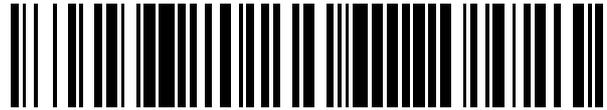


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 597**

51 Int. Cl.:

A61K 35/66 (2015.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2005 E 05724287 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1722804**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de la piel con extracto de Lactobacillus**

30 Prioridad:

04.03.2004 US 550078 P

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

17.03.2015

73 Titular/es:

**E-L MANAGEMENT CORP. (100.0%)
767 FIFTH AVENUE
NEW YORK, NY 10153, US**

72 Inventor/es:

**SULLIVAN, MICHAEL;
SCHNITTGER, STEVEN F;
MAMMONE, THOMAS y
GOYARTS, EARL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 531 597 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

Procedimiento de tratamiento de la piel con extracto de *Lactobacillus*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones cosméticas y los usos de las mismas. En particular, la invención versa sobre composiciones cosméticas que pueden ser usadas para estimular la producción de betadefensinas en las células de la piel.

Antecedentes de la invención

10 Los péptidos antimicrobianos son un sistema defensivo que se produce de forma natural que es generalizado en varias especies vegetales y animales. Un tipo de péptido antimicrobiano encontrado en los vertebrados es el grupo de moléculas denominadas defensinas. Estructuralmente, estas moléculas están unidas por la presencia de seis cisteínas invariantes y tres enlaces disulfuro entre moléculas de cisteína (Lehrer et al., Cell 64: 229-230, 1997; Ann. Rev. Immunol. 11: 105-128, 1993). Se han observado dos clases diferentes de defensinas. La primera son las defensinas clásicas, que se almacenan en los neutrófilos y los macrófagos, y que son usadas para inactivar los microbios que han fagocitado estas células. La segunda clase comprende las betadefensinas, que han sido aisladas de células pulmonares y cutáneas de mamíferos. Se sabe que estas moléculas presentan una amplia gama de actividad antibiótica contra patógenos tales como bacterias, hongos y virus (Porter et al., Infect. Immun. 65(6): 2396-2401, 1997).

20 Según se ha hecho notar anteriormente, las células de la piel han mostrado que producen betadefensinas. También se ha mostrado que la exposición de las células de la piel a células bacterianas, en particular *Pseudomonas*, aunque sea en un estado inactivado, puede inducir la producción de betadefensinas en queratinocitos. Presumiblemente, esta respuesta está presente en la piel para protegerla del ataque de estímulos nocivos, particularmente en forma de microbios. Se ha teorizado que los componentes estimuladores de las bacterias Gram positivas pueden ser el ácido lipoteicoico o los peptidoglicanos, mientras que el LPS, una endotoxina, es responsable de provocar la respuesta de las betadefensinas a las bacterias Gram negativas.

25 Sería útil que resultase posible provocar esta respuesta desde la piel a voluntad con un estimulante más seguro, para proporcionar un agente protector coherente en la piel. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha sugerido el uso de una bacteria más segura que *Pseudomonas* para provocar las betadefensinas de las células de la piel. La presente invención proporciona ahora un procedimiento para estimular la producción de betadefensinas en las células de la piel con una bacteria no patógena cosméticamente aceptable.

Sumario de la invención

30 La invención versa sobre un procedimiento para estimular la producción de betadefensinas en las células de la piel que comprende la aplicación a las células de la piel de una cantidad estimuladora efectiva de un extracto de *Lactobacillus*. La invención también versa sobre un procedimiento de protección de la piel, mediante la aplicación de una cantidad estimuladora efectiva de un extracto de *Lactobacillus*, contra lesiones debidas a estímulos nocivos.

Breve descripción de las figuras

35 Las Figuras 1 y 2 ilustran una cuantificación visual de la banda de ARN ribosómico 28S para diversas muestras de fracciones de extracto de *Lactobacillus*. Figura 1, identificación de pistas: 1, 1844 filtrado 5×10^9 ; 2, 1839 fermento 10^8 ; 3, 1839 retenido 5×10^{10} ; 4, 1839 filtrado 10^9 ; 5, 1839 filtrado 5×10^9 ; 6, 1839 filtrado 10^9 ; 7, 1839 HXCH 10^9 ; 8, lambda HindIII. Figura 2, identificación de pistas: 1, lambda HindIII; 2, B sin tratar; 3, 1844 fermento 5×10^9 ; 4, 1844 retenido 10^9 ; 5, 1844 retenido 5×10^{10} ; 6, 1844 filtrado 5×10^9 ; 7, 1844 HXCH 10^9 ; 8, 1844 HXCH 5×10^9 .

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra la preparación de diversas fracciones de extracto de *Lactobacillus*.

40 La Figura 4 ilustra el efecto de diversas fracciones de los extractos 1839 y 1844 de *Lactobacillus* en los niveles a ARNm ribosómico 18S de control interno tras 48 horas de desarrollo de NHEK. Las muestras grises claras son las no tratadas. Las muestras verdes corresponden a los fermentos 1844 no procesados (10^8 , 10^9 , 5×10^9 o 10^{10} bacterias). Las muestras verdes claras corresponden a los fermentos 1839 no procesados (10^8 , 10^9 o 10^{10}). Las muestras rojas corresponden a las muestras 1844 con intercambio de calor (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). Las muestras amarillas corresponden a las muestras 1839 con intercambio de calor (10^8 , 10^9 o 10^{10}). Las muestras azules corresponden a los filtrados 1844 (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). Las muestras azules claras corresponden a los filtrados 1839 (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). El filtrado consiste en restos celulares hidrosolubles que pueden atravesar el filtro de flujo transversal. Las muestras moradas corresponden a los retenidos 1844 (10^9 , 10^{10} o 5×10^{10}). Las muestras rosadas corresponden a los retenidos 1839 (10^9 , 10^{10} o 5×10^{10}). El retenido contiene restos celulares insolubles en agua que no atraviesan el filtro de flujo transversal (0,22 μ). Las muestras que tienen un "*" son tratamientos independientes.

