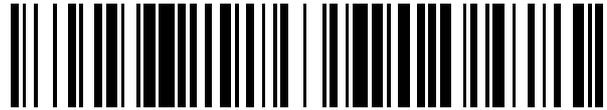


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 671**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2008 E 08151907 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1974719**

54 Título: **Medio condicionado de cultivo de células del tracto digestivo y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

26.02.2007 FR 0753496

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

06.06.2014

73 Titular/es:

**L'ORÉAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

GUENICHE, AUDREY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 465 671 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

Medio condicionado de cultivo de células del tracto digestivo y sus utilidades

5 La presente invención se refiere a medios de cultivo condicionados y a sus utilidades, en particular en el campo cosmético o dermatológico. Se refiere así al tratamiento y a la prevención de los síntomas de la irritación, de la inflamación o de los trastornos inmunológicos por tales medios condicionados, sus extractos, o las composiciones que los contienen. La invención se refiere igualmente a una composición que comprende la asociación de al menos un compuesto cosmético o farmacéutico susceptible de provocar una irritación de la piel y de al menos un medio de cultivo condicionado o de uno de sus extractos según la invención.

10 La piel humana está constituida por dos compartimentos, a saber un compartimento superficial, la epidermis, y un compartimento profundo, la dermis.

15 La epidermis está compuesta principalmente de tres tipos de células que son los queratinocitos (mayoritarios), los melanocitos y las células de Langerhans. Cada uno de estos tipos celulares contribuye, por sus funciones propias, al papel esencial desempeñado en el organismo por la piel, en particular el papel de protección del organismo frente a las agresiones exteriores. La dermis proporciona a la epidermis un soporte sólido. Es igualmente su elemento nutricional. Está principalmente constituida por fibroblastos y por una matriz extracelular compuesta en sí misma principalmente por colágeno, elastina y por una sustancia fundamental. Se encuentra también en ella los leucocitos, los mastocitos y los macrófagos tisulares. Finalmente, la dermis es atravesada por vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

20 La piel constituye una barrera contra las agresiones exteriores, en particular: químicas, mecánicas e infecciosas, y para ello, se producen a su nivel un cierto número de reacciones de defensa contra los factores medioambientales (clima, rayos ultravioletas, tabaco, poluciones, infecciones, etc.) y/o los xenobióticos (como por ejemplo algunos medicamentos).

Por lo tanto, es esencial preservar o restablecer su integridad y el equilibrio de sus diferentes funciones, en particular un equilibrio entre los procesos de renovación y de diferenciación celular, o un grado de hidratación óptimo.

25 La irritación cutánea está clásicamente definida como una reacción inflamatoria local, reversible y no inmunológica, caracterizada por un edema y un eritema inducido después de un contacto simple o repetido de una sustancia química con la piel. La dermatitis irritante de contacto (DIC) aguda está principalmente caracterizada por una inflamación, mientras que la DIC crónica está caracterizada por una hiperproliferación de los queratinocitos y una hiperqueratosis transitoria. La DIC es una enfermedad multifactorial cuya activación depende al mismo tiempo de factores intrínsecos y extrínsecos. La edad, la base genética, el sexo son todos factores que pueden influir sobre el desarrollo de esta patología. Además, los efectos de los irritantes están directamente relacionados con sus propiedades químicas y con las concentraciones aplicadas que influyen en la adsorción cutánea.

30 La irritación de la piel es un fenómeno muy importante, ya que representa aproximadamente entre el 60% y el 80% de los casos clínicos de dermatitis de contacto. La mayoría de los otros casos representan unas dermatitis alérgicas de contacto.

35 Las sustancias que pertenecen a diferentes familias de productos químicos muy diferentes, como los disolventes queratínicos, los agentes deshidratantes o los agentes oxidantes o reductores, pueden ser considerados como irritantes. A causa de esta heterogeneidad, es muy difícil proponer un método para discriminar un producto irritante basándose en su estructura química. Diferentes irritantes pueden inducir a diferentes tipos de inflamaciones. Además de sus efectos corrosivos, que inducen la liberación de mediadores de la inflamación preformados, los productos químicos pueden alterar las funciones celulares o inducir la activación de las células cutáneas de la inmunidad innata. Resulta de ello la liberación de numerosos compuestos específicos de la inflamación, como unas citoquinas, quimioquinas, complementos y unos compuestos vasodilatadores como la histamina o los metabolitos de la vía del ácido araquidónico, que modulan la inflamación cutánea y el reclutamiento celular.

40 La penetración cutánea de los químicos es un parámetro importante en el establecimiento de la fisiopatología de la DIC (Norlen L *et al.*, J Invest Dermatol 117: 823-829, 2001, Mizutani H *et al.*, J Clin Invest 87: 1066-1071, 1991). Esta está relacionada con el grado de permeabilidad de la piel (que está relacionado con su estado fisiológico) y con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de los cuales se supone se restringirá la entrada (peso molecular, polaridad, estado de ionización) y la naturaleza del entorno (excipiente, vehículo) por el cual estas sustancias se llevan al contacto con la piel.

Esta etapa indispensable corresponde, a partir del medio exterior o del vehículo, a la liberación de la molécula que difundirá, por lo tanto para su disposición en el organismo.

45 Durante un contacto entre un irritante y la piel, los queratinocitos son las primeras células a ser activadas por el agente químico. La mayoría de los estudios sobre la DIC se focalizaron así sobre este tipo celular, y numerosos datos son ahora conocidos por su participación en la fisiopatología de la DIC. Los queratinocitos desempeñan un papel importante en la inicialización de la reacción inflamatoria cutánea a través de la liberación de numerosos

mediadores y de citoquinas responsables de toda una cascada de la inflamación que conduce a los signos clínicos de la DIC. Entre esto, la IL-1 α y los derivados del ácido araquidónico revisten una importancia particular en el desarrollo de la inflamación.

5 La liberación de la IL-1 α induce, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, a la transcripción de genes implicados en la inflamación, como las citoquinas IL-1 β , IL-6, GM-CSF, el TNF α , las quimioquinas incluyendo la IL-8, MCP-1, MIP-1 α y la eotaxina, así como la expresión de moléculas de adhesión como la E-selectina o ICAM-1 y VCAM-1 (Gordon JR, Nature 19: 346 (6281): 274-276).

10 La cascada de señalización generada a partir de la activación de los queratinocitos empieza a partir de la liberación de mediadores claves pre-almacenados. En efecto, los queratinocitos en reposo contienen grandes cantidades de IL-1 α preformada y biológicamente activa (Marks F *et al.*, Toxicol Lett 96:111-118, 1998), así como de ácido araquidónico (Murphy JE *et al.*, J Invest Dermatol 114: 602-608, 2000). Debido a que estos dos compuestos son constitutivamente producidos por los queratinocitos, y permanecen almacenados en la célula, la epidermis puede ser considerada como un gran depósito de mediadores altamente inflamatorios. Una alteración de los queratinocitos por el efecto corrosivo de un agente químico, una quemadura o por exposición a los UV, induce a la liberación de IL-1 α y de ácido araquidónico, que se vuelven los primeros mecanismos de defensa del organismo. La IL-1 α tiene no sólo un papel autocrino, sino que también se ha descrito para inducir la transcripción de más de 90 genes diferentes sobre diferentes tipos celulares de piel, como los queratinocitos, las células endoteliales o los fibroblastos por la activación de la vía del factor de transcripción NF- κ B (Gordon JR, Nature 19: 346 (6281): 274-276).

20 El ácido araquidónico es él mismo rápidamente metabolizado en numerosos compuestos altamente activos, los eicosanoides como las prostaglandinas, el tromboxano y los leucotrienos que actúan como mediadores locales con una baja duración de vida útil, implicados en el control de la proliferación, diferenciación de la apoptosis o también la formación del edema o la activación leucocitaria (Murphy JE *et al.*, J Invest Dermatol 114: 602-608, 2000).

Así, la IL-1 α y el ácido araquidónico podrían ser considerados como los mediadores claves de la activación de la irritación en respuesta a un estrés químico (Murphy JE *et al.*, J Invest Dermatol 114: 602-608, 2000).

25 Entre todos los mediadores de la inflamación, salvo las IL-1 y el ácido araquidónico, sólo el TNF- α puede activar un número suficiente de mecanismos para generar independientemente una inflamación cutánea. Esta citoquina principal de la inflamación cutánea está ya pre-almacenada en los mastocitos dérmicos (Larrick JW *et al.*, J Leukoc Biol 45: 429-433, 1989), pero es también producida por los queratinocitos y las células de Langerhans después de la estimulación (Groves RW, *et al.*, J Invest Dermatol 98: 384-387, 1992). Uno de los mecanismos por el cual el TNF- α influye más en la reacción inflamatoria es la inducción de moléculas de adhesión en sinergia con la IL-1. Las moléculas de adhesión desempeñan un papel esencial en la circulación y la penetración de los leucocitos (en particular unos neutrófilos) a partir de vasos sanguíneos periféricos hacia la dermis y la epidermis (Holliday MR *et al.* Am J Contact Dermat 8: 158-164, 1997).

35 Una gran cantidad de productos químicos pueden inducir una irritación cutánea, sin embargo difieren en su capacidad para generar unas citoquinas pro-inflamatorias y la inflamación cutánea no depende sistemáticamente de la producción de TNF- α .

40 Es importante señalar además que la producción de IL-12 y de IL-18 por los macrófagos activados en el sitio de la inflamación desempeña un papel importante como bucle de amplificación local. En efecto, estas citoquinas estimulan la producción de IFN- γ por los linfocitos T próximos, que es en cambio un potente factor de coactivación de los macrófagos y de los queratinocitos.

45 Además, interviene una secreción de quimioquinas por las células vasculares y los queratinocitos. Las quimioquinas del subgrupo CC (así nombrado ya que las primeras cisteínas son contiguas), cuyo prototipo es la IL-8, son quimiotácticos para los polinucleares y algunos linfocitos. Las quimioquinas del grupo CXC (así nombrado porque un aminoácido está intercalado entre las dos primeras cisteínas) cuyo prototipo es el MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), son quimiotácticos para los monocitos/macrófagos y algunos linfocitos. Estos dos tipos de quimioquinas liberadas en el sitio de la inflamación, explican el infiltrado celular polimorfo encontrado en un tejido inflamado.

50 La IL-6 es también una citoquina segregada por los queratinocitos, los macrófagos, las células vasculares activadas durante una inflamación. Esta citoquina importante interviene en numerosos sistemas tales como la respuesta inmunitaria, la hematopoyesis, la proliferación de los osteoclastos, etc. En las irritaciones cutáneas, la IL-6 es producida localmente y puede mejorar la circulación general e iniciar unos efectos regionales y generales.

Paralelamente a las citoquinas y quimioquinas, así como a los metabolitos del ácido araquidónico, otro mediador principal de la inflamación es el estrés oxidativo.

