas a continuación, en la utilización cosmética del extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable, el extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante puede ir asociado a un agente antioxidante.

Así, se puede, por ejemplo, utilizar un agente antioxidante seleccionado entre:

La bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante preferida según la presente invención es *Vitreoscilla filiformis*, en particular la cepa ATCC 15551.

EE.UU. 5.618.521 describe una composición antisolar que contiene un extracto de bacterias filamentosas no fotosintéticas y no fructificantes asociado a un agente antioxidante.

FR 2.693.654 y EP 1.022.018 describen la utilización de fracciones lipopolisacáridas de bacterias filamentosas no fotosintéticas y no fructificantes respectivamente como inmunestimulantes para diversas aplicaciones terapéuticas, entre las cuales algunas son cutáneas, tales como quemaduras y llagas, y como agente adelgazante (efecto lipolítico), en composiciones cosméticas tópicas. Ni se menciona, ni se sugiere, en estos documentos, la capacidad de la fracción lipopolisacárida de estas bacterias para luchar contra fenómenos oxidativos indeseables en el seno de la piel y del cuero cabelludo.

Las células humanas sintetizan dos tipos de superóxido dismutasa. La superóxido dismutasa de tipo 1, también llamada Cu/ZnSOD o SOD del citosol, es una enzima que se encuentra en el citosol de las células. La superóxido dismutasa de tipo 2, MnSOD, se encuentra en las mitocondrias de las células. La Solicitante constató de un modo totalmente sorprendente que el extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante era particularmente eficaz para aumentar la síntesis de MnSOD por una vía transcripcional que implica el aumento de producción del ARN mensajero, precursor de su síntesis proteica.

También una variante de la invención se relaciona con la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa de tipo 2 (MnSOD).

En las composiciones según la invención, se puede utilizar de un 0,001 a un 10%, y en particular de un 0,01 a un 1%, en peso de extracto seco de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante con respecto al peso de la composición.

En formas de aplicaciones particulares de tipo balneoterapia, se pueden también contemplar aplicaciones de lisados bacterianos nativos o reconstituidos en proporciones superiores, que pueden alcanzar el 100%.

- . la vitamina E (tocoferol) y sus derivados, entre otros acetato, linoleato o nicotinato, preferentemente a concentraciones del orden del 0,1 al 5%;
- . el γ -orizanol (del 0,1 al 5%);
- . los pidolatos de lisina o de arginina (del 0,5 al 10%);

- 5 . los extractos vegetales, tales como el extracto de melisa (del 0,01 al 2%), el extracto de silimarina (del 0,01 al 2%), el extracto de *Gingko biloba* (del 0,05 al 2%), el extracto de salvia (del 0,05 al 2%), el extracto de nuez de cola (del 0,05 al 2%), el extracto de rutina (del 0,1 al 2%) o el extracto de tomillo (del 0,1 al 2%), siendo dados los % en materia seca;
- 5 . el licopeno en forma purificada o bien en un extracto (por ejemplo, pasta de tomate titulada en licopeno que da lugar a una concentración final de licopeno comprendida entre un 10⁻⁷% y un 10% y más preferiblemente entre un 10⁻⁷% y un 0,1%);
- 10 . los oligómeros proantocianolídicos de pino, de espino blanco o de uva (del 0,1 al 2%);
- 10 . el di-terc-butilhidroxibencilidenalcanfor (del 0,1 al 2%);
- 10 . el té verde (del 0,1 al 2%);
- 10 . la cafeína (del 0,1 al 5%);
- 10 . el glicerol (del 2 al 30%);
- 10 . el manitol (del 2 al 30%);
- 15 . la carnosina (del 0,1 al 2%);
- 15 . la superóxido dismutasa (de 100 a 10.000 UI/100 g);
- 15 . la guanosina (del 0,01 al 1%);
- 15 . las microalgas que contienen etoxiquina, tales como el *Hematococcus* (del 0,005 al 1%);
- 15 . el aminotrimetilenfosfonato pentasódico (del 0,001 al 0,5%);
- 20 . la lactoperoxidasa (del 0,01 al 0,1%), y
- 20 . la lactoferrina (del 0,01 al 0,1%).

También se puede utilizar una mezcla de varios agentes antioxidantes.

- 25 También se pueden citar agentes antirradicales, en particular los bioflavonoides; la coenzima Q10 o ubiquinona; ciertas enzimas, como la catalasa, la glutatión peroxidasa y las quinonas reductasas; el glutatión; el bencilidenalcanfor; las bencilciclanonas; las naftalenonas substituidas; los pidolatos; el fitantriol; los lignanos; y la melatonina.

30 Preferentemente, el agente antioxidante es el licopeno.

- 30 En otro modo de realización según la invención, el agente antioxidante es una superóxido dismutasa. Se podrá, por ejemplo, utilizar la enzima SOD extraída de eritrocitos de buey (Markovitz, J. Biol. Chem. 234, p. 40, 1959), de *Escherichia coli* (Keele y Fridovich, J. Biol. Chem., 245, p. 6176, 1970) o también de cepas bacterianas marinas (FR-A-2.225.443).

35 La presente invención se relaciona igualmente con la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o limitar la formación de radicales libres y/o eliminar los radicales libres presentes en las células.

40 Otro objeto de la invención se relaciona con la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o luchar contra los efectos nefastos de los UV y/o de la polución sobre la piel.

45 Clínicamente, los efectos nefastos de los UV y/o de la polución sobre la piel se traducen generalmente en un envejecimiento acelerado, es decir, en la aparición de arrugas y de pequeñas arrugas, en una relajación de los tejidos cutáneos y subcutáneos, en una pérdida de la elasticidad cutánea y en una atonía de la textura de la piel. La pérdida de firmeza y de tonicidad de la piel, como las arrugas y las pequeñas arrugas, se explica al menos en parte por una atrofia dérmica, así como por un aplanamiento de la unión dermoepidérmica; la piel está menos firme y más flácida y el espesor de la epidermis disminuye.

50 Además, el color de la piel generalmente se modifica; aparece más pálido y más amarillo. Este fenómeno parece debido esencialmente a una desorganización de la microcirculación (menos hemoglobina a nivel de la dermis papilar). Otro signo clínico del envejecimiento es el aspecto seco y áspero de la piel, que se debe esencialmente a una descamación más importante; estas escamas, al difractar los rayos luminosos, participan también en el aspecto un poco gris del color. Además, aparecen numerosas manchas de color y/o más oscuras en la superficie de la piel, y más especialmente sobre las manos, confiriendo a la piel una heterogeneidad. En general, estas manchas se deben a una producción importante de melanina en la epidermis y/o la dermis de la piel. Por otra parte, pueden existir sobre determinadas zonas de la piel irritaciones difusas y a veces telangiectasias. Algunos de estos signos están más particularmente ligados al envejecimiento intrínseco o fisiológico, es decir, al envejecimiento ligado a la edad, mientras que otros son más específicos del envejecimiento extrínseco, es decir, del envejecimiento provocado de una manera general por el medio ambiente; se trata más particularmente del fotoenvejecimiento debido a la exposición al sol, la luz o cualquier otra radiación.