La Figura 5 ilustra el efecto de diversas fracciones de extractos 1839 y 1844 de *Lactobacillus* en los niveles de ARNm de betadefensina-2 humana tras 48 horas de desarrollo de NHEK. Las muestras grises claras son las no tratadas. Las muestras verdes corresponden a los fermentos 1844 no procesados (10^8 , 10^9 , 5×10^9 o 10^{10} bacterias). Las muestras verdes claras corresponden a los fermentos 1839 no procesados (10^8 , 10^9 o 10^{10}). Las muestras rojas corresponden a las muestras 1844 con intercambio de calor (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). Las muestras amarillas corresponden a las muestras 1839 con intercambio de calor (10^8 , 10^9 o 10^{10}). Las muestras azules corresponden a los filtrados 1844 (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). Las muestras azules claras corresponden a los filtrados 1839 (10^9 , 5×10^9 o 10^{10}). El filtrado consiste en restos celulares hidrosolubles que pueden atravesar el filtro de flujo transversal. Las muestras moradas corresponden a los retenidos 1844 (10^9 , 10^{10} o 5×10^{10}). Las muestras rosadas corresponden a los retenidos 1839 (10^9 , 10^{10} o 5×10^{10}). El retenido contiene restos celulares insolubles en agua que no atraviesan el filtro de flujo transversal (0,22 μ). Las muestras que tienen un "*" son tratamientos independientes.

La Figura 6 ilustra el efecto de otros materiales en los niveles de ARNm de betadefensina-2 humana tras 48 horas de desarrollo de NHEK en comparación con el efecto de fracciones de *Lactobacillus*. Las muestras grises claras son las no tratadas. La muestra blanca es la mangiferina (n° 4245) de la MMP. Las muestras rojas corresponden a las muestras de *Pseudomonas aeruginosa* (10^5 , 10^6 o 10^7 bacterias). Las muestras verdes azuladas corresponden a una mezcla de *Lactobacillus* cultivado en agar (10^8 bacterias) y de *Pseudomonas* cultivado en agar (10^5 o 10^6 bacterias). La muestra amarilla corresponde a *Lactobacillus* cultivado en agar (10^8). Las muestras azules corresponden al fermento de *Lactobacillus* sin procesar durante 24 horas. Las muestras turquesa corresponden a la muestra no procesada con intercambio térmico. Las muestras verdes oscuras corresponden al filtrado. El filtrado consiste en restos celulares hidrosolubles que pueden atravesar el filtro de flujo transversal (0,22 μ). Las muestras verdes claras corresponden al retenido. El retenido contiene restos celulares insolubles en agua que no atraviesan el filtro de flujo transversal (0,22 μ).

La Figura 7 ilustra el efecto de los extractos de *Lactobacillus* en la cantidad de microflora sobre la piel.

La Figura 8 ilustra el efecto de los extractos de *Lactobacillus* en la microflora de la piel en comparación con los estimuladores antimicrobianos/de defensiva Triclosán y Promilin.

La Figura 9 ilustra el efecto de una composición que contiene una solución de *Lactobacillus* al 10% sobre (a) pápulas y pústulas de acné y (b) comedones abiertos y cerrados de acné en un periodo de seis semanas.

La Figura 10 ilustra el efecto del extracto de *Lactobacillus* en el escozor del ácido láctico, en comparación con el Triclosán y el Alguard.

Descripción detallada de la invención

La invención está basada en la observación de que los extractos de *Lactobacillus* pueden estimular la producción de betadefensinas en las células de la piel, generalmente de una manera dependiente de la dosis. En particular, se ha observado que varias formas diferentes de extractos de *Lactobacillus*, incluyendo extractos que contienen materiales tanto hidrosolubles como insolubles en agua, son capaces de provocar la producción de betadefensina en cultivos de células cutáneas. En la Figura 1 se proporciona una representación esquemática de la preparación de las diversas muestras de tratamiento. En resumen, cada una de las muestras de extracto sin procesar, así como del filtrado y el retenido fraccionados mediante calor y sometidos a filtrado transversal, presenta cierto nivel de actividad en la estimulación de la producción de betadefensinas. La actividad tiene una prominencia máxima en muestras que comprenden concentraciones celulares en el intervalo de al menos aproximadamente 1×10^9 hasta aproximadamente 1×10^{10} . Se ha demostrado que los extractos cultivados en caldo tanto a base de ternera como de alubia poseen actividad inductora de las betadefensinas.