55 Algunos irritantes químicos son conocidos por generar unos radicales libres y unos ROS (especies reactivas de oxígeno) capaces de inducir la peroxidación de los lípidos o la alteración del ADN. La hipótesis de que el estrés oxidativo desempeña un papel en los fenómenos de irritación inducida por un agente químico está apoyada por el

hecho de que unos inhibidores/scavengers de ROS inhiben la inflamación cutánea (Zhang L *et al.*, J Invest Dermatol 115: 168-176, 2000).

5 Las células de Langerhans (LC), a pesar de desempeñar un papel fundamental en la inducción de la respuesta específica de antígeno, no parecen tener un papel importante en la fisiopatología de la DIC. Numerosos estudios han descritos unos cambios de morfología o de densidad de las CL después de la aplicación epicutánea de irritantes (Mikulowska A *et al.*, Contact Dermatitis 34: 397-401, 1996; Kimber I *et al.*, J Invest Dermatol 99: 48S-50S, 1992). Sin embargo, estos resultados podrían representar más bien una respuesta no específica a la reacción inflamatoria generada. A partir de ahora, es evidente que la IL-1 α y el TNF- α producidos durante la DIC tienen una capacidad de hacer migrar las LC de manera dosis-dependiente. Por lo tanto, podría ser que unas concentraciones locales de IL-1 α y de TNF- α inducida por unos irritantes puedan generar una migración variable de CL (Kimber I *et al.*, J Invest Dermatol 99: 48S-50S, 1992).

15 Entre las diferentes poblaciones del sistema inmunitario innato cutáneo, el mastocito es una célula importante en el desarrollo de la DIC. Los mastocitos están presentes en la dermis cerca de los vasos sanguíneos y son las únicas células a contener los TNF- α prealmacenados y biológicamente activos (Larrick JW *et al.*, J Leukoc Biol 45:429-433, 1989).

En oposición a estas citoquinas proinflamatorias, existen unas citoquinas anti-inflamatorias tales como la TGF- β y la IL-10, así como unas proteínas de estrés conocidas como moduladores de cualquier señal de "peligro" (por ejemplo: BiP (grp78) y HSP27) (Panayi G *et al.*, Cur Opinion Immunol 16: 531-534, 2004).

20 Por lo tanto, es deseable encontrar nuevos medios para reforzar la resistencia de la piel a estos mecanismos deletéreos, y por lo tanto evitar, tratar o prevenir la inflamación y los trastornos inmunológicos.

25 La solicitud WO 02/098365 (Advanced Tissue Science) propone la utilización de medios de cultivo condicionados para aplicaciones cosméticas o farmacéuticas. Los medios condicionados son obtenidos por cultivo de células de la piel humana, en particular de fibroblastos o queratinocitos. Estas células son genéticamente modificadas para aumentar su producción de factores de crecimiento o de antioxidantes en el medio, que contiene generalmente un colágeno soluble.

El documento US 2005/0249691 describe unas composiciones cosméticas o dermatológicas que comprenden un medio de cultivo para unas células de la piel o de las capas córneas, en asociación con una matriz gelificada; las composiciones contienen obligatoriamente colágeno, quitosanos y glicosaminoglicanos.

30 El documento US 2006/0182701 describe también unas composiciones cosméticas o dermatológicas que comprenden un medio de cultivo de células de la piel. Pretende proporcionar a las células de la piel sobre las cuales son aplicadas, un medio que permitirá su desarrollo análogo al que se obtiene *in vitro*.

35 De manera inesperada, se ha encontrado ahora en el ámbito de la presente invención que un medio de cultivo condicionado por unas células completamente diferentes de las células cutáneas puede ser utilizado para favorecer el buen estado de la piel o de sus anexos y luchar contra la inflamación y/o la irritación y/o los trastornos inmunológicos.

40 Es por ello que la presente invención tiene por objeto la utilización de al menos un medio de cultivo celular condicionado o de un extracto de este, para la preparación de una composición destinada al tratamiento de los síntomas de la inflamación y/o de los trastornos inmunitarios, siendo dicho medio susceptible de ser obtenido por contacto con al menos un cultivo de células del tracto digestivo, al menos unos microorganismos probióticos y además unas células de la sangre periférica.

45 El medio de cultivo celular, también denominado medio condicionado según la presente invención es susceptible de ser obtenido por contacto con unas células de la sangre periférica, o de las células derivadas de células de la sangre periférica. Tales células son en particular unos leucocitos, pero podrán también ser seleccionadas entre unas líneas celulares inmortalizadas, derivadas de líneas de células sanguíneas, en particular de monocitos, de manera no limitativa, se pueden citar unas células comercializadas por la compañía LGC Promochem, bajo las designaciones siguientes:

SC (código ATCC: CRL-9855)

AML-193 (código ATCC: CRL-9589)

THP-1 (código ATCC: TIB-202).

50 Estas células de la sangre periférica o sus derivados, en particular los leucocitos, pueden estar por ejemplo en cultivo en el medio con las células del tracto digestivo.

Preferentemente, estos leucocitos comprenden principalmente unos linfocitos, pero pueden comprender también otras células de la sangre periférica tales como los monocitos, que son puestos en contacto con el medio.

Según uno de los modos de realización ventajosos de la invención, el cultivo de células del tracto digestivo es un cultivo tridimensional.

5 Las células del tracto digestivo útiles para la realización de la invención podrán derivar de diferentes partes del tracto digestivo, tal como el esófago, el estómago o el intestino. Ventajosamente, se utilizan unas células derivadas del epitelio intestinal; tales células epiteliales del intestino son conocidas por el experto en la materia. Se pueden citar, a título de ejemplo no limitativo, las células humanas de origen intestinal, conocidas bajo la denominación CaCO-2, HT29 o T84

Las cepas correspondientes son depositadas en las colecciones de cultivo de ATCC con los nº siguientes:

Caco 2: ATCC nº HTB-37

10 HT29: ATCC nº HTB-38

T84: ATCC nº CCL-248

15 En el sentido de la presente invención, se entiende por "microorganismo probiótico" un microorganismo vivo que, cuando se consume en cantidad adecuada, tiene un efecto positivo sobre la salud de su hospedante "joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotic in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 6 de octubre de 2001", y que puede mejorar en particular el equilibrio microbiano intestinal.

20 Los probióticos pueden ser introducidos en el medio de cultivo celular en forma de una suspensión de células vivas, cuya concentración será adaptada por el experto en la materia en función de la cantidad de los otros constituyentes de la mezcla. A título indicativo, se puede utilizar un inóculo que comprende aproximadamente 10^4 a 10^9 ufc/ml (significando ufc "unidad que forma una colonia o significando cfu "colony forming unit" es decir "unidad capaz de formar una colonia "), preferentemente al menos 10^3 cfu/ml. El inóculo de probióticos puede, de manera habitual, estar a una concentración de aproximadamente 10^6 a 10^7 cfu.

25 Los microorganismos convenientes para la invención se pueden seleccionar en particular entre los ascomicetos tales como *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Aspergillus* y *Penicillium*, unas bacterias del género *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus* y sus mezclas.

30 Como ascomicetos muy particularmente convenientes para la presente invención, se pueden citar en particular *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, así como *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* y *Pichia* o también unas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *boulardii*.

En lo referente a los microorganismos probióticos, estos son los géneros bacterianos y de levadura siguientes, que son generalmente utilizados:

- las bacterias lácticas: que producen por fermentación azúcar del ácido láctico. según su morfología, se dividen en dos grupos:

35 * *Lactobacillus species*: *Lactobacillus acidophilus* (LC1, NCFB 1748); *amylovorus*, *casei* (Shirota), *ramnosus* (cepa GG), *brevis*, *crispatus*, *delbrueckii* (subesp. *bulgaricus*, *lactis*), *fermentum*, *helveticus*, *gallinarum*, *gasseri johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *reuteri*, *ramnosus*, *salivarius*), *alimentarius*, *curvatus*, *casei subesp. casei*, *sake*

40 * *Gocci*: *Enterococcus* (*faecalis*, *faecium*), *Lactococcus lactis* (subesp. *lactis* o *cremoris*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus salvarius* subesp. *Thermophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*

- las bifidobacterias o *Bifidobacterium species*: *Bifidobacterium adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *lactis*, *longum*, *infantis*, *pseudocatenulatum*

- Las otras bacterias esporuladas: *Bacillus* (*cereus* var. *toyo* o *subtilis*), *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* strain nissle, *Propionibacterium freudenreichii*,

45 Unos ejemplos específicos de microorganismos probióticos son *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Lactobacillus acidophilus* (LC1, NCFB 1748); *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei* (Shirota), *Lactobacillus rhamnosus* (cepa GG), *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* (subesp. *bulgaricus*, *lactis*), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*), *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei subesp. casei*, *Lactobacillus sake* *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* (*faecalis*, *faecium*), *Lactococcus lactis* (subesp. *lactis* o *cremoris*), *Leuconostoc mesenteroides* subesp.

dextranicum, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus salvarius subesp. Thermophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Saccharomyces (cerevisiae* o también *boulardii)*, *Bacillus (cereus var. toyo* o *subtilis)*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli strain nissle*, *Propionibacterium freudenreichü*, y sus mezclas.

5 Ventajosamente, al menos un microorganismo probiótico se selecciona entre las bacterias lácticas, las bifidobacterias y las levaduras *Saccharomyces*.

Más particularmente, se trata de microorganismos probióticos procedentes del grupo de las bacterias lácticas, como en particular las *Lactobacillus* y/o los *Bifidobacterium*, en particular los *Lactobacillus*. A título ilustrativo de estas bacterias lácticas, se pueden citar más particularmente los *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*,
10 *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* o *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis* o *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y sus mezclas.

Las especies muy particularmente convenientes son los *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*,
15 *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium Lactis NCC 2818* (también citado como *Bb12 ATCC 27536*); se pueden citar en particular las cepas siguientes, depositadas según el tratado de Budapest en la colección de cultivo del instituto Pasteur (28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris cedex 15) los 30/06/92, 12/01/99, 15/04/99, 15/04/99, 07/06/05: *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2116), *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM I-2168) y *Bifidobacterium longum* (CNCM I-2170) y *Bifidobacterium Lactis* (CNCM I-3446), y el género *Bifidobacterium longum* (*BB536*). La cepa de *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 se
20 puede obtener de Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca).

El medio de cultivo celular con el que las células son puestas en contacto será cualquier medio nutritivo conveniente para la supervivencia y/o el cultivo de los diferentes tipos celulares utilizados. Contiene generalmente una fuente de carbono y de nitrógeno, unos minerales, unas vitaminas y/o unos oligoelementos, como por ejemplo unos aminoácidos, unos azúcares, unas proteínas, unos ácidos grasos.