Así, el objeto de la invención está particularmente adaptado a la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o tratar la pérdida de firmeza y/o de elasticidad de la piel. Tal utilización permite especialmente a la piel recobrar un aspecto uniformemente liso.

5 Otro objeto de la invención es la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o tratar la tez apagada.

10 La invención está igualmente adaptada a la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o tratar la deshidratación cutánea.

15 De un modo más general, el objeto de la invención está igualmente adaptado a la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o tratar los signos del envejecimiento cutáneo.

20 Por signos del envejecimiento cutáneo, se entienden más particularmente las manchas pigmentarias y/o las manchas de hiperqueratosis y/o la atrofia epidérmica y/o la rugosidad cutánea y/o la sequedad cutánea.

25 Como se ha explicado anteriormente, un efecto indeseable de la presencia de radicales libres en la piel es que provocan un fenómeno de peroxidación de los lípidos. Con la edad (más particularmente a partir de cuarenta años), la acumulación de estos lípidos peroxidados es responsable de malos olores corporales, tales como un olor rancio (Haze S. et al., J. Invest. Dermatol. 2001, 116(4): 520-4).

El objeto de la invención está adaptado a la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para prevenir y/o limitar y/o eliminar la peroxidación de los lípidos cutáneos.

30 Así, el objeto de la invención es igualmente útil para prevenir y/o limitar y/o eliminar los malos olores corporales.

35 En el caso particular de la exposición de la piel al sol, parece que una exposición moderada a los UVA y UVB induce en un primer tiempo una disminución de las SOD cutáneas (Leccia et al., Exp. Dermatol. 2001, 10(4): 272-9). Cinco días después de esta exposición, se constata un efecto de rebote, con una elevación de la actividad de las SOD. Así, es necesario un período transitorio para la instauración de un sistema protector antioxidante cutáneo.

40 Por su capacidad para aumentar la síntesis endógena de SOD, el extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante permite acelerar la instauración del sistema protector antioxidante cutáneo y prepara la piel para una exposición solar.

La utilización cosmética según la invención de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable está también particularmente bien adaptada para preparar la piel para una exposición solar.

45 En particular, la preparación de la piel para una exposición solar podrá realizarse por aplicación diaria sobre la piel de dicha composición cosmética durante una semana antes de la exposición solar, y preferentemente durante dos semanas, hasta al menos una noche (entre 6 y 18 horas) antes de la exposición solar.

50 La utilización según la presente invención es igualmente útil durante y después de la exposición solar para mantener un nivel elevado de síntesis de SOD y para atenuar y/o reparar los daños ligados a la exposición solar, tales como los enrojecimientos, las irritaciones cutáneas y las sensaciones de calentamiento de la piel.

55 El objeto de la invención podrá igualmente consistir en la utilización cosmética de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable para atenuar y/o reparar los enrojecimientos y/o las irritaciones cutáneas y/o las sensaciones de calentamiento de la piel provocados por una exposición solar.

60 Preferiblemente, la composición cosmética utilizada según la presente invención está adaptada a una aplicación tópica.

La utilización de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición cosmética según la invención podrá igualmente presentarse en forma de un tónico capilar para revitalizar el cuero cabelludo y mejorar el aspecto de la cabellera.

- 5 En otra variante de la invención, la utilización de un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición cosmética es aplicada sobre las uñas para revitalizarlas. En tal aplicación, la composición cosmética podrá, por ejemplo, presentarse en forma de un esmalte o de un gel o de una crema de masaje para las uñas.
- 10 Otro objeto de la presente invención se relaciona con la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a aumentar la síntesis endógena de superóxido dismutasa.
- 15 Así, la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante puede ser también útil para la preparación de una composición dermatológica destinada a prevenir y/o limitar la formación de radicales libres y/o eliminar los radicales libres presentes en las células.
- 20 En particular, la presente invención se relaciona con la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a reparar los daños provocados por una exposición solar, en particular cuando los daños provocados por una exposición solar son un eritema cutáneo o un edema cutáneo.
- 25 La presente invención se relaciona igualmente con la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a prevenir y/o limitar y/o eliminar los fenómenos de oxidación provocados por la colonización de la piel por microorganismos. Preferiblemente, la invención se relaciona con la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a tratar el acné.
- 30 Se ha visto que los tejidos de una piel psoriásica expresaban de manera más importante los ARNm codificantes de la MnSOD y que este fenómeno representaba una respuesta destinada a proteger a las células (Lontz et al., Free Radic. Biol. Med. 1995; 18(2):349-55). Mediante el aumento de la síntesis endógena de MnSOD, la utilización según la invención contribuye al tratamiento de las pieles psoriásicas. El objeto de la invención está también adaptado a la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a tratar la psoriasis.
- 35 Por otra parte, un estudio sobre un modelo de carcinogénesis de la piel que comparaba la evolución de tumores en ratones transgénicos que expresaban la MnSOD en la piel y en ratones salvajes, mostró que la expresión de MnSOD tenía como consecuencia la inhibición del desarrollo de los tumores (Zhao et al., Cancer Res. 2001, 61(16):6082-8). El objeto de la invención está también adaptado a la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a inhibir el desarrollo de los tumores cancerosos cutáneos.
- 40 La presente invención se relaciona igualmente con la utilización de al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante para la preparación de una composición dermatológica destinada a prevenir y/o curar los signos del envejecimiento epidérmico. Estos signos del envejecimiento cutáneo son especialmente las manchas pigmentarias y/o las manchas de hiperqueratosis y/o la atrofia epidérmica y/o la rugosidad cutánea y/o la sequedad cutánea.
- 45 En otra variante, la presente invención se relaciona con una composición que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante, preferentemente un extracto de *Vitreoscilla filiformis*, y licopeno.
- 50 El licopeno es un pigmento natural que se encuentra en los frutos maduros, particularmente en el tomate. Pertenece a la familia de los carotenoides y su estructura es próxima a la del β -caroteno.
- El papel del licopeno en la maduración de los frutos es conocido en la técnica anterior.
- 55 El licopeno es utilizado en composiciones con actividad bronceadora por su papel en la síntesis de melanina (WO 97/47278), en composiciones destinadas al tratamiento de la cabellera y/o del acné por su actividad sobre las 5α -reductasas (JP-2.940.964) o también como agente antirradicales (JP-A-8-283.136).
- 60 El licopeno está igualmente descrito como inhibidor de la expresión de las proteasas de la matriz extracelular, particularmente de las metaloproteinasas, como por ejemplo las colagenasas (EP-A-1.090.628).
- El licopeno puede estar en forma química cis o trans.

Para dar un orden de magnitud, se puede utilizar el licopeno puro en una cantidad que representa de un 10⁻⁷% a un 0,1% del peso total de la composición, y preferiblemente en una cantidad que representa de un 10⁻⁷% a un 10⁻³% del peso total de la composición.

5 Para dar otro orden de magnitud, ciertas pastas de tomate vendidas comercialmente, tales como Lyc-O-Derm® (Lycored), están tituladas al 10% de licopeno puro; se puede, pues, utilizar una cantidad de extracto pastoso de tomate en proporciones del 10⁻⁶% al 10⁻²% de extracto de tomate.