Se han usado anteriormente extractos de *Lactobacillus* en aplicaciones cosméticas con fines diversos. Por ejemplo, el documento WO9907332 da a conocer el uso de cepas de *Lactobacillus acidophilus* para producir fermentos que se dice que resultan útiles para proteger la piel contra microflora patógena. El documento EP 1097700 da a conocer una composición de crecimiento capilar que contiene un filtrado de *Lactobacillus bulgaricus*. El documento WO 02/60395 versa sobre un producto preparado con arroz fermentado con *Lactobacillus plantarum*, producto que se dice que resulta útil en productos de cuidado de la piel como emulsionante. El documento JP 3112983 da a conocer una combinación de células trituradas de *Lactobacillus* y líquido de fermentación para la retención de la humedad en la piel. El documento JP 2002037742 describe un metabolito de *Lactobacillus* fermentado útil para la lucha contra la fatiga y el envejecimiento de la piel. El documento JP 2002037739 da a conocer un "inmunomodulador" que es un metabolito de la fermentación de bacterias del ácido láctico sobre diversos sustratos. El documento JP 2804312 describe una leche de soja fermentada por la especie *Lactobacillus* que se dice que resulta útil para el blanqueamiento. Sin embargo, hasta donde sepan los solicitantes, el *Lactobacillus* no ha sido usado previamente para estimular la producción de betadefensinas en las células de la piel.

Pueden usarse diferentes formas del extracto en las composiciones y los procedimientos de la invención, dado que la actividad pertinente puede encontrarse en diversas fracciones. Por ejemplo, puede usarse un extracto hervido pero, por lo demás, no tratado; sin embargo, también puede obtenerse actividad similar usando un extracto tratado por intercambio térmico (calentado rápidamente y enfriado de forma instantánea), en el que las células bacterianas resultan descompuestas. Además, un extracto tratado por intercambio de calor sometido, adicionalmente, a filtrado

de flujo transversal con un filtro de 0,22 μ producirá un filtrado (que contiene restos celulares hidrosolubles) y un retenido (que contiene restos celulares insolubles en agua), cada uno de los cuales presenta actividad inductora de las defensinas. Puede usarse uno o una combinación de estos extractos o fracciones.

5 En la práctica, los extractos de *Lactobacillus* se combinan en casi cualquier tipo de vehículo tópicamente útil, en cantidades capaces de estimular la producción de betadefensinas. Los vehículos serán los que sean farmacéutica o cosméticamente aceptables, es decir, un vehículo para uso farmacéutico o cosmético previsto para su aplicación a superficies externas del cuerpo, tales como la piel, el cabello o las uñas, vehículo que suministra los componentes activos a la diana prevista y que no causa daño al ser humano promedio ni a otros organismos receptores cuando es aplicado a la superficie que se prevé tratar. Según se usan en la presente memoria, se entenderá que “farmacéutico” o “cosmético” abarcan compuestos farmacéuticos o cosméticos tanto para seres humanos como para animales, preferentemente mamíferos, con los que el componente activo es compatible; por ejemplo, un gel, una crema, una loción, una pomada, una espuma, una aerosol, una barra sólida, polvos, una suspensión, una dispersión y similares. Las técnicas para la formulación de diversos tipos de vehículos son bien conocidas para los expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en *Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry*, Williams y Schmitt, eds., Blackie Academic and Professional, segunda edición, 1996, *Harry's Cosmeticology*, octava edición, M. Reiger, ed. (2000), y *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, vigésima edición, A. Gennaro, ed. (2003), incorporándose el contenido de cada una de estas obras a la presente memoria por referencia. Puede emplearse cualquier composición típica que resulte útil para su administración tópica, por ejemplo dispersiones acuosas, composiciones anhidridas, emulsiones (aceite o silicona en agua, agua en aceite o silicona, emulsiones múltiples, microemulsiones, nanoemulsiones), con la condición de que los componentes sean compatibles con el extracto o la fracción activos. La composición también puede contener otros componentes tópicamente útiles que pueden mejorar o complementar la actividad de la composición. La elección de los ingredientes acompañantes en la composición también dependerá del uso previsto de las composiciones. Pueden encontrarse ingredientes estándar tópicamente útiles, por ejemplo, en *The International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, 10ª edición, 2004, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria por referencia. Ejemplos de categorías útiles de ingredientes tópicamente aceptables que pueden combinarse con los extractos incluyen, sin limitación: fragancias o aceites esenciales; pigmentos o colorantes; adyuvantes de la formulación tales como antiaglomerantes, antiespumantes, materiales de carga y antiapelmazantes, espesantes, gelificantes, estructurantes y estabilizantes de emulsión; tensioactivos y emulsionantes; espumógenos para mejorar la adhesión y la retención en la diana prevista; propelentes, conservantes y reguladores del pH y neutralizantes. Otros componentes que puede resultar útiles en combinación con los extractos son los ingredientes que proporcionan un beneficio adicional a la superficie queratinosa a la que se aplicará la composición, a los que se denominará en lo sucesivo “agentes beneficiosos para la piel”. Ejemplos de tales agentes beneficiosos para la piel incluyen, sin limitación: astringentes, tales como aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo, destilado de hamamelis; antioxidantes o eliminadores de radicales libres, tales como el ácido ascórbico, sus ésteres grasos y sus fosfatos, el tocoferol y sus derivados la N-acetil cisteína, el ácido sórbico y el ácido lipoico; agentes antiacné, tales como el ácido salicílico y el peróxido de benzoílo; agentes antimicrobianos o antifúngicos, tales como el caprilil glicol, el triclosán, el fenoxietanol, la eritromicina, el tolnaftato, la nistatina o el clortrimazol; quelantes tales como EDTA; analgésicos tópicos tales como la benzocaína, la lidocaína o la procaína; agentes antienvjecimiento/antiarrugas tales como los retinoides o los ácidos hidróxidos; despigmentantes de la piel como el regaliz, los fosfatos de ascorbilo, la hidroquinona o el ácido cójico), acondicionadores de la piel (por ejemplo, hidratantes, incluyendo los misceláneos y los oclusivos), antiirritantes, como la cola, el bisabolol, el aloe vera o el pantenol, antiinflamatorios tales como hidrocortisona, clobetasol, dexametasona, prednisona, ácido acetil salicílico, ácido glicirrítico o ácido glicirrético; anticelulíticos tales como la cafeína y otras xantinas; hidratantes tales como los polioles de alquileno o el ácido hialurónico; emolientes tales como los ésteres oleosos o petrolato; protectores solares (orgánicos o inorgánicos) tales como avobenzona, oxibenzona, octilmetoxicinamato, dióxido de titanio u óxido de cinc; exfoliantes (químicos o físicos) tales como N-acetil glucosamina, fosfato de manosa, ácidos hidróxidos, ácido lactobiónico, huesos de melocotón o sales marinas; autobronceantes tales como la dihidroxiacetona; y péptidos biológicamente activos, tales como el pentapéptido de palmitoílo o la argirelina. Estos agentes beneficiosos para la piel serán usados en las cantidades que se sabe que normalmente son efectivas para ese activo cuando se usan con el fin previsto.