25 Las células pueden ser cultivadas fuera de su tejido de origen. Para ello, deben ser cultivadas en un entorno cercano a sus condiciones naturales en el tejido. Estos cultivos requieren unos factores vitales en su medio de cultivo. Este entorno debe tener una composición definida compuesta de minerales y de biomateriales conocido bajo el nombre de medio de cultivo. Estos medios de cultivo son generalmente proporcionados por fabricantes especialistas y poseen unas características particulares en función de los tipos celulares. Los medios de cultivo contienen
30 generalmente además agua, una fuente de carbono y de nitrógeno, unos fosfatos y unos sulfatos, unos minerales y unos factores de crecimiento y unas vitaminas en cantidad adecuada.

Las células cultivadas en este tipo de medio necesitan frecuentemente la adición de suero. Este suero tiene una composición compleja y aporta a las células al menos dos hormonas, unos factores de adhesión y unos aminoácidos. Este suero podrá por ejemplo ser sustituido, todo o en parte, por la adición de los medios
35 condicionados de la invención. En efecto, los medios condicionados podrán también ser añadidos además en el medio de cultivo como enriquecimiento.

El experto en la materia determinará fácilmente unos medios adecuados. Se puede citar, de manera no limitativa, el medio RPMI 1640, el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), el Minimal Essential Medium (MEM), el M199, el RPMI 1640 o el Iscove's Modified Dulbecco's Medium (EDMEM), el Ham's F-12, el Ham's F-10, el NCTC 109 y el
40 NCTC 135.

Estos medios pueden ser complementados por cualquier aditivo clásicamente utilizado en cultivo celular, tal como, por ejemplo y de manera no limitativa, unos precursores de fosfolípidos, unos aminoácidos no esenciales, unos ácidos nucleicos, unas vitaminas, unos antibióticos, unos cofactores enzimáticos, unas sales minerales, insulina, transferrina, triyodotironina, etanolamina, o-fosforil-etanolamina o unos factores de crecimiento tales como el factor
45 de crecimiento nervioso o la neurotrofina-3.

Las concentraciones de los diferentes aditivos habitualmente utilizados para completar los medios de cultivo celular pueden ser determinadas y adaptadas por el experto en la técnica, en particular según el tipo de células a cultivar.

Otros medios son descritos en HAM and McKEEHAN, "Methods in Enzymology" 58:44-93, 1979, o también en BOTTENSTEIN *et al.*, "Methods in Enzymology" 58:94-109, 1979, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia.

50 Por otra parte, es igualmente posible utilizar unas mezclas de diferentes medios, en particular de los medios antes citados, tales como por ejemplo una mezcla de DMEM/HAM F12.

Estos medios pueden ser complementados con factores de crecimiento específico, o por ejemplo con un suero, pero este último componente puede también estar ausente.

Según un modo de realización, no se añade colágeno en el medio de cultivo.

Este medio de cultivo puede ser líquido, semi-líquido, gelificado o sólido, preferentemente al menos parcialmente líquido.

5 Por extracto del medio de cultivo celular condicionado, se entiende en particular cualquier fracción o subcompuesto de estos medios condicionados obtenidos por diálisis, fraccionamiento, separación de fase, cromatografía por filtración, cromatografía por afinidad, precipitación, concentración, liofilización, etc.

Los medios condicionados pueden ser generados a partir de medios que pueden estar desprovistos de suero y de producto animal. Este medio condicionado se obtiene preferentemente después de la estimulación de las células del tracto digestivo en presencia de leucocitos humanos, por unos probióticos y en particular unos probióticos de la especie de los lactobacilos o de las bifidobacterias.

10 Ventajosamente, el medio de cultivo (o sus extractos) utilizado en las composiciones de la invención es un medio estabilizado, es decir que ha sufrido una manipulación destinada a preservarlo en el estado en el que se encontraba en un instante dado elegido, generalmente al final de su proceso de preparación, y conservar al mismo tiempo sus propiedades intrínsecas. En particular, esta manipulación sirve para hacer dicho medio estéril, es decir incapaz de permitir el crecimiento de microorganismos, preservando al mismo tiempo las propiedades biológicas de las cuales está dotado. La estabilización del medio de cultivo puede ser obtenida mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, como por ejemplo la filtración esterilizante, el autoclavado, la temperatura ultra alta (técnica UHT), la esterilización de alta presión, las radiaciones γ o la congelación.

20 Los medios de cultivo condicionados según la invención contienen generalmente IL-10, que no estaba presente en los diferentes constituyentes del medio de origen. Las cantidades de IL-10 podrán variar según las condiciones de preparación del medio condicionado de la invención, pero corresponderán en general a una concentración superior o igual a 20 pg/ml de medio recuperado después del contacto con los diferentes tipos celulares.

El medio de cultivo condicionado según la invención, sus extractos o las composiciones que lo contienen, son particularmente útiles para prevenir, disminuir o tratar los síntomas de la irritación cutánea.

25 Las reacciones cutáneas, en particular la irritación cutánea, pueden ser inducidas por un estrés exógeno, de origen químico, por ejemplo xenobiótico, antígenos, alérgenos, productos químicos, compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel, peeling, de origen medioambiental (temperatura, clima, radiación UV, polución atmosférica, en particular metales pesados, ozono, humo de tabaco, etc.) o también de origen mecánica (fricción, afeitado) y cualquier estrés de origen endógeno tales como los trastornos que implican un mecanismo inflamatorio y/u hormonal que afecta a la piel, una mucosa, el cuero cabelludo y/o el cabello.

30 El estrés endógeno fisiológico puede estar relacionado, por ejemplo, con la producción anormal de mediadores proinflamatorios (neuromediadores, citoquina, quimioquinas) o con una alopecia androgenética.

35 La invención tiene además por objeto dicha utilización según la presente invención, caracterizada por que dicho medio condicionado o sus extractos están destinados a prevenir y/o disminuir dicha reacción cutánea inducida por al menos una condición seleccionada entre la acción de xenobióticos, de antígenos, de alérgenos, de productos químicos, de compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel, de un peeling, la acción de la temperatura, del clima, de radiaciones UV, de la polución atmosférica, o también por fricciones, la producción anormal de mediadores proinflamatorios y la alopecia androgenética.

40 El medio condicionado o sus extractos pueden estar destinados en particular a prevenir y/o disminuir el efecto irritante de una composición cosmética o dermatológica que contiene uno o varios compuestos susceptibles de provocar una irritación.

La invención tiene también por objeto la utilización de al menos un medio condicionado o sus extractos para la preparación de una composición destinada a prevenir y/o tratar los trastornos cutáneos relacionados con una irritación cutánea, por ejemplo encontrada en los sujetos que presentan unas pieles y/o mucosas y/o cueros cabelludos irritables y/o alérgicos.

45 La invención tiene más particularmente por objeto, dicha utilización para la preparación de una composición destinada a prevenir y/o tratar la irritación cutánea, caracterizada por que la irritación cutánea está inducida por al menos una condición seleccionada entre la acción de xenobióticos, de antígenos, de alérgenos, de productos químicos, de compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel, de un peeling, la acción de la temperatura, del clima, de radiaciones UV, de la polución atmosférica, o también por fricciones, la producción anormal de mediadores proinflamatorios y la alopecia androgenética.

50 La invención tiene igualmente por objeto la utilización de al menos un medio condicionado o sus extractos para la preparación de una composición destinada a prevenir y/o tratar unos trastornos cutáneos relacionados con una reacción cutánea, por ejemplo de tipo inflamatoria o inmunoalérgica.

55 Así, los medios condicionados o las composiciones según la invención son más particularmente útiles para luchar contra los trastornos cutáneos seleccionados entre los herpes, los edemas y/o granos, el eritema inflamatorio; los

pruritos; la psoriasis, la atopia cutánea, la dermatitis atópica; la urticaria; las dermatitis de contacto, el eczema; las dermatitis seborreicas; el acné; las hiperpigmentaciones inflamatorias; las dermatosis inmunes; las enfermedades inmunes bullosas; la esclerodermia; la elastosis actínica; la calvicie o *alopecia areata*; el vitiligo; el lupus eritematoso sistémico; el *pemphigus vulgaris*; las epidermolisis bullosas distróficas y la canicie de origen autoinmune.

5 En efecto, se sabe que algunos trastornos cutáneos están relacionados con una reacción cutánea de tipo inflamatorio o inmunoalérgico, entre ellas el eritema inflamatorio, la psoriasis, la atopia cutánea, la dermatitis atópica, las reacciones alérgicas de tipo hipersensibilidad inmediata, tales como la urticaria, las reacciones alérgicas de tipo hipersensibilidad retrasada, tales como las dermatitis de contacto, el eczema; las dermatitis seborreicas, el acné, las hiperpigmentaciones inflamatorias, las dermatosis inmunes, la elastosis actínica, las calvicies o *alopecia areata*; el vitiligo; el lupus eritematoso sistémico; el *pemphigus vulgaris*; las epidermolisis bullosas distróficas y la canicie de origen autoinmune.

10 Además, a nivel de la piel, las exposiciones UV generan unas reacciones estrictamente inflamatorias y tienen unos efectos irritantes, que pueden conllevar el desarrollo de un eritema, de un edema y/o de una hiperqueratosis. Estas reacciones inflamatorias y/o de irritación están relacionadas con una estimulación de agentes específicos del sistema inmunitario.

15 Según uno de los modos de realización de la invención, el medio condicionado o las composiciones según la invención están destinados a proteger las células cutáneas de los daños causados por las radiaciones UV.

El medio condicionado o las composiciones según la invención están ventajosamente destinados a proteger las células, en particular las células cutáneas de los daños de su ADN.

20 Las composiciones son útiles en particular para:

1) reparar el ADN alterado y así reducir el riesgo de cáncer (por ejemplo inducido a nivel cutáneo tras un estrés relacionado con el entorno). Estas sustancias podrían en particular influenciar el principal mecanismo de reparación del material genético en los mamíferos, nucleósido-excisión repair.

25 2) inhibir las caspasas en los casos de dermatitis atópica o de alergia de contacto, inhibir las células T activadas que infiltran la piel de los sujetos afectados que inducen la apoptosis de los queratinocitos próximos. Y así, podría reducir el número de queratinocitos apoptóticos, y por lo tanto la pérdida de la cohesión intercelular (acantólisis) y en consecuencia la formación de vesícula.

30 Así, se utilizan unas composiciones cosméticas que contienen por ejemplo unos activos queratolíticos y/o descamantes, para luchar contra el envejecimiento, y en particular unos activos exfoliantes y/o unos activos que favorecen la renovación celular, tales como los α -hidroxi-ácidos (en particular los ácidos láctico, glicólico, cítrico) los β -hidroxi-ácidos (en particular los ácidos salicílico, n-octanoil-5-salicílico) y los retinoides (en particular el ácido retinoico todo trans o 13-cis, retinol). Desafortunadamente, si estos activos son utilizados en cantidades demasiado importantes, pueden provocar una irritación cutánea. La utilización de estos compuestos, en particular para los usuarios de pieles y/o cueros cabelludos irritables y/o alérgicos, debe ser por lo tanto limitada.