10 En las aplicaciones particulares de balneoterapia, se puede contemplar un contacto con la piel en proporciones en que el extracto de tomate puede ser aplicado puro y alcanzar títulos de licopeno aplicados sobre la piel o las mucosas que pueden ir del 1% al 15%.

encapsulación (véanse, por ejemplo, las solicitudes PCT WO 01/46431 y WO 87/07838 y EP-A-0.397.227).

15 Se pueden utilizar especialmente las lactoperoxidasas, las microperoxidasas de hongos, la mieloperoxidasa, etc... Se sabe que la lactoperoxidasa (abreviada: LPO) es una enzima que se encuentra especialmente en numerosos tejidos y secreciones de mamíferos, que utiliza uno de los numerosos donadores de electrones celulares para reducir los peróxidos orgánicos del tipo ROOH (siendo R un grupo orgánico). La lactoperoxidasa es un producto comercial, vendido especialmente por las Sociedades Sigma y Sederma.

20 También se pueden utilizar peroxidases recombinantes, por ejemplo la LPO recombinante (solicitud de patente WO 91/06639).

25 Finalmente, la composición según la invención puede contener, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un extracto de *Vitreoscilla filiformis*, un compuesto con actividad catalasa y un compuesto con actividad peroxidasa.

Las composiciones utilizadas según la invención pueden presentarse en todas las formas contemplables en el ámbito cosmético, y en particular dermatológico.

30 La composición según la invención está preferentemente adaptada a una aplicación tópica sobre la piel. Puede presentarse en todas las formas galénicas normalmente utilizadas para este tipo de aplicación, especialmente en forma de una solución acuosa u oleosa, de una emulsión de aceite-en-agua o de agua-en-aceite o múltiple, de una emulsión siliconada, de una microemulsión o nanoemulsión, de un gel acuoso u oleoso o de un producto anhidro líquido, pastoso o sólido.

35 Esta composición puede ser más o menos fluida y tener el aspecto de una crema blanca o de color, de una pomada, de una leche, de una loción, de un suero, de una pasta, de una espuma o de un gel. Puede eventualmente ser aplicada sobre la piel en forma de aerosol. Puede igualmente presentarse en forma sólida, y por ejemplo en forma de barra. Puede ser utilizada como producto de cuidado y/o como producto de maquillaje de la piel.

40 Puede incluso tratarse, en las aplicaciones asociadas a la balneoterapia, de un extracto bruto.

45 Para reforzar los efectos antienvjecimiento de la composición según la invención, ésta puede contener, aparte del extracto de bacteria filamentosas no fotosintética y no fructificante antes descrito, al menos un compuesto seleccionado entre: los agentes descamantes y/o hidratantes; los agentes despigmentantes o propigmentantes; los agentes antiglicantes; los agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que impiden su degradación; los agentes estimulantes de la proliferación de los fibroblastos y/o de los queratinocitos o estimulantes de la diferenciación de los queratinocitos; los agentes miorelajantes; los agentes antipolución y/o antirradicales; los agentes adelgazantes; los agentes que actúan sobre la microcirculación; los agentes que actúan sobre el metabolismo energético de las células; los agentes tensores; y sus mezclas.

50 Así, la composición según la invención podrá especialmente contener al menos un principio activo seleccionado entre: los α -hidroxiácidos; el ácido salicílico y sus derivados, tales como el ácido 5-n-octanoilsalicílico; el HEPES; la procisteína; la O-octanoil-6-D-maltosa; la sal disódica del ácido metilglicinodiacético; las ceramidas; los esteroides, tales como la diosgenina y los derivados de la DHEA; el ácido cójico; el N-etiloxicarbonil-4-paraaminofenol; el ácido ascórbico y sus derivados; los extractos de arándano; los retinoides y en particular el retinol y sus ésteres; los polipéptidos y sus derivados acilados; las fitohormonas; los extractos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*; los extractos de algas; los extractos de soja, de altramuz, de maíz y/o de guisante; la alverina y sus sales, en particular el citrato de alverina; el resveratrol; los carotenoides y en particular el licopeno; el tocoferol y sus ésteres; la coenzima Q10 o ubiquinona; las xantinas y en particular la cafeína y los extractos naturales que la contienen; los extractos de rusco y de castaño de Indias; y sus mezclas, sin que esta lista sea limitativa.

60 La composición según la invención puede además contener al menos un filtro UVA y/o UVB. Los filtros solares pueden ser seleccionados entre los filtros orgánicos, los filtros inorgánicos y sus mezclas.

Como ejemplos de filtros orgánicos activos en el UV-A y/o el UV-B, se pueden citar especialmente, designados a continuación por su nombre CTFAs:

- 5 - los derivados del ácido para-aminobenzoico: PABA, Etil-PABA, Etilidihidropropil-PABA, Etilhexildimetil-PABA, vendido especialmente bajo la denominación «ESCALOL 507» por ISP, Gliceril-PABA y PEG-25-PABA, vendido bajo la denominación «UVINUL P25» por BASF;
- 10 - los derivados salicílicos: Homosalato, vendido bajo la denominación «EUSOLEX HMS» por RONA/EM INDUSTRIES, Salicilato de etilhexilo, vendido bajo la denominación «NEO HELIOPAN OS» por HAARMANN & REIMER, Salicilato de dipropilenglicol, vendido bajo la denominación «DIPSAL» por SCHER, y Salicilato de TEA, vendido bajo la denominación «NEO HELIOPAN TS» por HAARMANN & REIMER;
- 15 - los derivados del dibenzoilmetano: Butilmetoxidibenzoilmetano, vendido especialmente bajo la denominación comercial «PARSOL 1789» por HOFFMANN LA ROCHE, e Isopropildibenzoilmetano;
- 20 - los derivados cinámicos: Metoxicinamato de etilhexilo, vendido especialmente bajo la denominación comercial «PARSOL MCX» por HOFFMANN LA ROCHE, Metoxicinamato de isopropilo, Metoxicinamato de isoamilo, vendido bajo la denominación comercial «NEO HELIOPAN E 1000» por HAARMANN & REIMER, Cinoxato, Metoxicinamato de DEA, Metilcinamato de diisopropilo y Etilhexanoato dimetoxicinamato de glicerilo;
- 25 - los derivados de β, β' -difenilacrilato: Octocrileno, vendido especialmente bajo la denominación comercial «UVINUL N539» por BASF, y Etocrileno, vendido especialmente bajo la denominación comercial «UVINUL N35» por BASF;
- 30 - los derivados de la benzofenona: Benzofenona-1, vendida bajo la denominación comercial «UVINUL 400», por BASF, Benzofenona-2, vendida bajo la denominación comercial «UVINUL D50» por BASF, Benzofenona-3 u Oxibenzona, vendida bajo la denominación comercial «UVINUL M40» por BASF, Benzofenona-4, vendida bajo la denominación comercial «UVINUL MS40» por BASF, Benzofenona-5, Benzofenona-6, vendida bajo la denominación comercial «HELISORB 11» por NORQUAY, Benzofenona-8, vendida bajo la denominación comercial «SPECTRA-SORB UV-24» por AMERICAN CYANAMID, Benzofenona-9, vendida bajo la denominación comercial «UVINUL DS-49» por BASF, y Benzofenona-12,
- 35 - los derivados del bencilidenalcanfor: 3-Bencilidenalcanfor, 4-Metilbencilidenalcanfor, vendido bajo la denominación «EUSOLEX 6300» por MERCK, Ácido bencilidenalcanforsulfónico, Metosulfato de alcanforbenzalconio, Ácido tereftalilidencanforsulfónico y Poliacrilamidometilbencilidenalcanfor;
- 40 - los derivados del fenilbencimidazol: Ácido fenilbencimidazolsulfónico, vendido especialmente bajo la denominación comercial «EUSOLEX 232» por MERCK, y Bencimidacilato, vendido bajo la denominación comercial «NEO HELIOPAN AP» por HAARMANN & REIMER;
- 45 - los derivados de la triazina: Anisotriazina, vendida bajo la denominación comercial «TINOSORB S» por CIBA GEIGY, Etilhexiltriazona, vendida especialmente bajo la denominación comercial «UVINUL T150» por BASF, y Dietilhexilbutamidotriazona, vendida bajo la denominación comercial «UVASORB HEB» por SIGMA 3V;
- 50 - los derivados del fenilbenzotriazol: Drometrisol trisiloxano, vendido bajo la denominación «SILATRIZOLE» por RHODIA CHIMIE;
- 55 - los derivados antranílicos: Antranilato de mentilo, vendido bajo la denominación comercial «NEO HELIOPAN MA» por HAARMANN & REIMER;
- 60 - los derivados de imidazolinas: Propionato de etilhexildimetoxibencilidendioxiimidazolina;
- 65 - los derivados del benzalmalonato: Poliorganosiloxano con funciones benzalmalonato vendido bajo la denominación comercial «PARSOL SLX» por HOFFMANN LA ROCHE, y sus mezclas.