La cantidad de extracto usada dependerá de las concentraciones de material bacteriano en el extracto, pero pueden emplearse extractos basados en una concentración entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 1×10^{10} células en una concentración entre aproximadamente el 0,001 y aproximadamente el 50% en peso, preferentemente entre aproximadamente el 0,001 y aproximadamente el 30% en peso, más preferentemente entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 20% en peso de la composición total. Pueden usarse como base para el extracto cepas de *Lactobacillus* de cualquier especie generalmente reconocida como segura. Se prefieren en particular los extractos derivados del *L. plantarum*.

Los extractos inductores de defensinas pueden resultar útiles en la reducción o la prevención del desarrollo de poblaciones microbianas en la piel. Se aplican con este fin a la piel composiciones que contienen cantidades efectivas (según se ha descrito en lo que antecede) de extractos de *Lactobacillus* cuando se necesite, por ejemplo en un corte o una herida abiertos que puedan haber estado en contacto con suciedad o microbios no deseados, o se aplican de forma crónica a la piel limpia para mantener un nivel saludable de la flora cutánea de forma cotidiana.

Los extractos también pueden resultar útiles como conservante en productos cosméticos o farmacéuticos. En particular, los extractos de *Lactobacillus plantarum* y las fracciones de los mismos muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias *in vitro* tanto Gram positivas como Gram negativas.

5 Los extractos de la invención también resultan útiles en el tratamiento del acné. Se demuestra que las composiciones tópicas que contienen extracto de *Lactobacillus plantarum* reducen la incidencia de lesiones de acné tanto inflamadas como no inflamadas cuando se aplican regularmente en un periodo de seis semanas (véase el Ejemplo 5).

10 Los extractos de la invención también resultan útiles en la reducción de la sensibilidad de la piel, según se muestra por la reducción del escozor del ácido láctico (Ejemplo 6) cuando se usan regularmente (dos veces al día) durante un periodo de 2 meses.

La invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

Procedimiento para la fermentación de *Lactobacillus plantarum*

15 El organismo *L. plantarum* es mantenido a un pH final de $6,3 \pm 0,2$ en agar MRS no animal con la siguiente composición:

| | |
|----------------------|-----------------|
| Peptona | 10 gramos/litro |
| Extracto de levadura | 20 |
| Glucosa | 20 |
| Tween 80 | 1,08 |
| Fosfato dipotásico | 2 |
| Acetato sódico | 5 |
| Citrato amónico | 2 |
| Sulfato magnésico | 0,2 |
| Sulfato manganésico | 0,05 |

Para crear el medio de agar MRS de trabajo, se suspenden 55,3 g de polvo en un litro de agua purificada y se mezclan completamente. Se calienta la mezcla con agitación frecuencia y se hierve durante un minuto para disolver el polvo por completo. El medio es esterilizado a continuación en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Características del *Lactobacillus plantarum*

20 El *L. plantarum* cosechado tiene la forma de barras rectas con extremos redondeados, generalmente de 0,9-1,2 micrómetros de anchura y 3-8 micrómetros de longitud. El organismo se da aisladamente en pares o cadenas cortas. En la Tabla 1 se ilustran las características bioquímicas del *L. plantarum*.

TABLA 1

Características del *Lactobacillus plantarum*

| |
|---------------------------------|
| Mortalidad - |
| Tinción de Gram + |
| Caseína digerida +* |
| Producción de indoles - |
| H ₂ S ± |
| Catalasa - |
| Citocromo - |
| Reacción de bencidina - |
| Pigmento blanquecino |
| Crecimiento en medios sólidos + |
| Crecimiento anaerobio + |
| Temperatura óptima: 30-40°C |
| pH óptimo: 5,5 |

*Las cepas con porcentajes positivos previstos muestran una reacción positiva después de 48 horas a 37°C.

Fermentación

25 Tras haber sido cosechado, el *L. plantarum* es cultivado anaeróticamente por fermentación. El organismo *L. plantarum* es transferido con un asa estéril desde un MRS inclinado e inoculado en un matraz que contiene dos litros de medio de caldo MRS no animal. Se incuba el caldo durante la noche a 37°C con agitación para lograr un buen desarrollo. El medio se enturbia. El cultivo es transferido entonces a un medio sólido y recibe tinción Gram para confirmar la pureza del cultivo.