35 Además, incluso algunos compuestos considerados como inertes en una composición cosmética o dermatológica, tales como por ejemplo los conservantes, los tensioactivos, los perfumes, los disolventes o los propulsores, pueden presentar un carácter irritante cuando se aplican sobre las materias queratínicas y en particular la piel, incluyendo el cuero cabelludo en sujetos de piel irritable y/o alérgica, dependiendo este carácter irritante del compuesto utilizado y de la sensibilidad de la piel y de la flora cutánea residente en el usuario.

40 Los compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel son generalmente utilizados en unas dosis bajas. La utilización en baja cantidad de estos compuestos puede entonces parecer poco ventajosa con respecto a la utilización de otros compuestos menos activos, pero menos o nada irritantes y por lo tanto utilizados en mayor cantidad, o con respecto a la finalidad del compuesto, tal como, por ejemplo, la estabilidad de la composición cuando se trata de emulsionantes o la buena conservación de la composición cuando se trata de conservantes.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar unos compuestos de efecto calmante capaces en particular de prevenir y/o disminuir el efecto irritante de composiciones cosméticas o dermatológicas que contienen uno o varios compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel, y prevenir y/o tratar unos trastornos cutáneos relacionados con una irritación cutánea de tipo inflamatorio o inmunoalérgico.

50 La solicitud describe también la utilización de al menos un medio condicionado o sus extractos para la preparación de una composición, caracterizada por que dicho medio condicionado o sus extractos está destinado a prevenir y/o disminuir el efecto irritante de una composición cosmética o dermatológica que contiene uno o varios compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel.

La utilización según la presente invención está particularmente destinada al tratamiento de las pieles y/o mucosas y/o cueros cabelludos irritables y/o alérgicos.

La invención tiene además por objeto una composición para la aplicación tópica sobre la piel y/o las mucosas y/o el cuero cabelludo que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

- al menos un compuesto cosmético o farmacéutico susceptible de provocar una irritación de la piel, y
- al menos un medio condicionado o sus extractos.

5 La utilización de al menos un medio condicionado o sus extractos presenta por lo tanto, entre otras, la ventaja de suprimir la irritación cutánea que pudieran haber provocado los compuestos con efecto secundario irritante, y también permitir aumentar la cantidad de dichos compuestos en las composiciones cosméticas o dermatológicas con respecto a la cantidad normalmente utilizada, para una eficacia aumentada de estos últimos.

10 Así, se puede utilizar, incluso en las composiciones destinadas a las pieles y/o a las mucosas y/o a los cueros cabelludos irritables y/o alérgicos, unos agentes susceptibles de provocar una irritación de la piel, tales como unos activos cosméticos (por ejemplo: agentes queratolíticos y/o descamantes), unos activos dermatológicos (por ejemplo: retinoides), algunos tensioactivos, conservantes, perfumes, disolventes, propulsores, y sus mezclas, por lo que dichas composiciones comprenden al menos un medio condicionado o sus extractos.

15 Por "pieles y/o mucosas y/o cueros cabelludos irritables y/o alérgicos" según la invención, se entiende en particular unas pieles y/o mucosas y/o cueros cabelludos que reaccionan a las agresiones exteriores, a veces de manera exagerada. Estas pieles y/o mucosas y/o cueros cabelludos son por lo tanto más sujetos al desarrollo de una reacción cutánea que puede manifestarse por unos enrojecimientos, unos pruritos y/o implicar unos mecanismos inmunológicos o inflamatorios, en oposición a las pieles sensibles.

20 En la presente descripción, salvo que se especifique de otra manera, se entiende por piel el conjunto del revestimiento del cuerpo humano, es decir la piel, las mucosas y el cuero cabelludo.

Por fáneras se entienden las uñas, el cabello y los pelos, tales como las pestañas.

25 La cantidad de medio de cultivo condicionado o de sus extractos según la invención en las composiciones será adaptada por el experto en la materia para obtener el efecto buscado. La cantidad eficaz se determinará así mediante unas técnicas rutinarias, que comprenden unos ensayos *in vitro* y unas dosificaciones *in vivo*, y dependerá en particular del tipo de extracto utilizado y del tipo de formulación aceptada.

A título indicativo, la concentración de materia activa de medio condicionado podrá estar comprendida entre el 0,001 y el 50% en peso con respecto al peso total de la composición, en particular inferior o igual al 10%, pero estas cantidades podrán variar sin inconveniente.

30 Las composiciones según la invención contienen asimismo un medio fisiológicamente aceptable, en particular un medio cosmética o farmacéuticamente aceptable. Se trata más particularmente de composiciones cosméticas o farmacéuticas, en particular de composiciones dermatológicas.

35 Por composición o producto cosmético en el sentido de la invención, se entiende en particular cualquier sustancia o preparación destinada a ser puesta en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales para, exclusiva o principalmente, limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado (directiva cosmética 76/768/CEE modificada).

Estas composiciones tienen generalmente un olor y un aspecto que hace agradable su aplicación sobre el cuerpo humano.

Preferentemente, una composición de la invención se aplica sobre la piel o las mucosas.

40 Según el modo de administración considerado, puede presentarse bajo cualquier forma galénica normalmente utilizada.

45 Para una aplicación tópica sobre la piel o las mucosas, la composición puede tener en particular la forma de soluciones acuosas u oleosas o de dispersiones de tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda de tipo crema o gel acuoso o anhidros, o también de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico, o de espumas. Pueden también presentarse en forma de microesferas o nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas, o de parches poliméricos y de hidrogeles que permiten una liberación controlada.

50 Según un modo de realización ventajoso, la composición es una composición dermocosmética que contiene, en un soporte cosmética o farmacéuticamente aceptable, al menos un medio condicionado o un extracto según la invención a razón de al menos el 0,001% en peso con respecto al peso total de la composición, y preferentemente del 0,05 al 3%.

Estas composiciones son preparadas según los métodos habituales.

Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones según la invención son las clásicamente utilizadas en los campos considerados. Los constituyentes y sus cantidades se seleccionarán preferentemente de manera que no interactúen con la actividad del medio condicionado o de sus extractos, disminuyéndola.

5 En el campo de la cosmética, estas composiciones constituyen en particular unas cremas de limpieza, de protección, de tratamiento o de cuidado para la cara, para las manos, para los pies, para los grandes pliegues anatómicos o para el cuerpo (por ejemplo cremas de día, cremas de noche, cremas desmaquilladoras, cremas de base de maquillaje, cremas de protección solar), bases de maquillaje fluidas, leches desmaquilladoras, leches corporales de protección o de cuidado, leches de protección solar, lociones, geles o espumas para el cuidado de la piel, como
10 lociones de limpieza, lociones de bronceado artificial, composiciones para el baño, composiciones desodorantes que comprenden un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado.

Las composiciones según la invención pueden consistir igualmente en preparaciones sólidas que constituyen unos jabones o unas pastillas de limpieza.

15 Las composiciones pueden también estar envasadas en forma de composición para aerosol que comprende también un agente propulsor bajo presión.

Una composición según la invención puede también ser una composición para los cuidados del cuero cabelludo, y en particular un champú, una loción de marcado, una loción tratante, una crema o un gel de peinado, de lociones reestructurantes para el cabello, una loción o un gel anticaída, un champú antiparasitario, anticaspa, etc.

20 Una composición puede también ser de uso bucodental, por ejemplo una pasta dentífrica. En este caso, la composición puede contener unos adyuvantes y aditivos habituales para las composiciones de uso bucal y en particular unos agentes tensioactivos, unos agentes espesantes, unos agentes humectantes, unos agentes de pulido, tales como la sílice, diversos ingredientes activos como los fluoruros, en particular el fluoruro de sodio, y eventualmente unos agentes edulcorantes como el sacarinato de sodio.

25 Cuando la composición es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede variar de aproximadamente el 5% al 80% en peso, y preferentemente de aproximadamente el 5% al 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, las ceras, los emulsionantes y los coemulsionantes utilizados en la composición en forma de emulsión se seleccionan entre los clásicamente utilizados en el campo cosmético. El emulsionante y el coemulsionante están presentes, en la composición, en una proporción que va del 0,3% al 30% en peso, y preferentemente del 0,5% al 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede contener
30 además unas vesículas lipídicas.

Cuando la composición es una solución o un gel oleoso, la fase grasa puede representar más del 90% del peso total de la composición.

35 De manera conocida, la composición cosmética puede contener también unos adyuvantes habituales en el campo cosmético, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los aditivos hidrófilos o lipófilos, los conservantes, los antioxidantes, los disolventes, los perfumes, las cargas, los filtros, los absorbentes de olores y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las clásicamente utilizadas en el campo cosmético, y por ejemplo varían de aproximadamente el 0,01% al 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

40 Como aceites o ceras utilizables en la invención, se pueden citar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de la manteca de karité, aceite de girasol), los aceites animales (perhidroescualeno), los aceites de síntesis (aceite de Purcelina), los aceites o ceras siliconadas (ciclometicona) y los aceites fluorados (perfluoropoliéteres), las ceras de abeja, de carnauba o parafina. Se puede añadir a estos aceites unos alcoholes grasos y unos ácidos grasos (ácido esteárico). Como emulsionantes utilizables en la invención, se pueden citar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/Estearato de glicol vendida bajo la denominación de Tefose® 63 por la compañía Gattefosse.
45

Como disolventes utilizables en la invención, se pueden citar los alcoholes inferiores, en particular el etanol y el isopropanol y el propilenglicol.

50 Como gelificantes hidrófilos utilizables en la invención, se pueden citar los polímeros carboxivinílicos (Carbomer®), los copolímeros acrílicos tales como los copolímeros de acrilato/alquilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos tales como la hidroxipropilcelulosa, las gomas naturales y las arcillas y, como gelificantes lipófilos, se pueden citar las arcillas modificadas como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos como los estearatos de aluminio, la sílice hidrófoba, la etilcelulosa y el polietileno.

INGREDIENTES COSMÉTICOS O FARMACÉUTICOS SUSCEPTIBLES DE PROVOCAR UNA IRRITACIÓN DE LA PIEL

La utilización no terapéutica pretende en particular prevenir y/o disminuir el efecto irritante de una composición cosmética o dermatológica que contiene uno o varios compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel.

Una composición según la presente invención comprende al menos un compuesto cosmético o farmacéutico susceptible de provocar una irritación de la piel.

5 Entre estos compuestos, se pueden citar en particular unos compuestos o activos cosméticos, unos compuestos o activos dermatológicos, unos tensioactivos, en particular unos tensioactivos aniónicos, unos conservantes, unos detergentes, unos perfumes y en particular unas soluciones alcohólicas perfumantes, unos disolventes, unos propulsores y sus mezclas.