Los filtros UV orgánicos más particularmente preferidos son seleccionados entre los compuestos siguientes:

- 5 - Salicilato de etilhexilo,
- Butilmetoxidibenzoilmetano,
- Metoxicinamato de etilhexilo,
- Octocrileno,
- Ácido fenilbencimidazolsulfónico,
- Ácido tereftalilidendialcanforsulfónico,
- 10 - Benzofenona-3,
- Benzofenona-4,
- Benzofenona-5,
- 4-Metilbencilidenalcanfor,
- Bencimidacilato,
- Anisotriazina,
- 15 - Etilhexiltriazona,
- Dietilhexilbutamidotriazona,
- Metilbisbenzotriazoliltetrametilbutilfenol,
- Drometrisol trisiloxano
- y sus mezclas.

20 Los filtros inorgánicos utilizables en la composición según la invención son, en particular, los nanopigmentos (tamaño medio de las partículas primarias: generalmente entre 5 nm y 100 nm y preferentemente entre 10 nm y 50 nm) de óxidos metálicos recubiertos o no, como por ejemplo nanopigmentos de óxido de titanio (amorfo o cristalizado en forma de rutilo y/o anatasa), de hierro, de zinc, de zirconio o de cerio. Son agentes de recubrimiento por otra parte la alúmina y/o el estearato de aluminio. Tales nanopigmentos de óxidos metálicos, recubiertos o no recubiertos, están en particular descritos en las solicitudes de patentes EP-A-0.518.772 y EP-A-0.518.773.

De forma conocida, la composición de la invención puede contener también los adyuvantes habituales en los ámbitos cosmético y dermatológico, tales como los gelificantes hidrofílicos o lipofílicos, los conservantes, los antioxidantes, los solventes, los perfumes, las cargas, los pigmentos, los absorbentes de olor y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las clásicamente utilizadas en los ámbitos considerados, y por ejemplo del 0,01 al 20% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa o en la fase acuosa. Estos adyuvantes, así como sus concentraciones, deben ser tales que no perjudiquen las propiedades ventajosas del extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante.

Como aceites utilizables en la composición de la invención, se pueden citar, por ejemplo:

- 40 - los aceites hidrocarbonados de origen animal, tales como el perhidroescualeno;
- los aceites hidrocarbonados de origen vegetal, tales como los triglicéridos líquidos de ácidos grasos de 4 a 10 átomos de carbono y la fracción líquida de la manteca de karité;
- los ésteres y los éteres de síntesis, especialmente de ácidos grasos, como los aceites de las fórmulas R^1COOR^2 y R^1OR^2 , donde R^1 representa el resto de un ácido graso de 8 a 29 átomos de carbono y R^2 representa una cadena hidrocarbonada, ramificada o no, de 3 a 30 átomos de carbono, como por ejemplo el aceite de Purcellin, el isononanoato de isononilo, el miristato de isopropilo, el palmitato de 2-etilhexilo, el estearato de 2-octildodecilo, el erucato de 2-octildodecilo y el isoestearato de isoestearilo; los ésteres hidroxilados, como el lactato de isoestearilo, el hidroxiestearato de octilo, el hidroxiestearato de octildodecilo, el malato de diisoestearilo, el citrato de triisocetilo y los heptanoatos, octanoatos y decanoatos de alcoholes grasos; los ésteres de poliol, como el dioctanoato de propilenglicol, el diheptanoato de neopentilglicol y el diisononanoato de dietilenglicol; y los ésteres del pentaeritritol, como el tetraisoestearato de pentaeritritol;
- 45 - los hidrocarburos lineales o ramificados, de origen mineral o sintético, tales como los aceites de parafina, volátiles o no, y sus derivados, la vaselina, los polidecenos y el poliisobuteno hidrogenado, tal como el aceite de Parleam;
- los alcoholes grasos de 8 a 26 átomos de carbono, como el alcohol cetílico, el alcohol estearílico y su mezcla (alcohol cetilestearílico), el octildodecanol, el 2-butiloctanol, el 2-hexildecanol, el 2-undecilpentadecanol, el alcohol oleico o el alcohol linoleico;
- 50 - los aceites fluorados parcialmente hidrocarbonados y/o siliconados, como los descritos en el documento JP-A-2-295.912;
- los aceites de silicona, como los polimetilsiloxanos (PDMS) volátiles o no de cadena siliconada lineal o cíclica, líquidos o pastosos a temperatura ambiente, especialmente los ciclopolidimetilsiloxanos (ciclometiconas), tales como el ciclohexasiloxano; los polidimetilsiloxanos que llevan grupos alquilo, alcoxi o fenilo pendientes o en el extremo de la cadena siliconada, grupos que tienen de 2 a 24 átomos de carbono; y las siliconas feniladas, como las feniltrimeticonas, las fenildimeticonas, los feniltrimetilsiloxidifenilsiloxanos, las difenildimeticonas, los difenilmetildifeniltrisiloxanos, los 2-feniletiltrimetilsiloxisilicatos y los polimetilfenilsiloxanos;
- 60

- sus mezclas.