30 Se llena un fermentador New Brunswick de 15 litros con 10 litros de medio que tiene la siguiente receta:

| | |
|----------------------|-----------------|
| Peptona vegetal | 20 gramos/litro |
| Extracto de levadura | 5 |
| Glucosa | 20 |
| Tween 80 | 1,08 |
| Fosfato dipotásico | 2 |
| Acetato sódico | 5 |
| Citrato amónico | 2 |
| Sulfato magnésico | 0,2 |
| Sulfato manganésico | 0,05 |

El fermentador y el medio son esterilizados durante 15 minutos a 103,42 kPa de presión a 121°C. Se añade el medio del fermentador a agua desionizada y se lo pone en el fermentador, diluido hasta un volumen de 10 litros, y se esteriliza a 117,21 kPa a 120°C durante 20 minutos. Se rocía nitrógeno comprimido ultrapuro en el fermentador para mantener un oxígeno disuelto de 0 Pa a un caudal de 1,5 L/min. Después de enfriarlo hasta la temperatura ambiente, se añade asépticamente el inóculo del matraz de 2 litros a los 10 litros del medio del fermentador. Se lleva la temperatura del fermentador hasta 30-32°C con agitación a 150 rpm. El pH inicial del medio es 6,0 - 6,2. Se incubaba el cultivo durante 16 - 20 horas a 30-32°C, siendo el pH final de la mezcla 4,0 - 4,2 y una densidad de población de 10^6 - 10^7 células por mililitro.

A continuación se hace pasar la solución de fermentación por un intercambiador térmico de serpentín con secciones de calentamiento y de enfriamiento. El caldo es lisado elevando la temperatura hasta 105 - 110°C y luego enfriado inmediatamente hasta 7- 10°C. En ese instante todas las células intactas han sido lisadas. Acto seguido, se hace que el fermento atraviese una unidad de filtración de flujo transversal de 0,22 micrómetros con un caudal de 0,4 litros por minuto y se lo transfiere a una cuba auxiliar de almacenamiento, momento en el que se añade fenoxietanol al 0,5% como conservante. A continuación, el producto es almacenado en un recipiente forrado de polietileno.

Ejemplo 2

Introducción: Se cultivó *Lactobacillus plantarum* en condiciones anaerobias usando el fermentador New Brunswick (volumen de 10 litros) según se ha descrito más arriba y se lo designó **MIC 1844**. La **MIC 1844** fue fermentada durante 24 horas a 30°C. Las bacterias fueron fraccionadas con el intercambiador de calor (1 paso) según se ha descrito ya, y fueron procesadas atravesando el filtro de flujo transversal de 0,22 μ . El fermento no procesado, las muestras sometidas a intercambio de calor (sin procesamiento), el **filtrado** y el **retenido** fueron sometidos a ensayo sobre NHEK en busca de la inducción de hBD-2. Los restos celulares no filtrables recuperados del intercambio de calor y procesados atravesando el flujo transversal recibieron la designación de **retenido**. El **retenido** fue concentrado 7 veces mediante un proceso de filtración. La concentración final del fermento no procesado estuvo entre **2,5 y $5,0 \times 10^{10}$** células/ml. El material filtrado recuperado del intercambio de calor y la filtración por flujo transversal (medios metabolizados y componentes celulares solubles) recibió la designación de **filtrado**. El **filtrado** tenía la misma concentración que el fermento no procesado con intercambio de calor o que el no procesado. Todas las fracciones fueron hervidas 20 minutos antes de la incubación con los NHEK. Estas precauciones se justificaban porque las bacterias viables proliferan mucho durante el tratamiento de los NHEK, lo que lleva a la contaminación del cultivo en mamíferos y a un resultado nulo.

Se esperaba que la concentración de las bacterias en el fermento 1844 fuera similar a la del fermento 1839, cultivados en un caldo MRS a base de ternera, y almacenados durante un periodo de tres meses a 4°C. No pudieron determinarse recuentos antes de tratar los NHEK con los extractos bacterianos. Por lo tanto, se supuso que la concentración de células bacterianas era similar.

El ácido lipoteicoico (hidrosoluble) y los peptidoglicanos (insolubles en agua) son los componentes principales de la pared celular para las bacterias Gram positivas para inducir hDB-2 mediante NHEK a través del receptor tipo peaje. El LPS o endotoxina es el componente fundamental de la membrana externa de las bacterias Gram negativas para inducir hBD-2. Los ácidos lipoteicoicos del *Lactobacillus* probablemente estén presentes en el **filtrado** y contribuyan a la inducción de ARNm hBD-2 en los NHEK. De forma similar, los peptidoglicanos del *Lactobacillus* pueden estar presentes en el **retenido** y pueden contribuir a la inducción de ARNm hBD-2 en los NHEK. Esto podría explicar por qué se encontró actividad en estas dos fracciones.

Procedimientos: Se cultivaron NHEK en presencia de Cascade EPI Life. Las células fueron tratadas en la confluencia del 80-90%. Los NHEK fueron tratados durante 48 horas y se cosechó el ARN. Se cultivaron *Lactobacilli* en presencia de un extracto de alubia proporcionado por Solabia. Este medio fue preparado partiendo de cero. El caldo MRS de *Lactobacillus* de DIFCO contiene peptona, extracto de ternera, extracto de levadura, dextrosa, acetato sódico y una selección de sales. En esta receta, el extracto de ternera (10 g/litro) fue sustituido con extracto de alubia (10 g/litro) de **Solabia**. El fermento no procesado, las muestras sometidas a intercambio de calor, la fracción filtrada y la fracción retenida del experimento 1844 fueron comparados con las fracciones 1839. Las fracciones 1839 se derivaron de *Lactobacilli* cultivados en caldo MRS (extracto de ternera) y sometidos a intercambio de calor. Las 4 fracciones fueron mantenidas a 4°C durante **3 meses**. Los *Lactobacilli* fueron cultivados en un fermentador New Brunswick de 10 L durante **24 horas a 30°C**. La recuperación del fermento 1844 fue de **$2,5 \times 10^{10}$** células/ml. El

fermento 1839 tuvo aproximadamente entre 9×10^{10} - $2,8 \times 10^{11}$ células/ml. Esto se traduce en una disminución del 44-72% en el número de células cuando se usa el extracto de alubia.