10 Más particularmente, a título de activos dermatológicos o cosméticos, se pueden citar ciertos agentes descamantes que pueden ser igualmente unos agentes de peeling.

Entre los agentes específicamente de peeling, se pueden citar unas partículas abrasivas/exfoliantes de fuentes minerales, orgánicas, naturales o sintéticas. Se pueden citar más particularmente las partículas de piedra pómez, de sílice, de bolas de polietilenos, de nylon y de polvos de huesos de frutos.

15 Entre estos agentes descamantes, los siguientes son susceptibles de provocar una irritación de la piel: los ácidos monocarboxílicos saturados (ácido acético) e insaturados, los ácidos dicarboxílicos saturados e insaturados, los ácidos tricarboxílicos saturados e insaturados; los α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos de los ácidos monocarboxílicos; los α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos de los ácidos dicarboxílicos; los α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos de los ácidos tricarboxílicos, los cetoácidos, los α -cetoácidos, los β -cetoácidos de ácidos policarboxílicos, de ácidos polihidroximonocarboxílicos, de ácidos polihidroxicarboxílicos y de ácidos polihidroxitricarboxílicos.

20 Particularmente entre los α -hidroxiácidos o sus ésteres, se pueden citar: los ácidos glicólico, dioico como el ácido octadecenodioico o Arlatone dioc DCA vendido por la compañía Uniquema, cítrico, láctico, tártrico, málico o mandélico, sus ésteres como el tartrato de dialquilo (C12/C13) o Cosmacol ETI, el citrato de trialcoholes C12-13 ramificados o Cosmacol ECI comercializado por la compañía SASOL.

25 Entre los β -hidroxiácidos se pueden citar: el ácido salicílico y sus derivados (incluyendo el ácido n-octanoil-5-salicílico).

Entre los α -cetoácidos se pueden citar: el ácido ascórbico y sus derivados.

30 Entre los otros agentes descamantes, se pueden citar: los ácidos pirúvico, glucónico, glucurónico, oxálico, malónico, succínico, acético, géntísico, cinámico, azelaico; el fenol, la resorcina; la urea y sus derivados, la hidroxietilurea o hydrovance® de NATIONAL STARCH; las oligofucosas; el ácido jasmónico y sus derivados; el ácido ascórbico y sus derivados, el ácido tricloroacético; el extracto de *Saphora japonica* y el resveratrol.

Entre los agentes descamantes, los capaces de actuar sobre las enzimas implicadas en la descamación o la degradación de los corneodesmosomas pueden también ser susceptibles de provocar una irritación de la piel.

35 Entre estos, se pueden citar en particular los agentes quelantes de las sales minerales tales como EDTA; el ácido N-acil-N,N',N'-etilendiaminotriacético; los compuestos aminosulfónicos y en particular el ácido (N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etano)sulfónico (HEPES); los derivados del ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico (procisteína); los derivados de ácidos alfa aminados de tipo glicina (tales como los descritos en el documento EP 0 852 949, así como el metilglicindiacetato de sodio comercializado por BASF bajo la denominación comercial TRILON M®); la miel; los derivados de azúcar tales como la O-octanoil-6-D-maltosa, la O-linoleil-6-D-glucosa y la N-acetilglucosamina.

40 Los retinoides son también unos compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel. Se pueden citar entre ellos, por ejemplo, el retinol y sus ésteres, el retinal, el ácido retinoico y sus derivados tales como los descritos en los documentos FR-A-2 570 377, EP-A-199 636, EP-A-325 540, EP-A-402 072, y el adapaleno.

Las sales y derivados, como las formas cis o trans, las mezclas racémicas, las formas dextrógiras o levógiras de los compuestos citados anteriormente son asimismo consideradas como unos compuestos susceptibles de provocar una irritación de la piel.

45 Otros activos dermatológicos o cosméticos susceptibles de provocar una irritación de la piel son asimismo citados a continuación:

- la urea y sus derivados como la hidroxietilurea o hydrovance® de NATIONAL STARCH,

50 - ciertas vitaminas tales como la vitamina D y sus derivados tales como la vitamina D3, la vitamina D2, el calcitriol, el calcipotriol, el tacalcitol, la 24,25-diOH vitamina D3, la 1-OH vitamina D2 y la 1,24-diOH vitamina D2; la vitamina B9 y sus derivados,

- los peróxidos como el peróxido de benzoílo, el agua oxigenada,

- los anticaídas, tales como el minoxidil y sus derivados tal como el aminexil,
 - los tintes y los colorantes capilares, como los aminofenoles y sus derivados tales como la para-fenilen-diamina (p-PDA), la N-fenil p-PDA, el toluen-2,5-diamina sulfato, la meta-fenilendiamina (m-PDA), la toluen-3,4-diamina y la orto-fenilen-diamina (o-PDA).
- 5
- los agentes anti-transpirantes como las sales de aluminio, tal como el hidroxiclورو de aluminio,
 - los desodorantes,
 - los activos de depilación y/o de permanentes tales como los tioglicolatos, el amoniaco,
 - el tioglicolato y sus sales,
 - el fenoxietanol,
- 10
- el 1,2-pentanodiol,
 - las soluciones alcohólicas perfumantes (perfumes, aguas de colonia, para después del afeitado, desodorantes),
 - las antralinas (dioxiantranol),
 - los antranoides (por ejemplo los descritos en el documento EP-A-319028),
 - las sales de litio,
- 15
- los despigmentantes (por ejemplo: hidroquinona, vitamina C de fuerte concentración, ácido kójico),
 - ciertos activos adelgazantes de efecto caliente,
 - los nicotinatos y sus derivados,
 - la capsaicina,
 - los activos antiopiojos (piretrina),
- 20
- los antiproliferativos tales como el 5-fluoro-uracilo o el metotrexato,
 - los agentes antivíricos,
 - los antiparasitarios,
 - los antifúngicos,
 - los antipruriginosos,
- 25
- los antiseborreicos,
 - los propigmentantes tales como los psoralenos y las metilangecilinas, y
 - sus mezclas.
- Como conservantes, se puede citar el fenoxietanol, la corehexidina y el cloruro de benzalconio.
- 30
- Como tensioactivos, se pueden citar los tensioactivos aniónicos, catiónicos y anfóteros, más particularmente los tensioactivos aniónicos tales como los alquilsulfatos y los alquilétersulfatos como el laurilsulfato y el laurilétersulfato, y sus sales, en particular de sodio.
- 35
- Según un modo de realización preferido de la invención, el compuesto susceptible de provocar una irritación de la piel se selecciona entre los retinoides, los α -hidroxiácidos, los β -hidroxiácidos, los ácidos dicarboxílicos saturados e insaturados, tales como el ácido octadeceno-dioico o Arlatone DIOC DCA vendido por la compañía Uniqema, los tensioactivos aniónicos, catiónicos o anfóteros, el ácido n-octanoil-5-salicílico, los activos antiperspirantes tales como las sales de aluminio, el ácido (N-2 hidroxietilpiperazin-N-2-etano)sulfónico (HEPES) y el ácido cinámico.
- 40
- El compuesto susceptible de provocar una irritación de la piel puede estar presente en la composición según la presente invención en una cantidad suficiente para provocar una reacción de irritación de la piel. A título de ejemplo, puede estar presente en una cantidad que va del 0,0001 al 70% en peso, preferentemente del 0,01 al 50% en peso y mejor del 0,1 al 30% en peso con respecto al peso total de la composición.

En las composiciones dermocosméticas según la invención, el extracto de medio condicionado puede estar combinado con unos retinoides o unos corticosteroides, o asociado con unos antirradicales libres, con unos alfa-hidroxi o alfa-ceto ácidos o sus derivados, o también unos bloqueantes de canales iónicos.

5 Las composiciones dermocosméticas según la invención pueden, además, contener unos aditivos inertes o incluso farmacodinámica o cosméticamente activos o unas combinaciones de estos aditivos y en particular: unos agentes humectantes, unos agentes despigmentantes tales como la hidroquinona, el ácido azelaico, el ácido cafeico o el ácido kójico; unos emolientes; unos agentes hidratantes como el glicerol, el PEG-400, la urea; unos agentes anti-
10 edad, unos agentes antiborreicos o antiacneicos, tales como la S-carboximetilcisteína, la S-bencil-cisteamina, sus sales y sus derivados, o el peróxido de benzoilo; unos antibióticos como la eritromicina y sus ésteres, la neomicina, la clindamicina y sus ésteres, las tetraciclinas; unos agentes antifúngicos tales como el ketoconazol o las polimetileno-4,5-isotiazolinonas-3; unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, como el Minoxidil (2,4-diamino-6-piperidino-pirimidin-3-óxido) y sus derivados, el diazóxido (7-cloro-3-metil-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido) y la Fenitoína (5,4-difenil-imidazolina 2,4-diona); unos agentes antiinflamatorios no esteroideos, unos
15 carotenoides y en particular el β -caroteno; unos agentes anti-psoriásicos tales como la antralina y sus derivados y finalmente, los eicosa-5,8,11,14-tetraenoico y eicosa-5,8,11-trienoico, sus ésteres y sus amidas.

Activos adicionales

El medio condicionado o sus extractos utilizados según la invención puede también estar asociado a al menos del 0,00001% al 95% en peso de un agente antiinflamatorio, otro agente espesante o sus mezclas.

Como ejemplos de “agentes antiinflamatorios” se pueden citar:

- 20 - un antagonista de citoquinas inflamatorias;
- un antiinflamatorio esteroideo (hidrocortisona, betametasona, dexametasona, etc.);
- un antiinflamatorio no esteroideo, como la aspirina;
- y sus mezclas.

25 Los agentes antiinflamatorios están preferentemente presentes en las composiciones conformes a la invención en una concentración que puede variar entre el 0,00001 y el 10% en peso aproximadamente con respecto al peso total de la composición. Aún más preferiblemente, la concentración en compuesto antiinflamatorio puede variar entre el 0,0005% y el 2% en peso con respecto al peso total de la composición.

30 En particular, el otro agente calmante podrá ser ventajosamente seleccionado entre la alantoína, el ácido beta-glicirretínico, los extractos que los contienen, como por ejemplo el extracto de *Glycyrrhiza Glabra* (regaliz) y los complejos que los contienen, como el complejo alantoína/ácido glicirretínico; los planctons, liofilizados o no, sus extractos y sus complejos; las aguas y extractos de flores y de plantas: aguas de manzanilla, de tila, rosa, extractos de abedul; el bisabolol; los aceites esenciales, por ejemplo de cilantro; las algas en particular de tipo *Laminaria* (por ejemplo rojas o marrones) tal como el extracto de alga marrón *Padina Pavonica* como HPS 3 PADINA PAVONICA comercializado por la compañía Alban Muller; el ácido acexámico y el ácido transexámico (ácido trans-4, aminometilciclohexano carboxílico); el ácido ursólico y los extractos que los contienen, como el extracto de hoja de romero; los polisacáridos que contienen fucosa, como el FUCOGEL 1000, vendido por la compañía Solabia; los electrolitos y en particular una mezcla acuosa como la “mezcla de sales del Mar Muerto” (“Dead Sea Bath Salts”); los aminoácidos como las Sepicalm S y VG de Seppic y las sales divalentes de magnesio, tal como el magnesio gluconato.