- 5 Como emulsionantes y coemulsionantes utilizables en la invención, se pueden citar, por ejemplo, los emulsionantes Ac/Ag, tales como los ésteres de ácido graso y de polietilenglicol, especialmente el estearato de PEG-100, y los ésteres de ácido graso y de glicerina, tales como el estearato de glicerilo, así como los emulsionantes Ag/Ac, tales como el poli(metilcetil)(dimetil)metilsiloxano oxietilenado disponible bajo la denominación comercial ABIL WE09 de la sociedad Degussa Goldschmidt o la mezcla de estearato de etilenglicol acetilado y de triestearato de glicerilo comercializada por la sociedad Guardian bajo la denominación comercial UNITWIX.
- 10 Como gelificantes hidrofílicos, se pueden citar, en particular, los polímeros carboxivinílicos (carbómeros), los copolímeros acrílicos, tales como los copolímeros de acrilatos/alquilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos, las gomas naturales y las arcillas, y, como gelificantes lipofílicos, se pueden citar las arcillas modificadas, como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos, la sílice hidrofóbica y los polietilenos.
- 15 Como cargas que pueden ser utilizadas en la composición de la invención, se pueden citar, por ejemplo, aparte de los pigmentos, el polvo de sílice; el talco; el almidón entrecruzado por el anhídrido octenilsuccínico comercializado por la sociedad National Starch bajo la denominación DRY FLO PLUS (28-1160); las partículas de poliamida y especialmente las vendidas bajo la denominación ORGASOL por la sociedad Atochem; los polvos de polietileno; las microesferas a base de copolímeros acrílicos, tales como las de copolímero de dimetacrilato de etilenglicol/metacrilato de laurilo vendidas por la sociedad Dow Corning bajo la denominación de POLYTRAP; los polvos expandidos, tales como las microesferas huecas y especialmente las microesferas comercializadas bajo la denominación EXPANCEL por la sociedad Kernanord Plast o bajo la denominación MICROPEARL F 80 ED por la sociedad Matsumoto; las microperlas de resina de silicona, tales como las comercializadas bajo la denominación TOSPEARL por la sociedad Toshiba Silicone; y sus mezclas. Estas cargas pueden estar presentes en cantidades que van del 0 al 20% en peso y preferentemente del 1 al 10% en peso con respecto al peso total de la composición o de la preparación según la invención.
- 20
- 25

EJEMPLOS

- 30 Ejemplo 1 – Preparación de un extracto de *Vitreoscilla filiformis* que contiene lipopolisacáridos

(M. A. Apicella, J. McLeod Grittiss y H. Schneider, 1994, Methods in Enzymology, Vol. 235 (242-252))

Diferentes métodos permiten aislar la fracción de interés que contiene los lipopolisacáridos:

- 35
- el método modificado fenol-agua (Johnson y Perry, 1975, Can. J. Microbial, 22, p. 29) descrito en el párrafo 1;
 - el método de Darveau y Hancock (1983, J. Bact. 155, p. 831), que utiliza el SDS para solubilizar los lipopolisacáridos, lo que permite separarlos del peptidoglicano insoluble; este método está descrito en el
- 40
- párrafo 2. Se eliminan las proteínas de la fracción que contiene los lipopolisacáridos por una digestión enzimática (Pronasa) y se precipita entonces la fracción de lipopolisacáridos en etanol;
 - el método de extracción que utiliza la proteinasa K descrito en el párrafo 3.

1. Técnica del fenol modificada

- 45
- ##### 1.1. Preparación de los lipopolisacáridos brutos

A 5 g de bacterias *Vitreoscilla filiformis* (ATCC 15551) congeladas o desecadas con acetona en forma de polvo, se añaden 25 ml de tampón fosfato de Na 50 mM pH 7 que contiene EDTA 5 mM y se agita la mezcla.

- 50
- Se realizan entonces las etapas siguientes:

- adición de 100 mg de lisozima, agitación durante 1 noche a 4°C y luego incubación a 37°C durante 20 min.;
 - centrifugación durante 3 min. a baja velocidad;
 - ajuste del volumen a 100 ml con tampón fosfato de Na 50 mM pH 7 que contiene MgCl₂ 20 mM;
 - adición de ARNasa y ADNasa (a 1 µg/ml), incubación durante 60 min. a 37°C y luego durante 60 min. a 60°C;
 - se pone la suspensión bacteriana en un baño a 70°C y se le añade igual volumen de fenol al 90% (p/v) precalentado a 70°C;
 - se enfría por agitación durante 15 min. en un baño helado;
 - centrifugación a 18.000 g durante 15 min. a 4°C.
- 55
- 60

Se forma una interfaz marcada entre las fases acuosa y fenólica. La fase acuosa contiene los lipopolisacáridos tras diálisis frente a agua; se liofiliza esta fase.

1.2. Purificación de los lipopolisacáridos brutos

Se centrifugan de 20 a 35 mg de los lipopolisacáridos/ml de agua destilada a baja velocidad (1.100 g, 5 min.). Se centrifuga entonces el sobrenadante obtenido a alta velocidad (105.000 g, 16 h, 4°C). Se suspende la pella en agua y se repite la centrifugación hasta obtener lipopolisacáridos purificados. Se resuspende la pella final en agua y se liofiliza.

2. Método del SDS

Se añaden a 500 mg de células bacterianas de *Vitreoscilla filiformis* (ATCC 15551) desecadas 15 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, 100 µg/ml de ADNasa y 25 µg/ml de ARNasa. Se somete la mezcla bajo una prensa de French 2 veces a 15.000 psi y luego a sonicación, 2 veces a 6 W, 30 segundos.

Se aplican entonces las etapas siguientes:

- adición de ADNasa 200 µg final y ARNasa 50 µg final, incubación a 37°C 2 h;
- adición de 5 ml de EDTA 0,5 M en Tris-HCl 10 mM pH 8, 2,5 ml de SDS al 20% disueltos en Tris-HCl 10 mM y 2,5 Tris-HCl 10 mM pH 8.

El volumen final obtenido es de 25 ml que contienen EDTA 0,1 M; SDS al 2% y Tris-HCl 10 mM pH 9,5; se agita la mezcla vorticialmente y se centrifuga a 50.000 g durante 30 min. a 20°C.

Se decanta el sobrenadante. Se desecha el sedimento que contiene el peptidoglicano. Se añade la pronasa al sobrenadante a una concentración final de 200 µM, seguido de una incubación a 37°C durante 1 noche bajo agitación (si se forma un precipitado, se elimina centrifugando a 1.000 g durante 10 min.).

Se precipitan los lipopolisacáridos en etanol al 95% (v/v) que contiene 0,376 M de MgCl₂-70°C y se centrifuga después (12.000 g, 15 min., 4°C).

Se suspende la pella obtenida en 25 ml de SDS al 2%, EDTA 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, se sonica y se incuba después a 85°C durante 10 a 30 min. Después de enfriar, se ajusta la solución a pH 9.5.

Se añade la pronasa a 25 µg/ml y se incuba a 37°C durante 1 noche bajo agitación.