Se añadió el fermento 1844 no procesado a los NHEK sembrados en placas de 100 mm con 4 dosis: 10^8 , 10^9 , 5×10^9 o 10^{10} bacterias. Los extractos de *Lactobacillus* 1844 sometidos a intercambio de calor fueron añadidos a los NHEK con 3 dosis: 10^9 , 5×10^9 o 10^{10} bacterias. El filtrado 1844 fue añadido con 4 dosis: 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} o 5×10^{10} bacterias. El 1844 retenido fue añadido a los NHEK en placas de 100 mm con 4 dosis: 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} o 5×10^{10} bacterias. Los componentes bacterianos menores de $0,22 \mu$ fueron recuperados en el **filtrado** después de la filtración por flujo transversal. Los restos celulares mayores de $0,22 \mu$ fueron recuperados como **retenido** después de la filtración por flujo transversal (cuatro dosis). Algunas de las fracciones bacterianas eran ácidas (pH entre 3 y 4), haciendo que el medio de los queratinocitos se volviese amarillo tras la adición. El pH fue inmediatamente neutralizado con hasta 200 μ l de 800 mM Hepes. Se añadió Hepes a todos los cultivos. Se incluyeron, para su comparación, los extractos bacterianos 1839, que estuvieron almacenados a 4°C durante 3 meses. Se iniciaron los tratamientos antes de que se dispusiera de recuentos bacterianos, y se supuso que ambos fermentos alcanzaron la misma concentración bacteriana. Por lo tanto, para 1844 se incluyeron los mismos volúmenes de tratamiento que los usados para 1839 (fermento no procesado: 1, 10, 50 y 100 μ l; intercambio de calor: 10, 50 y 100 μ l; filtrado: 3,6, 18, 36 y 180 μ l; retenido: 10, 50, 100 y 500 μ l). Todos los extractos bacterianos fueron sometidos a ebullición durante 20 minutos.

Se recuperó el ARN total con el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se determinó la concentración del ARNm con el *kit* RiboGreen (Molecular Probes), así como mediante electroforesis en gel de las muestras seleccionadas. Se realizaron varios ensayos con RiboGreen para evaluar cada muestra por duplicado y triplicado. Los resultados se promediaron (véase la **Tabla 2**). La cantidad de degradación del ARN fue evaluada sobre 2 geles (Figuras 1 y 2). El ARN fue objeto de transcripción inversa en ADNc usando el *kit* RETROscript de Ambion. El estándar interno fue el ARN ribosómico 18S. Se amplificó el ADNc usando el ciclador de luz junto con el *kit* FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche. Los cebadores específicos para el ARN ribosómico 18S y la hBD-2 han sido descritos previamente. Para el ARN ribosómico 18S, se amplificaron 100 ng de plantilla para 40 ciclos. Para la hBD-2, se amplificaron 300 ng de plantilla para 40 ciclos. El número de productos de la PCR que tenían diferentes pesos moleculares generados por la reacción de PCR fue determinado indirectamente con un programa de curva de fusión de Roche. Para cada conjunto de cebadores se observó un único pico del punto de fusión.

Resultados y conclusión: Los niveles de ARN total fueron medidos con una sonda fluorescente específica para el ARN (RiboGreen ELISA) (**Tabla 1**). Se determinó la cuantificación visual de la banda de ARN ribosómico 28S para un grupo selecto de muestras (**Figuras 1 y 2**). No se observó ninguna degradación del ARN. La intensidad de la banda de ARN ribosómico 28S (banda superior) varió ligeramente (783000 ± 25000 (**Figura 1**) y 882000 ± 46000 (**Figura 2**)). La intensidad de las bandas para ambos geles se restringió a un área de 8000 píxeles. Se logró amplificar el ARNm ribosómico 18S (banda inferior) como control interno. No se incluyó ningún control externo para medir la eficiencia de la transcripción inversa. En la **Figura 3** hay presente un diagrama de flujo que representa las diferentes fracciones.

La mayoría de los extractos de *Lactobacillus* usados para tratar los NHEK generaban niveles de ARNm ribosómico 18S dentro del intervalo de las muestras no tratadas (**Figura 4**). En la mayoría de los casos, se observó un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ARNm ribosómico 18S, sugiriendo que el extracto indujo la proliferación. El mayor aumento en los niveles de ARNm ribosómico 18S se observó con la muestra 1839 sometida a intercambio de calor, $10E10$ bacterias. Una excepción incluyó los fermentos 1839, que mostraron una disminución dependiente de la dosis en los niveles de ARNm ribosómico 18S. Una disminución en los niveles de 18S es habitualmente un signo de fatiga celular de alguna naturaleza y parece relacionada con el extracto, dado que era dependiente de la dosis. La disminución en los niveles de ARNm 18S podría ser explicada por una disminución en la proliferación de los NHEK o en una mayor muerte de los NHEK. En general, los niveles de ARNm ribosómico 18S permanecieron dentro de la desviación típica del control no tratado, pero parecieron aumentar ligeramente de forma dependiente de la dosis.