40 Las composiciones según la invención, en particular cosmética o dermatológica, pueden ser preparadas en particular mediante un procedimiento que comprende una primera fase durante la cual se prepara un medio de cultivo condicionado, eventualmente un extracto de tal medio de cultivo condicionado.

Este procedimiento comprende al menos las etapas siguientes:

- 45 a) cultivo de unas células derivadas del epitelio intestinal sobre un soporte en un primer medio nutritivo durante un tiempo suficiente para obtener su diferenciación
- b) preparación de un segundo medio de cultivo celular en un recinto tapizado de células de sangre periféricas o de sus derivados, en particular de leucocitos,
- c) recuperación del cultivo de células diferenciadas sobre el soporte, en particular un soporte poroso, obtenido al final de la etapa a) y transferir en el segundo medio de cultivo obtenido al final de la etapa b)
- 50 d) puesta en contacto de dicho cultivo de células derivadas del epitelio intestinal diferenciadas en el segundo medio de cultivo, con un cultivo de microorganismos que comprende al menos unos probióticos, que pueden ser por ejemplo de la especie *Lactobacillus*, durante un tiempo suficiente para que haya una interacción entre las células,

e) eliminación de unos cultivos celulares y recuperación del segundo medio de cultivo celular, liberado de los leucocitos, para obtener un medio condicionado

f) incorporación de un medio condicionado o un extracto de este en una composición cosmética o dermatológica.

5 Preferentemente, el soporte en la etapa a) es un soporte poroso. Por soporte poroso, se entiende en particular un inserto cuya base comprende poros.

10 Por ejemplo, el tamaño de los poros podrá variar de 0,001 a 10 μm , preferentemente superior o igual a 0,3 μm . A título de ejemplo no limitativo, la base del inserto poroso conveniente para la invención podrá así comprender una matriz porosa de colágeno, que comprende opcionalmente unos glicosaminoglicanos y/o unos fibroblastos, un gel o una membrana de ácido hialurónico y/o de colágeno y/o de fibronectina y/o de fibrina, una membrana semipermeable de nitrocelulosa, de nylon, de teflón, de policarbonato o de polietileno o de polipropileno o de polietilentereftalato (PET), una membrana inorgánica Anopore[®] semipermeable, una membrana de acetato de celulosa, una membrana semipermeable Biopore-CM[®], una membrana semipermeable de poliéster y una membrana de ácido poliglicólico.

15 El tiempo de contacto en la etapa a) será adaptado por el experto en la materia, pero estará generalmente comprendido entre algunas horas y algunos días, en particular entre 1 día y 35 días, por ejemplo de 18 a 22 días, preferentemente de aproximadamente 21 días. Las células que están dispuestas inicialmente en capa única forman así, al final de la etapa a), un sistema de varias capas de células diferenciadas, tridimensional. Ventajosamente, el medio de cultivo será renovado regularmente, por ejemplo cada 2 días, para obtener una diferenciación óptima de las células derivadas del epitelio intestinal, tal como los Caco2.

20 En la etapa b), las células de la sangre periférica o derivadas, en particular unos leucocitos, forman un tapiz celular; es decir que la superficie del recinto está recubierta de manera sustancialmente homogénea por unos leucocitos; pudiendo estos estar en monocapa o en multicapa.

25 Los leucocitos se recogerán en particular a partir de extracciones sanguíneas después de al menos una etapa de separación, en particular por centrifugación, y después eliminación al menos parcial de monocitos. Después, se resuspenden en un medio nutritivo compatible con su viabilidad, en particular un medio RPMI.

De manera general, los medios podrán ser seleccionados por el experto en la materia según sus conocimientos generales, y en particular entre los medios citados anteriormente.

30 A título de ejemplo de recinto conveniente para la realización de la invención, se pueden mencionar unos pocillos de placas de cultivo, tales como unas placas de cultivo celular de 6, 12, 24, 48 pocillos o de 96 pocillos, habitualmente utilizadas en cultivo de células.

Ventajosamente, el cultivo de células diferenciadas será lavado con el medio conveniente para la viabilidad de los leucocitos antes de la transferencia en la etapa c). El contacto entre las células diferenciadas y los probióticos, en presencia de los leucocitos se efectuará durante un tiempo que permite el establecimiento de una interacción, es decir de intercambios químicos o biológicos entre los diferentes tipos celulares.

35 En el sentido de la invención, se entiende designar mediante la expresión "intercambio químico celular" el conjunto de las señales figuradas por unas moléculas, liberadas a partir de una célula, y susceptible de afectar, a distancia, la actividad de otra célula, que pertenece o no al mismo tipo celular. Tal molécula puede ser, por ejemplo y de manera no limitativa, un péptido, una proteína, un lípido, un azúcar, una hormona esteroidea, una catecolamina. También puede ser liberada en forma de una secreción.

40 Se entiende que esta interacción puede intervenir en ausencia de contacto físico directo entre los diferentes tipos celulares. En particular, la disposición en la que por un lado las células derivadas del epitelio intestinal y, por otro lado el tapiz celular de leucocitos, dispuestos o no en un único recinto, son puestos en relación el uno con el otro medio un medio de cultivo en el que están incubados, sin que unas células del cultivo de células intestinales puedan entrar, directamente, en contacto con unas células de otro tapiz, por ejemplo por contacto entre los cuerpos celulares o mediante prolongaciones celulares.

45 Ventajosamente, los microorganismos probióticos son añadidos a nivel apical sobre el cultivo de células intestinales.

50 El tiempo conveniente para el establecimiento de esta interacción será de algunas horas hasta varios días, generalmente de al menos 6 horas, preferentemente de al menos 10, en particular superior o igual a 16 horas, pero podrá ser prolongado sin inconveniente. Se dejan, por ejemplo, los probióticos en contacto con las células intestinales en el recinto que comprende los leucocitos durante 6 a 36 horas.

El medio de cultivo se recupera después separándole del conjunto de las células, por ejemplo recogiéndolo a nivel basolateral: este medio condicionado fue influenciado por los dos tipos celulares y su interrelación.

Como se indicó anteriormente, el medio de cultivo así recuperado, también denominado “medio condicionado” contiene IL-10, generalmente a una concentración superior o igual a 20 pg/ml de medio, en particular de 50 a 200 pg/ml.

5 Puede sufrir después unas etapas de concentración, extracción, fraccionamiento conocidas en sí por el experto en la materia, antes de la introducción como ingrediente, en una composición, en particular cosmética o farmacéutica o dermocosmética según la invención.

La invención se ilustrará más en detalle en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Preparación de un medio condicionado

10 Se inoculan unas células cercanas a los enterocitos humanos, Caco2 (entre el paso 60 y 65) a la densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/ml en un inserto de cultivo de 25 mm (que tiene unos nucleoporos de $0,4 \mu\text{m}$, Becton Dickinson, Basel, Suiza). Estos insertos son colocados en unas cajas de cultivo (Nunc) y cultivados durante 18 a 22 días a $37^\circ\text{C}/10\%$ CO_2 en DMEM (que contiene glutamina y una fuerte concentración de glucosa (Amimed, Allschwill, Suiza) complementado con unos aminoácidos no esenciales (Gibco, BRL), 10 mg/ml de gentamicina (GIBCO BRL), y el 0,1% de penicilina/estreptomicina (10 000 IU/ml y 10 000 UG/ml) (GIBCO). El medio de cultivo se cambia cada 2
15 días hasta que las células estén completamente diferenciadas (21 días). Se determina continuamente una medición de la resistencia eléctrica trans epitelial cuando las células Caco2 son confluentes en monocapa utilizando un electrodo Multicell-ERS (voltámetro/óhmetro).

20 Por otra parte, se aíslan unos leucocitos sanguíneos de voluntarios sanos a partir de sangre periférica de donantes sanos no emparentados, por centrifugación sobre Lymphoprep. Las suspensiones celulares (10^7 células/ml) son depositadas en una caja de Petri y una incubación de 1h30 a 37°C permite la adhesión de los monocitos. Así, los leucocitos, principalmente los linfocitos T, contenidos en la población de células no adherentes son purificados utilizando sus propiedades para formar unas rosetas en presencia de glóbulos rojos de ovejas. Estos últimos son después eliminados mediante un choque osmótico en presencia de NH_4Cl (8,7mg/l). En todos los casos, la viabilidad de la suspensión de leucocitos es superior al 95%.

25 Estos leucocitos son entonces diluidos en RPMI 1640 que contiene el 20% de suero humano AB descomplementado (56°C , 30 minutos, Sigma, St Louis, Missouri, USA).

30 Puede entonces realizarse el modelo de cocultivo Caco2/leucocitos. Para ello, los insertos de cultivos celulares de Caco2 se lavan 2 veces en un medio RPMI 1640 y se transfieren en una placa de cultivo de 6 pocillos que contiene un medio RPMI, previamente tapizados con unos leucocitos (2×10^6 células/ml) recientemente purificados. Así, los leucocitos están a nivel basolateral y los CaCo2 a nivel apical.

La estimulación mediante unos probióticos de los cocultivos CaCo2/leucocitos (glóbulos blancos de la sangre periférica) se realiza según las condiciones descritas a continuación:

35 Así, a nivel apical, se añaden 1×10^7 cfu/ml de probióticos. El medio de cultivo solo se utiliza como control negativo. Después de la estimulación durante 6 a 36h (37°C , 10% de CO_2) del cocultivo, el medio condicionado se recoge a nivel basolateral.

Se utiliza en particular como probiótico *Lactobacillus paracasei*, en particular la cepa depositada en la CNCM bajo el nº CNCMI-2116.

Ejemplo 2:

40 Se cultiva una línea de células intestinales CaCO-2 sobre unos insertos de 10,5 mm (Becton Dickinson) a razón de 2×10^5 células/pocillo. Después, estos insertos son colocados en cultivo en una placa de 12 pocillos (Nunc). Las células son entonces cultivadas durante 21 días a $37^\circ\text{C}/10\%$ de CO_2 en DMEM complementado con el 10% de FCS y el 0,1% de penicilina/estreptomicina (10'000 UI/ml, Gibco BRL).