Se precipitan de nuevo los lipopolisacáridos en etanol al 95% (v/v) que contiene 0,376 M de MgCl₂ y se centrifugan después (12.000 g, 15 min., 4°C). Para retirar los cristales insolubles de Mg²⁺-EDTA, se resuspende la pella en 15 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, se sonica y se centrifuga (1.000 g, 5 min.). Se centrifuga entonces el sobrenadante (200.000 g, 2 h, 15°C) en presencia de MgCl₂ 25 mM. Se suspende la pella que contiene los lipopolisacáridos en agua destilada.

3. Extracción de los lipopolisacáridos utilizando la proteinasa K (Zanen y, 1988, FEMS Microbiology Letters 50, 85-88).

A 1,5 g de células de *Vitreoscilla filiformis* (ATCC 15551) liofilizadas, se añaden 30 ml de tampón que contiene un 2% de SDS, un 5% de 2-mercaptoetanol, un 10% de glicerol y Tris-HCl 0,25 M pH 6,8.

Se incuba la mezcla durante 15 a 30 min. a 100°C y se centrifuga (10.000 g, 30 min., 4°C). Se recupera el sobrenadante (20 ml), se añaden 12 mg de proteinasa K, se incuba a 60°C durante 1 h y se precipitan los lipopolisacáridos en etanol al 95% (v/v) que contiene 0,376 M de MgCl₂ a -20°C durante una noche, se vuelven a precipitar los lipopolisacáridos en etanol al 95% (v/v) en las mismas condiciones que antes, se suspende la pella obtenida en 10 ml de agua, se dializa y se liofiliza después.

Ejemplo 2 - Formulaciones

Composición 1 - Crema regeneradora

5	- Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	0,1%
	- Carbomer 940® (ácido poliacrílico entrecruzado)	0,3%
	- Trietanolamina	0,3%
	- Ácido esteárico	3,0%
	- Alcohol cetílico	2,0%
10	- Monoestearato de glicerol autoemulsionable	3,0%
	- Aceite de soja	10,0%
	- Alcohol de lanolina	2,0%
	- Miristato de isopropilo	4,0%
	- 2-Etilhexanoato de cetilo y de estearilo	4,0%
15	- Perhidroescualeno	3,0%
	- Parafina	2,0%
	- Glicerina	3,0%
	- Conservantes	0,3%
20	- Agua	csp 100

Para preparar esta crema, se calienta la fase acuosa que contiene la glicerina, los conservantes y el agua a 80°C; se dispersa en ella el Carbomer 940, que se neutraliza a continuación con la trietanolamina. Se introduce la fase grasa, calentada y homogeneizada a 80°C, bajo agitación viva en la fase acuosa. Se dispersa el extracto del ejemplo en 10 g de agua y se introduce a 40°C en la crema bajo agitación. Se enfría el conjunto hasta la temperatura ambiente. Se aplica esta crema sobre la piel de la cara y del cuello una o dos veces al día. Permite especialmente, tras utilización durante varios días, aumentar la regeneración de la epidermis y dar un aspecto de piel más joven.

Composición 2 - Gel para el cuidado de la cara

30	Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	0,05%
	Hidroxipropilcelulosa (Klucel H, vendida por la sociedad Hercules)	1,00%
	Antioxidante	0,05%
	Isopropanol	40,00%
	Conservante	0,30%
35	Agua	csp 100%

Se obtiene este gel por mezcla de los constituyentes en agua con adición en último lugar del gelificante.

Como para la composición 1, se puede aplicar dos veces al día; está particularmente adaptado para una aplicación por la mañana, ya que no deja la piel grasa.

Composición 3 – Crema regeneradora

45	- Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	1,0%
	- Conservantes	0,85%
	- Alcohol	5,0%
	- Acetato de tocoferilo	1,0%
	- EDTA disódico	0,05%
	- PEG-20 sesquiestearato de metilglucosa	2,0%
50	- Glicerina	7,0%
	- Polímero de acrilato	0,25%
	- Colesterol	0,1%
	- Ciclohexasiloxano	3,5%
	- Escualano	9,5%
55	- Agua y extracto de <i>Fagus sylvatica</i>	2,0%
	- Ceramida	0,05%
	- Poliacriloldimetiltaurato de amonio	2,2%
	- Proteína de altramuz hidrolizada	1,0%
	- Aceites vegetales	6,0%
60	- Policaprolactona y extracto de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) (licopeno)	1,0%
	- Copolímero de divinildimeticona/dimeticona (y) pareth-3 C ₁₂₋₁₃ (y) pareth-23 C ₁₂₋₁₃	2,0%
	- Agua	csp 100

Esta crema está preferiblemente destinada a ser aplicada diariamente por la tarde después de limpiar la piel. Esta crema permite rápidamente a la piel estar mejor hidratada y más flexible, vuelve luminosa y uniforme a la tez y tiene un efecto tensor que difumina las arrugas y las pequeñas arrugas y alisa la piel.

5

Composición 4 - Fluido regenerador para el día

	- Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	1,0%
	- Octildodecanol	0,1%
10	- Conservantes	0,75%
	- Acetato de tocoferilo	1,0%
	- PEG-20 sesquiestearato de metilglucosa	3,0%
	- Hialuronato de sodio	0,1%
	- Glicerina	7,0%
15	- Ciclohexasiloxano	9,5%
	- Agua y extracto de <i>Fagus sylvatica</i>	1,0%
	- Poliacriloildimetiltaurato de amonio	1,0%
	- Ciclopentasiloxano (y) dimeticonol	7,5%
	- Proteína de altramuz hidrolizada	1,0%
20	- Policaprolactona y extracto de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) (licopeno)	1,0%
	- Aceites vegetales	3,0
	- Copolímero de divinildimeticona/dimeticona (y) pareth-3 C ₁₂₋₁₃ (y) Pareth-23 C ₁₂₋₁₃	2,0%
25	- Agua	csp 100

Este fluido puede ser aplicado diariamente mañana y tarde. Como para la crema anterior, este fluido mejora el aspecto visual de la piel y de la tez gracias a una mejor hidratación y a un efecto tensor.

30

Composición 5 – Crema de cuidado del eritema solar (emulsión de aceite-en-agua)

	Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	0,75%
	Estearato de glicerol	2,00%
	Polisorbato 60 (Tween 60, vendido por la sociedad ICI)	1,00%
35	Ácido esteárico	1,40%
	Ácido glicirretínico	2,00%
	Trietanolamina	0,70%
	Carbómero	0,40%
	Fracción líquida de la manteca de karité	12,00%
40	Aceite de girasol	10,00%
	Licopeno	0,05%
	Perfume	0,50%
	Conservante	0,30%
	Agua	csp 100%

45

Esta crema deberá ser aplicada dos veces al día durante al menos dos días y luego una vez al día hasta la completa desaparición del eritema. Gracias a tal aplicación, la piel recobra más rápidamente su aspecto normal.