Todos los extractos de *Lactobacillus* 1844 indujeron un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ARNm hBD-2 en los NHEK. El fermento no procesado, las muestras sometidas a intercambio de calor, el filtrado o el retenido indujeron niveles de ARNm hBD-2 cuando se usó una dosis equivalente a entre 5×10^9 y 10^{10} bacterias. El retenido 1844 y el filtrado 1844 requirieron una dosis ligeramente mayor de bacterias en comparación con el fermento sometido a intercambio de calor o al no procesado para inducir ARNm hBD-2 (**Figura 5**).

En conclusión, todos los extractos de *Lactobacillus* del experimento 1839 o del experimento 1844 tuvieron actividad. Incluso los fermentos 1839, que tenían niveles bajos de ARNm ribosómico 18S, consiguieron producir niveles de ARNm hBD-2, aunque la dosis más alta disminuyó significativamente. Todas las fracciones 1839 retuvieron su actividad a pesar de estar en almacenamiento durante 3 meses a 4°C. Los niveles de ARNm hBD-2 para las fracciones 1839 fueron comparables a los datos anteriores en la **MIC1839** (media de 35×10^5 copias en contraposición con una media de 55×10^5 copias). La diferencia puede explicarse por el aumento en los niveles de ARNm hBD-2 en la muestra no tratada (20×10^5 en contraposición con 45×10^5 copias). Así, fueron muy similares (para una comparación, véase la **Figura 6**). Se recuperaron menos *Lactobacilli* del fermento 1844 en comparación

con el fermento 1839: aproximadamente una disminución del 44-72%. No pareció que el extracto de alubia redujera significativamente la inducción de ARNm hBD-2 a pesar de este aumento en el recuento bacteriano. Se supuso que el retenido 1844 se concentró de la misma manera, como se había hecho anteriormente para el fermento 1839; por lo tanto, se usó una concentración de 7 veces. El ensayo parece ser reproducible, dado que muestras duplicadas de tratamiento procesadas en paralelo dieron valores que estaban dentro de la desviación típica para dos conjuntos de tratamientos (fermento 1844 e intercambio de calor 1844) y no para un tercer conjunto de tratamientos (retenido 1844). El aumento total en los niveles de ARNm hBD-2 fue pequeño, pero significativo. Este conjunto de datos demuestra que la filtración transversal no aumenta la actividad de la muestra, dado que el filtrado y el retenido tenían niveles similares de inducción de ARNm y ligeramente inferiores a los del fermento. Por lo tanto, hay presentes al menos dos inductores diferentes de ARNm hBD-2. Los inductores probablemente sean los ácidos lipoteicóicos en el filtrado y los peptidoglicanos en el retenido. Todos los extractos 1844 causaron un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ARNm hBD-2.

Tabla 2: Cuantificación del ARN total derivado de NHEK tratados durante 48 horas con fermento de *Lactobacillus* que contenía ternera (1839) y alubia (1844)

| Muestras (MIC 1844) | RiboGreen µg/µl | Media | Nº de µl equivalentes a 4 µg de ARN |
|--|-----------------------|-------|--|
| Nº 1 NHEK sin tratar A 48 horas | 2,96/3,03 | 3,00 | 1,33 |
| Nº 2 NHEK sin tratar B 48 horas | 2,62/2,65 | 2,64 | 1,52 |
| Nº 3 NHEK 1844 fermento 10E8 48 horas | 2,62/2,72/2,65 | 2,66 | 1,50 |
| Nº 4 NHEK 1844 fermento 10E9 48 horas | 2,71/2,75/2,76 | 2,74 | 1,46 |
| Nº 5 NHEK 1844 fermento 5×10E9 50 µl 48 horas | 2,73/2,63/2,59 | 2,65 | 1,51 |
| Nº 6 NHEK 1844 fermento 100 µl 10E10 48 horas | 2,34/2,72 | 2,53 | 1,58 |
| Nº 7 NHEK 1844 retenido 10E9 10 µl 48 horas | 2,86/2,80/2,92 | 2,86 | 1,40 |
| Nº 8 NHEK 1844 retenido 5×10E9 48 horas | 2,62 | 2,62 | 1,53 |
| Nº 9 NHEK 1844 retenido 10E10 48 horas | 2,82/3,05/3,01 | 2,96 | 1,35 |
| Nº 10 NHEK 1844 retenido 5×10E10 48 horas | 2,52 | 2,52 | 1,59 |
| Nº 11 NHEK 1844 filtrado 10E10 48 horas | 2,31/2,30 | 2,31 | 1,73 |
| Nº 12 NHEK 1844 filtrado 5×10E10 180 µl 48 horas | 2,26/2,10 | 2,18 | 1,83 |
| Nº 13 NHEK 1844 HXCH 10E10 100 µl 48 horas | 2,59/2,60 | 2,60 | 1,54 |
| Nº 14 NHEK 1844 HXCH 5×10E9 50 µl 48 horas | 2,69/2,55 | 2,62 | 1,53 |
| Nº 15 NHEK 1844 HXCH 10E9 10 µl 48 horas | 2,61/2,71 | 2,66 | 1,50 |
| Nº 16 NHEK 1839 fermento 10E8 48 horas | 2,83/3,26 | 3,05 | 1,31 |
| Nº 17 NHEK 1839 fermento 10E9 48 horas | 2,88/3,01 | 2,95 | 1,36 |
| Nº 18 NHEK 1839 fermento 10E10 48 horas | 2,88/2,88 | 2,88 | 1,39 |
| Nº 19 NHEK 1839 retenido 10E9 48 horas | 2,96/2,96 | 2,96 | 1,35 |
| Nº 20 NHEK 1839 retenido 10E10 48 horas | 3,26/3,26 | 3,26 | 1,23 |
| Nº 21 NHEK 1839 retenido 5×10E10 48 horas | 2,32 | 2,32 | 1,72 |
| Nº 22 NHEK 1839 filtrado 10E9 48 horas | 2,61/2,76 | 2,69 | 1,49 |
| Nº 23 NHEK 1839 filtrado 5×10E9 48 horas | 2,27/2,59 | 2,43 | 1,65 |
| Nº 24 NHEK 1839 filtrado 10E10 48 horas | 2,46/2,65 | 2,56 | 1,56 |
| Nº 25 NHEK 1839 filtrado 5×10E10 48 horas | 2,12/2,10 | 2,11 | 1,90 |
| Nº 26 NHEK 1839 HXCH 10E8 48 horas | 2,76/3,05 | 2,91 | 1,37 |
| Nº 27 NHEK 1839 HXCH 10E9 48 horas | 3,06/3,06 | 3,06 | 1,31 |
| Nº 28 NHEK 1839 HXCH 10E10 48 horas | 2,76/2,82 | 2,79 | 1,43 |