45 Las células mononucleares de la sangre periférica (leucocitos) humana son purificadas a partir de bolsa de sangre «buffy coats» mediante centrifugación a través de una columna Ficoll-Hypaque 1077 (Pharmacia) y después se resuspenden en un medio RPMI completo complementado de suero humano AB (Gibco BRL). Se añaden entonces los leucocitos (2×10^6 células/ml) en el compartimento basolateral de los cultivos «trans-well» cuando estos presentan una capa confluyente de células CaCO-2 que han sido previamente lavadas de su medio.

50 Los cocultivos así establecidos son estimulados añadiendo 1×10^7 CFU/ml de probióticos a nivel de la superficie apical de la monocapa de células epitelial (CaCO-2). El sistema se incuba entonces durante 16h a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 . Se añaden al medio 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Gentamicina después de 4 horas de incubación.

Al final de la incubación (16h) el medio que se encuentra en el compartimento basolateral se extrae para ser ensayado.

La tabla siguiente ilustra el perfil de citoquinas de medios condicionados procedentes de la estimulación con 1×10^7 CFU/ml de *Lactobacillus paracasei* y de *Bifidobacterium longum* durante 16h.

| | IL10 pg/ml | IFN gamma pg/ml |
|--|------------|-----------------|
| <i>B. longum</i> | 170 | 110 |
| <i>L. paracasei</i> | 80 | 40 |
| <i>B. longum</i> + <i>L. paracasei</i> | 110 | 40 |

5 Estos resultados muestran que los probióticos inducen preferiblemente la producción de citoquina reguladora IL-10 más que la citoquina proinflamatoria IFN- γ .

Ejemplo 3: evaluación de la inhibición de la inflamación en un tipo de piel humana en supervivencia

Se prepara un medio condicionado según el protocolo del ejemplo 1, utilizando 1×10^7 CFU/ml de *Lactobacillus paracasei*.

10 Se utilizó un tipo de piel humana mantenido en supervivencia estimulada por un neuromediador (la sustancia P, SP). Este neuromediador es, en efecto, uno de los agentes responsables de la respuesta inflamatoria. Al lado de sus efectos vasculares (edema, vasodilatación, expresión de ELAM-1 sobre la pared de las células endoteliales), la SP en las condiciones del ensayo induce también unas reacciones bioquímicas con liberación de mediadores proinflamatorios (IL1 α , IL6, TNF α) así como una desgranulación de los mastocitos (Lembeck F, 1983; Matsuda H et al., 1989; Weidner C et al., 2000).

15 La evaluación se realizó histológicamente (evaluación del edema, modificaciones del diámetro de los capilares y del número de mastocitos desgranulados) y bioquímicamente (dosificación de TNF α).

20 Se depositaron unos fragmentos de piel de donantes diferentes en unos insertos dispuestos a su vez en suspensión encima de pocillos de cultivo. Se añadió un medio (Medio esencial Mínimo de Dulbecco, D-MEM) (antibióticos, SVF) en el fondo de los pocillos, efectuándose un paso por difusión lenta entre los dos compartimientos por medio de una membrana porosa (0,45 μ m). Son necesarias 5 horas de reequilibrio antes de empezar el protocolo.

Al final de las 5 horas de reequilibrio, los medios condicionados estimulados por *L. paracasei* (o no) se añadieron en pretratamiento en el medio de cultivo D-MEM a la concentración del 30%. Los fragmentos de piel han sido entonces mantenidos en cultivo de órganos durante 24 horas en una estufa con atmósfera húmeda, a 37°C y en presencia del 5% de CO₂.

25 A J1, el modelo experimental de inflamación se realizó añadiendo 10 μ M de sustancia P en el medio de cultivo. Los medios nutritivos se renovaron y se efectuaron 24 horas de incubación suplementarias para todas las condiciones.

Un estudio comparativo se realizó así entre las 8 condiciones siguientes:

Modelo de estimulación por SP en comparación con la piel control:

30 - piel control (condición de base: piel no estimulada, no tratada) con medio D-MEM,

- piel estimulada por la sustancia P 5 μ M de medio D-MEM,

control absoluto (condición A):

- piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% en medio D-MEM

- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% en el medio D-MEM

control negativo (condición B):

35 - piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC no estimulado por unos fermentos lácticos

- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado no estimulado por *Lactobacillus paracasei*

control positivo (condición C):

40 - piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC estimulado por *Lactobacillus paracasei*

- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado estimulado por *L. paracasei*

1- Evaluación histológica del edema y de las modificaciones del diámetro de los capilares

Los fragmentos de pieles se fijaron en el líquido de Bouin y se incluyeron en parafina. Después de la coloración por hemalun-eosina, se evaluaron 2 criterios a nivel de la dermis: el calibre de los capilares y del edema.

Los resultados son los siguientes

5 a) evaluación del % global de capilares dilatados

Modelo de estimulación por SP en comparación con la piel control:

La aplicación de la SP induce a una vasodilatación estadísticamente significativa con respecto a la piel control: 84,5 frente al 58,3% ($p < 0,05$).

Control absoluto (condición A):

10 Como en el modelo experimental, se observó una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P: 78,3 frente al 61,5% ($p < 0,05$).

Control negativo (condición B):

15 Los resultados son similares a los obtenidos con la condición A, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P, demostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: 82,2 frente al 56,7% ($p < 0,05$).

Control positivo (condición C):

20 No hay ninguna modificación del % de capilares dilatados entre las condiciones C y C+SP (60,9 frente al 54,9%), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *Lactobacillus paracasei*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición C+SP y las otras condiciones: control + SP, A + SP y B + SP ($p < 0,05$).

b) Medición de la superficie media de los capilares

Los resultados que se refieren a la medición de la superficie media de los capilares son similares a los obtenidos con el análisis del % global de capilares dilatados.

Modelo de estimulación por SP en comparación con la piel control:

25 La aplicación de la SP induce a una vasodilatación estadísticamente significativa con respecto a la piel control: 164,5 μm^2 frente a 69 μm^2 ($p < 0,05$).

Control absoluto (condición A):

Como en el modelo experimental, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P: 127,8 μm^2 frente a 57 μm^2 ($p < 0,05$).

30 Control negativo (condición B):

Los resultados son similares a los obtenidos con la condición A, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P, demostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: 154 μm^2 frente a 67 μm^2 ($p < 0,05$).

Control positivo (condición C):

35 Una disminución significativa de la superficie de los capilares dilatados para la condición C+SP con respecto a la condición C (59,2 μm^2 frente a 87 μm^2), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* ($p < 0,05$). Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición C + SP y las otras condiciones: control + SP, A + SP y B + SP ($p < 0,05$).

Evaluación del edema dérmico

40 Modelo de estimulación por SP en comparación con la piel control:

La aplicación de la SP induce un edema estadísticamente significativo con respecto a la piel control: resultado de 1,8 frente a 0,7 ($p < 0,05$).

Control absoluto (condición A):

45 Como en el modelo experimental, se observa un edema estadísticamente significativo después de la aplicación de la sustancia P: resultado de 1,9 frente a 1,3 ($p < 0,05$).

Control negativo (condición B):

Los resultados son similares a los obtenidos con la condición A: se ha observado un edema después de la aplicación de la sustancia P, demostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: resultado de 1,9 frente a 0,8 ($p < 0,05$).

5 Control positivo (condición C):

No se obtuvo ningún aumento del edema en la condición C + SP con respecto a la condición C (0,9 frente a 1), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición C + SP y las otras condiciones: control + SP, A + SP y B + SP ($p < 0,05$).

10 2 – Evaluación histológica de la desgranulación de los mastocitos

Los mastocitos presentes en la dermis se revelaron en azul-violeta mediante la coloración con azul de toluidina. Histológicamente, se ha observado un aspecto azul-violeta más o menos intenso y granuloso de los mastocitos en relación con la presencia más o menos importante en su citoplasma de granulaciones basófilas y metacromáticas que contienen en particular histamina.

15 En el tipo de piel mantenido en supervivencia estimulada por la SP, se observa una disminución estadísticamente significativa del % de mastocitos fuertemente granulados (resultado 3): 32,1% frente al 53% a nivel de las pieles control y un aumento del % de células de resultado 1: 26,5 frente al 9,5%. Por lo tanto, se obtiene así una desgranulación inducida por la sustancia P.

Control absoluto (condición A):

20 Como en el modelo experimental, se observa una disminución del % de mastocitos de resultado 3: 14,8 frente al 41,7% y un aumento del resultado 1: 36,9 frente al 12,2% ($p < 0,05$).

Control negativo (condición B):

25 Los resultados son similares a los obtenidos con la condición A, con una disminución del % de mastocitos de resultado 3: 17,5 frente al 38,5% y un aumento del % de células de resultados 1: 33,3 frente al 20,4%: ($p < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que el medio condicionado no estimulado no protege frente a la desgranulación inducida por la sustancia P.

Control positivo (condición C):

30 No se ha obtenido ninguna diferencia significativa entre el % de mastocitos de resultado 3 en la condición C y el observado en la condición C + SP (resultado de 46,9 frente a 37,2). Esta ausencia de diferencia puede por lo tanto demostrar un efecto protector moderado del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* frente a la desgranulación inducida por la sustancia P. Este efecto es parcial ya que el % de mastocitos de resultado 1 ha aumentado, pero en un nivel más bajo que en las otras condiciones: control + SP, A + SP y B + SP ($p < 0,05$). Sin embargo, siendo este aumento bajo, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre la condición C + SP y las otras condiciones: control + SP, A + SP y B + SP ($p < 0,05$).

35 3 – Ensayo de citoquina pro-inflamatoria

Se ha buscado la modulación de la secreción de citoquinas tal como el TNF-alfa.

40 El ensayo de esta citoquina se ha realizado mediante una técnica de inmuno-ensayo con lectura espectrofotométrica de la concentración (pg/ml) (kits de ensayo Chemicon International, INC). Puesto que los fragmentos de piel tienen la misma superficie (verificación del peso de cada fragmento), el ensayo se realizó a partir de los sobrenadantes de cultivo.

Los resultados del ensayo de TNF son los siguientes

En la piel control y la condición A que corresponde al control absoluto, la aplicación de la SP induce un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de TNF con relación a la piel control: respectivamente un resultado de 31,5 frente a 10,7 y un resultado de 28,6 frente a 8,32 pg/ml ($p < 0,05$).

45 La condición C + SP es estadísticamente diferente de la condición piel control + SP ($p = 0,017$), lo que sugiere que el medio condicionado *L. paracasei* disminuye la producción de TNF- α (cantidad de 10,9 frente a 16,3 pg/ml).

Conclusión

50 En este tipo de piel humana mantenida en supervivencia, se ha puesto en evidencia un efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* (C), con disminución importante y estadísticamente significativa de la vasodilatación, del edema inducido, de la desgranulación de los mastocitos y de la liberación de TNF inducidos

por la sustancia P con respecto a las condiciones A + SP (medio RPMI) y B + SP (medio condicionado no estimulado).