Composición 6 - Filtro solar

50	Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	3,5%
	Mezcla de alcohol cetilestearílico y de alcohol cetilestearílico oxietilenado (33 OE) 80/20	7,0%
	Mezcla de mono- y de diestearato de glicerol	2,0%
	Alcohol cetílico	1,5%
55	Polidimetilsiloxano	1,5%
	Aceite de vaselina	15,0%
	Butilmetoxidibenzoilmetano	3,0%
	Octocrileno	7,0%
	Glicerina	20,0%
60	Agua desmineralizada	csp 100%

La aplicación de esta crema deberá preceder a la exposición al sol y ser renovada cada dos horas. Tal aplicación previene los daños que puedan estar provocados por el sol y acelera la reparación de estos eventuales daños.

Composición 7 – Composición para preparar la piel para el sol
(se indican los ingredientes bajo sus denominaciones CTFA)

5	Extracto del ejemplo 1 (extracto liofilizado obtenido según el método 3)	0,5%
	Conservantes	1,35%
	Citrato de sodio	0,035%
	PEG-40	1,25%
	Tetraetilhexanoato de pentaeritriilo	4%
10	Glicerina	7%
	Triestearato de sorbitán	0,3%
	Aceite de hueso de <i>Prunus armeniaca</i> (albaricoque)	2%
	Alcohol cetílico	0,7
	Propilenglicol	2%
15	Trietanolamina	0,4%
	Ciclohexasiloxano	2%
	Carbómero	0,75%
	Tocoferol	1%
	Sílice	2%
20	Ascorbilglucósido	0,1%
	Agua – dióxido de titanio - sílice – alúmina	3%
	Policaprolactona – beta-caroteno	5%
	Agua	csp
		100%

25 La aplicación diaria de esta composición al menos una semana antes de la exposición solar disminuye los riesgos de eritemas, de quemaduras y de edema (en particular, si se protege la piel con la composición 4 durante la exposición solar) y permite la obtención de un bronceado de mejor calidad y más duradero.

30 Ejemplo 3 – Medición del aumento de la síntesis de MnSOD

I. Material y métodos.

- Cultivos celulares y tratamiento:

35 Se realizan los estudios sobre fibroblastos normales humanos y sobre queratinocitos epidérmicos humanos normales en cultivo.

40 Se cultivan los fibroblastos dérmicos en medio DMEM (Life Technology, ref. 21969035) que contiene L-glutamina (2 mM, Life Technology, ref. 25030024), penicilina a 50 UI/ml y estreptomycin a 50 µg/ml (Life Technology, ref. 15070063) y suero de ternera fetal al 1% (v/v, Life Technology, ref. 10106151).

Se cultivan los queratinocitos en medio SFM sin extracto pituitario y EGF.

45 Se aplicó el extracto de *Vitreoscilla filiformis* obtenido aplicando el método 3 del ejemplo 1 sobre las células a una concentración del 0,1% (P/V). El tiempo de contacto fue de 24 ó 48 horas.

- Matriz de ADNc:

50 La metodología utilizada es la preconizada por Clontech (Palo Alto, USA). La extracción/purificación del ARN total de cada cultivo condujo al aislamiento de cantidades de ARN total del orden de 100 a 150 µg. Se tratan las soluciones de ARN total con la ADNasa I para eliminar cualquier traza de ADN contaminante, según las recomendaciones del proveedor. Se verificó entonces la calidad del ARN en gel de agarosa y se ajustaron las soluciones de ARN a 1 µg/ml.

55 La etapa siguiente fue la purificación de los ARN mensajeros (ARNm) por hibridación de los extremos poli(A) de los ARNm a cebadores oligo(dT) biotinilados y captura selectiva sobre perlas de estreptavidina, según el protocolo Atlaspure (Clontech). Se prepararon las sondas de ADN marcadas con ³³P por transcripción inversa de los ARNm unidos sobre perlas de poli(dT), con ayuda de un pool de cebadores específicos de las secuencias inmovilizadas sobre las «matrices», en presencia de (α³³P)-dATP. Esta etapa utilizó los reactivos y el protocolo preconizado por Clontech. Se purificaron las sondas marcadas por cromatografía en columna de exclusión y se evaluó la calidad y la equivalencia de las sondas marcadas por recuento de centelleo líquido.

60 Se pretrataron membranas de matriz de ADNc que llevaba 1.176 genes y se hibridaron después los ADNc inmovilizados sobre cada membrana (68°C, una noche) a las sondas marcadas correspondientes. Se lavaron

entonces los filtros extensamente y se colocaron en bolsas de plástico individuales para análisis. El análisis tuvo lugar por cuantificación directa de la radioactividad de las manchas con un PhosphorImager Cyclone (Packard). Se expresan los resultados en unidades relativas de expresión (RE, radioactividad de la mancha correspondiente a cada gen, corregida con respecto al ruido de fondo y a las diferencias de intensidad de marcaje de las sondas).

5

- RT- Q- PCR:

Los pares de cebadores utilizados en este estudio son el precursor de la Mn⁺ superóxido dismutasa 2 (tamaño del fragmento amplificado: 259 pb) y la superóxido dismutasa 1 citosólica (tamaño del fragmento amplificado: 298 pb).

10

Se extraen los ARN totales con Tri-Reagent según el protocolo preconizado por el proveedor. Esto va seguido de una nueva extracción con cloroformo y de una precipitación con isopropanol. Se eliminan las trazas de ADN potencialmente contaminantes por tratamiento con el sistema DNA-free (Ambion). Se realiza a continuación la reacción de transcriptasa inversa en presencia del cebador oligo(dT) y de la enzima Superscript II (Gibco). Esta etapa va seguida de una cuantificación por fluorescencia del ADNc sintetizado y ajuste de las concentraciones a 150 ng/ml. Se realiza una nueva cuantificación de cada ADNc, tras dilución final, antes de la reacción de PCR.

15

Se realizaron las reacciones de PCR (polymerase chain reaction) por PCR cuantitativa con el sistema «Light Cycler» (Roche Molecular Systems Inc.) y según los procedimientos recomendados por el proveedor. La mezcla de reacción (10 µl finales) introducida en los capilares de un termociclador está compuesta por 2,5 µl de ADNc, cebadores de los dos marcadores, mezcla de reacción (Roche) que contiene la enzima taq ADN polimerasa y el marcador SYBR Green I. Las condiciones de la PCR son las siguientes: activación de 10 min. a 95°C, reacciones de PCR en 40 ciclos, fusión 5 segundos a 95 °C y luego 5 segundos a 60 °C.

20

Se mide el análisis de fluorescencia en el ADN amplificado de forma continua en el curso de los ciclos de PCR. Se expresa el valor medio de la expresión relativa (ER) en Unidades Arbitrarias (UA) calculadas a partir de los valores de ciclos de dos PCR independientes según la fórmula siguiente: $(1/2^{\text{número de ciclos}}) \times 10^6$.

25

Se comparan los resultados de la expresión de SOD con la de la actina con el fin de tener en cuenta las eventuales diferencias de concentración celular en las dos poblaciones celulares.

30

- Estudio de citometría de flujo:

Se precultivan las células a alta densidad durante 48 horas y se tratan o no después con el producto de ensayo durante 24 ó 48 horas. Se tripsinizan las células y se lavan después con una solución de PBS/SVF al 2%. Se transfieren las células a tubos Eppendorf y se centrifugan durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se fijan las células con una solución de PBS-formol al 4% final durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se permeabilizan después con una solución de Tritón-X100 al 0,1%/citrato al 0,1%. Se realiza el marcaje de las células en presencia de anticuerpos anti-MnSOD (TEBU SOD-110) y anti-Cu/Zn SOD (TEBU SOD-100) según las indicaciones del proveedor. Se realiza el marcaje secundario con el anticuerpo secundario-FITC (TEBU L 42001) según las indicaciones del proveedor. Se realiza el análisis de las muestras por citometría (citómetro FACSCAN, logicial Cell Quest; Becton-Dickinson) sobre la población total. Se realizan las estadísticas sobre 10.000 células de cada muestra. Se expresan los resultados en intensidad de fluorescencia (IF) correspondiente a la cantidad relativa de cada marcador por célula en una población total de 10.000 células analizadas.

35

40

45 II. Resultados

2.1) Estudio de macromatriz de ADNc

2.1.1) Sobre cultivo de queratinocitos humanos

50

Genes	Población control	Población expuesta al extracto	Comparación de la población control y de la población expuesta al extracto (en %)
Precursor de Mn ⁺ SOD2 (SOD2)	1,3	3,3	244
SOD1 citosólica (SOD1)	4,9	6,8	138

Se constata que la población celular constituida por queratinocitos expuesta al extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante contiene significativamente más ARNm de SOD2 que la población control, mientras que la cantidad de ARNm de SOD1 no está más que moderadamente aumentada.

2.1.2) Sobre cultivo de fibroblastos humanos

Gene	Población control	Población expuesta al extracto	Comparación de la población control y de la población expuesta al extracto (en %)
Precursor de Mn+ SOD2 (SOD2)	1,9	9,3	481

5 De la misma forma que para los queratinocitos, una población celular constituida por fibroblastos expuesta a un extracto de bacteria filamentososa no fotosintética y no fructificante contiene cerca de 5 veces más ARNm de SOD2 que la población control.

2.2) Estudio de PCR

10

Los resultados siguientes son los obtenidos en cultivo de queratinocitos humanos.

2.2.1) Resultados sobre la superóxido dismutasa citosólica 1 (SOD1)

Tratamiento	Ciclos actina	Ciclos SOD1	ER*Actina (UA)	ER*SOD1 (UA)	SOD1/Actina	% Control
Control	16,12	20,12	13,99	0,93	6,64 10 ⁻²	100
	16,13	19,96				
Extracto VF	16,23	20,02	12,88	0,94	7,28 10 ⁻²	110
	16,26	20,03				

(VF: *Vitreoscilla filiformis*)

15

Estos resultados confirman los observados en el punto 2.1.1., es decir, que la exposición de una población de queratinocitos al extracto de bacteria preparado según el método 3 no provoca inducción de la transcripción de SOD1.

2.2.2) Resultados sobre la Mn+ superóxido dismutasa (SOD2)

20

Tratamiento	Ciclos actina	Ciclos SOD2	ER*Actina (UA)	ER*SOD2 (UA)	SOD2/Actina	% Control
Control	20,78	26,45	0,55	0,01	2,37 10 ⁻²	100
	20,80	25,97				
Extracto VF	20,79	23,65	0,51	0,09	1,79 10 ⁻²	755
	21,02	23,16				

(VF: *Vitreoscilla filiformis*)

25

Estos resultados confirman igualmente los del punto 2.1.1.: la cantidad de ARNm codificante de la SOD2 es muy superior en la población celular que fue expuesta al extracto bacteriano.

2.3) Estudio de citometría de flujo

Los resultados siguientes son los obtenidos en cultivo de queratinocitos humanos.

2.3.1) Resultados sobre la superóxido dismutasa citosólica 1 (SOD1)

30

Cantidad relativa de Cu/Zn SOD en queratinocitos control y en queratinocitos tratados con el extracto (0,1%, P/V) durante 24 horas.

Tratamiento	IF	Desviación típica	Número de muestra	%	p
Control	180,9	15,3	3	100	-
Extracto VF	217,8	7,3	3	120	P<0,01
(VF: <i>Vitreoscilla filiformis</i>)					

5 Se observa que, si bien la exposición al extracto VF no induce una transcripción de ARNm de SOD1, su expresión está estadísticamente aumentada (+20%).

2.3.2) Resultados sobre la Mn superóxido dismutasa (SOD2)

10 Cantidad relativa de MnSOD en queratinocitos control y tratados con el extracto (0,1%) durante 48 horas.

Tratamiento	IF	Desviación típica	Número de muestra	%	p
Control	20,2	2,6	3	100	-
Extracto VF	28,1	1,8	3	139	P<0,01
(VF: <i>Vitreoscilla filiformis</i>)					

Estos ensayos muestran también un aumento de la concentración celular de SOD2 (+39%) tras exposición al extracto VF.

15 La observación de estos ensayos conduce a la conclusión de que los fibroblastos expuestos a la presencia del extracto obtenido en el ejemplo 1 expresan intensamente los ARN mensajeros codificantes de la MnSOD (2.1. y 2.2.) y esta inducción pudo ser confirmada por la observación de un aumento de la presencia proteica de MnSOD (2.3.), en particular a nivel de las mitocondrias (visualizado por observaciones microscópicas).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización cosmética de un aislado de lipopolisacáridos de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable como agente que aumenta la síntesis endógena de superóxido dismutasa:
- para prevenir y/o luchar contra los efectos nefastos de la polución sobre la piel,
 - para prevenir y/o tratar la tez apagada,
 - para prevenir y/o tratar la deshidratación cutánea,
 - 10 - para prevenir y/o limitar y/o eliminar la peroxidación de los lípidos cutáneos,
 - para preparar la piel para la exposición solar,
 - para atenuar y/o reparar los enrojecimientos y/o las irritaciones cutáneas y/o las sensaciones de calentamiento de la piel provocados por una exposición solar, o
 - cuando dicha composición es aplicada sobre las uñas, para revitalizarlas, mediante la prevención y/o la limitación de la formación de radicales libres y/o la eliminación de los radicales libres presentes en las
 - 15 células.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por ser la bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante *Vitreoscilla filiformis*.
- 20 3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por estar el extracto de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante asociado a al menos un agente antioxidante.
4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por ser el agente antioxidante el licopeno.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 3 ó 4, caracterizada por ser el agente antioxidante una superóxido dismutasa.
6. Utilización según la reivindicación 1, para prevenir y/o limitar y/o eliminar los malos olores corporales, a condición de que dicho aislado sea utilizado para prevenir y/o limitar y/o eliminar la peroxidación de los lípidos cutáneos.
- 30 7. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por estar adaptada la composición a una aplicación tópica.
8. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7, caracterizada por ser la composición un tónico capilar para revitalizar el cuero cabelludo y mejorar el aspecto de la cabellera.
- 35 9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por contener la composición de un 0,001 a un 10% en peso de extracto seco de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante con respecto al peso total de la composición.
- 40 10. Composición que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un aislado de lipopolisacáridos de bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante y de un 10⁻⁷% a un 10⁻³% en peso de licopeno puro con respecto al peso total de la composición.