Ejemplo 4: Evaluación de la inhibición de la inflamación en un tipo de piel humana en supervivencia.

5 El medio condicionado se prepara según el protocolo del ejemplo 1, utilizando 1×10^7 CFU/ml de *Lactobacillus paracasei* o *Bifidobacterim longum*

Se ha utilizado un tipo de piel humana mantenida en supervivencia estimulada por un neuromediador (la sustancia P, SP). En efecto, este neuromediador es uno de los agentes responsables de la respuesta inflamatoria y de los efectos vasculares (edema, vasodilatación, expresión de ELAM-1 sobre la pared de las células endoteliales). La evaluación se ha realizado histológicamente (evaluación del edema, modificaciones del diámetro de los capilares).

10 Se han depositado unos fragmentos de piel de donantes diferentes en unos insertos dispuestos a su vez en suspensión encima de pocillos de cultivo. Se ha añadido uno medio (Medio Esencial Mínimo de Dulbecco, D-MEM) (antibióticos, SVF) en el fondo de los pocillos, efectuándose un paso por difusión lenta entre los dos compartimentos por medio de una membrana porosa (0,45 μ m). Se necesitan 5 horas de reequilibrio antes de empezar el protocolo.

15 Al final de las 5 horas de reequilibrio, el medio condicionado estimulado (o no) por *L. paracasei* y/o *B. longum* se añadió en pretratamiento en el medio de cultivo D-MEM a la concentración del 30%. Los fragmentos de piel se mantuvieron entonces en cultivo de órganos durante 24 horas en una estufa con atmósfera húmeda, a 37°C y en presencia del 5% de CO₂.

20 A J1, el modelo experimental de inflamación se ha realizado añadiendo 10 μ M de sustancia P en el medio de cultivo. Los medios nutritivos se renovaron y se efectuaron 24 horas de incubación suplementarias para todas las condiciones.

Se realizó así un estudio comparativo entre las 8 condiciones siguientes:

Modelo de estimulación por SP en comparación con la piel control:

- piel control (condición de base: piel no estimulada, no tratada) con medio D-MEM,
- piel estimulada por la sustancia P 5 μ M en medio D-MEM,

25 control absoluto (condición 1):

- piel cultivada con un medio nutritivo RPMI al 30% en medio D-MEM
- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% en el medio D-MEM

control negativo (condición 2):

- 30
- piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC no estimulado por unos fermentos lácticos
 - piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado no estimulado por unos probióticos

condición 3:

- 35
- piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC estimulado por *Lactobacillus paracasei*+ *Bifidobacterium Longum*
 - piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado estimulado por *L. paracasei* + *B. Longum*

condición 4:

- piel cultivada con el medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC estimulado por *Lactobacillus paracasei*
- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado estimulado por *L. paracasei*

40 condición 5:

- piel cultivada con un medio nutritivo (RPMI) al 30% procedente de un cocultivo CaCO₂/PBMC estimulado por *Bifidobacterium Longum*
- piel estimulada por la sustancia P y cultivada con el medio condicionado estimulado por *B. Longum*

Evaluación histológica del edema y de las modificaciones del diámetro de los capilares

Los fragmentos de pieles se fijaron en el líquido de Bouin y se incluyeron en parafina. Después de la coloración por hemalun-eosina, se evaluaron 2 criterios a nivel de la dermis: el calibre de los capilares y el edema.

Los resultados son los siguientes

a) Evaluación del % global de capilares dilatados

5 control absoluto (condición 1):

Como en el modelo experimental, se ha observado una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P: 86,6 frente al 63,8% ($p < 0,05$).

control negativo (condición 2):

10 Los resultados son similares a los obtenidos con la condición 1, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P, desmostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: 86,1 frente al 75,3% ($p < 0,05$).

Condición 3:

15 No hay ninguna modificación del % de capilares dilatados entre las condiciones 3 y 3+SP (72,4 frente al 72,4%), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *Lactobacillus paracasei* + *B. Longum*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 3 + SP y las otras condiciones: control + SP, 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 4:

20 No hay ninguna modificación del % de capilares dilatados entre las condiciones 4 y 4+SP (73,2 frente al 71,6%), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *Lactobacillus paracasei*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 4 + SP y las otras condiciones: control + SP, 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 5:

25 No hay ninguna modificación del % de capilares dilatados entre las condiciones 5 y 5+SP (75,6 frente al 66,9%), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *B. Longum*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 5 + SP y las otras condiciones: control + SP, 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

b) Medición de la superficie media de los capilares

Los resultados que se refieren a la medición de la superficie media de los capilares son similares a los obtenidos con el análisis del % global de capilares dilatados.

30 Control absoluto (condición 1):

Como en el modelo experimental, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P: $172,6 \mu\text{m}^2$ frente a $95,36 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$).

Control negativo (condición 2):

35 Los resultados son similares a los obtenidos con la condición 1, se observa una dilatación estadísticamente significativa de los capilares después de la aplicación de la sustancia P, demostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: $163,8 \mu\text{m}^2$ frente a $110,3 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$).

Condición 3:

40 Hay una disminución significativa de la superficie de los capilares dilatados para la condición 3+SP con respecto a la condición 3 ($121,9 \mu\text{m}^2$ frente a $102 \mu\text{m}^2$), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* + *B. Longum* ($p < 0,05$). Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 3 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 4:

45 Hay una disminución significativa de la superficie de los capilares dilatados para la condición 3+SP con respecto a la condición 4 ($112,3 \mu\text{m}^2$ frente a $117,4 \mu\text{m}^2$), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* ($p < 0,05$). Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 4 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 5:

Hay una disminución significativa de la superficie de los capilares dilatados para la condición 5+SP con respecto a la condición 5 (110,4 μm^2 frente a 105,7 μm^2), lo que demuestra el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *B. Longum* ($p < 0,05$). Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 5 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

5 Evaluación del edema dérmico

Control absoluto (condición 1):

Como en el modelo experimental, se observa un edema estadísticamente significativo después de la aplicación de la sustancia P: resultado de 1,7 frente a 1,05 ($p < 0,05$).

Control negativo (condición 2):

10 Los resultados son similares a los obtenidos con la condición 1: se observó un edema después de la aplicación de la sustancia P, demostrando la ausencia de un efecto antiinflamatorio del medio condicionado no estimulado: resultado de 1,4 frente a 1,3 ($p < 0,05$).

Condición 3:

15 No se ha obtenido ningún aumento del edema en la condición 3 + SP con respecto a la condición 3 (1,23 frente a 1,17), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *L. paracasei* + *B. Longum*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 3 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 4:

20 No se ha obtenido ningún aumento del edema en la condición 4 + SP con respecto a la condición 4 (1,37 frente a 1,38), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado por *L. paracasei*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 3 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Condición 5:

25 No se ha obtenido ningún aumento del edema en la condición 5+ SP con respecto a la condición 5 (1,4 frente a 1,06), demostrando el efecto antiinflamatorio del medio condicionado estimulado por *B. Longum*. Este resultado está confirmado por la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la condición 3 + SP y las otras condiciones: 1 + SP y 2 + SP ($p < 0,05$).

Ejemplo 5: Composiciones

Composición para preparar la piel para el sol

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Medio condicionado estimulado * | 2,5% |
| conservantes | 1,35% |
| Citrato de sodio | 0,035% |
| PEG-40 | 1,25% |
| Pentaeritritil tetraetilhexanoato | 4% |
| Glicerina | 7% |
| Triestearato de sorbitano | 0,3% |
| Aceite de "Prunus armeniaca Kermel" | 2% |
| Alcohol cetílico | 0,7% |
| Propilenglicol | 2% |
| Trietanolamina | 0,4% |
| Ciclohexasiloxano | 2% |
| Carbómero | 0,75% |
| Tocoferol | 1% |

ES 2 465 671 T3

Composición para preparar la piel para el sol

| | |
|--------------------------------|------|
| Sílice | 2% |
| Ascorbil glucósido | 0,1% |
| Policaprolactona-beta caroteno | 5% |
| agua csp | 100% |

*obtenido según el ejemplo 1

Composición que contiene unos filtros solares

| | |
|--|----------|
| Medio condicionado estimulado ** | 3,5% |
| Mezcla de alcohol cetilestearílico y de alcohol cetilestearílico oxietilenado (33OE) 80/20 | 7,0% |
| Mezcla de mono y diestearato de glicerol | 2,0% |
| alcohol cetílico | 1,5% |
| Polidimetilsiloxano | 1,5% |
| Aceite de vaselina | 15,0% |
| Metoxidibenzoilmetano de butilo | 3,0% |
| Octocrileno | 7,0% |
| Glicerina | 20,0% |
| agua desmineralizada | csp 100% |

**obtenido según el ejemplo 1, pero con una mezcla de *L. paracasei* y de *B. longum*

Crema

| | |
|--|----------|
| Extracto de medio condicionado * | 1,5% |
| Estearato de glicerilo y estearato PEG 100 | 5,0% |
| Isohexadecano | 8,0% |
| Manteca de Karité | 5,0% |
| Glicerina | 3,0% |
| Carbopol 981 0,2% | 0,2% |
| Lubragel | 5,0% |
| Fenoxietanol | 1,0% |
| Ácido cítrico | 1,0% |
| BHT | 0,05% |
| Agua | csp 100% |

*obtenido según el ejemplo 1 y liofilizado

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio de cultivo celular condicionado o un extracto de este, siendo el extracto obtenido por concentración y/o liofilización, o composición que lo contiene, para su utilización para el tratamiento de los síntomas de la inflamación y/o de los trastornos inmunitarios, siendo dicho medio susceptible de ser obtenido por contacto con al menos un cultivo de células del tracto digestivo, al menos unos microorganismos probióticos y además unas células de la sangre periférica.
2. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado por que las células de la sangre periférica son unos leucocitos.
- 10 3. Medio de cultivo, extracto o composición, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las células digestivas son unas células epiteliales del intestino.
- 15 4. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que al menos un microorganismo probiótico es seleccionado del grupo siguiente: *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*.
- 20 5. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que al menos un microorganismo probiótico se selecciona entre las bacterias lácticas, las bifidobacterias y las levaduras *Saccharomyces*.
6. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que al menos un microorganismo se selecciona entre las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
7. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de los síntomas de la irritación de la piel y/o del cuero cabelludo.
- 25 8. Medio de cultivo, extracto o composición, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para proteger las células cutáneas de los daños causados por las radiaciones UV.
9. Medio de cultivo, extracto o composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, para proteger las células de los daños de su ADN.
10. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la composición es una composición farmacéutica.
- 30 11. Composición según la reivindicación anterior, adaptada para una aplicación tópica sobre la piel o las fáneras.
12. Composición cosmética o dermatológica, caracterizada por que contiene al menos un medio condicionado o un extracto de medio condicionado, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 6, y al menos un agente que tiene un efecto secundario irritante.