15 Ejemplo 3

Un estudio clínico está diseñado para estudiar la microflora de la piel después de un tratamiento con extracto de *Lactobacillus* que se afirma que estimula la liberación de defensinas. Los materiales sometidos a ensayo son un vehículo de gel de carbopol sin *Lactobacillus*, y un vehículo de gel de carbopol que contenía un extracto de *Lactobacillus* al 20% (cada uno con un pH de 3,90).

20 Sujetos

Participan en el estudio un total de nueve sujetos, hombres y mujeres, con edades comprendidas entre los 25 y los 55 años. Todos los sujetos tienen salud normal, sin evidencia alguna de enfermedad aguda ni crónica ni/o de problemas dérmicos u oftálmicos. Los sujetos que presentan en la actualidad quemaduras solares, sarpullido, rasguños, marcas de quemaduras, etc., que podrían interferir en la evaluación de los resultados del ensayo, son excluidos del estudio. Son excluidas las mujeres embarazadas o lactantes. El sitio del ensayo carece de verrugas, lunares, manchas, quemaduras solares, bronceado, cicatrices y lesiones dérmicas activas percibidas con la observación.

ProcedimientoMicroflora cutánea

- Los panelistas se presentan en el laboratorio y se lavan la cara con un jabón líquido suave. El lado derecho de la cara es tratado con el vehículo y el lado izquierdo con la formulación que contiene extracto de lactobacilo. El investigador aplica e incorpora los materiales usando guantes estériles. Se permite que aparezca en la piel la microflora normal en las tres horas siguientes. Durante este periodo se indica a los panelistas que mantengan el cabello alejado de la cara y que eviten tocarse la cara, lavarla o aplicar nada en la misma. Al final de este intervalo de tres horas, se obtienen restos de lavado con suero fisiológico de la zona de la mejilla de la cara para su análisis microbiológico.
- Se obtienen restos de lavado con suero fisiológico (suero fisiológico con tampón fosfato Dulbeccos) de la zona de la frente usando un cilindro estéril de vidrio y una espátula estéril de caucho. Se echa un ml del suero fisiológico en la taza y luego se restriega la piel con la espátula de caucho (10 pasadas) y se lava, y luego se aspira el suero fisiológico y se recoge en 9 ml de PBS. Las muestras son analizadas para obtener un recuento bacteriano aeróbico y anaeróbico.

15 Resultados

- El gráfico de la Figura 7 presenta la proporción, para cada panelista, entre sitios tratados con *Lactobacillus* en contraposición con el vehículo. Un valor de 1 indica que no hay ninguna diferencia, los valores por debajo de 1 indican una reducción en el desarrollo bacteriano en el sitio tratado con lactobacilo. Según se observa en el gráfico, el extracto de *Lactobacillus* al 20% fue eficaz en la reducción del desarrollo bacteriano en la piel. Seis panelistas de los nueve presentaron una reducción en el desarrollo microbiano 3 horas después del tratamiento. Un panelista no presentó ningún cambio y dos presentaron un mayor desarrollo con el extracto de lactobacilo al 20%.

Ejemplo 4

- Se someten a ensayo varias fracciones diferentes de extracto de *Lactobacillus plantarum* para encontrar su capacidad de inhibir el desarrollo bacteriano y fúngico. Las fracciones son: 1, fracción sobrenadante; 2, fracción celular concentrada; 3, caldo integral concentrado; 4, no concentrado; 5, no concentrado en medio de caldo vegetal; y 6, control de agua destilada.

Procedimiento:

- Los varios organismos elegidos para este experimento son escogidos por su diversidad y relevancia en el ensayo de conservantes cosméticos. Los organismos incluyen *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas cepacia* (PC), *Staphylococcus aureus* (SA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Candida albicans* (CA), *Candida parapsilosis* (CP) y *Aspergillus niger* (AN).

- Los cultivos bacterianos individuales (EC, KP, PA, PC, SA y SE) son sembrados por estrías sobre placas de agar de tripticasa de soja (TSA) y los cultivos fúngicos (CA, CP y AN) son sembrados por estrías sobre agar de patata y dextrosa (PDA). Se usa un perforacorchos (n° 5) para formar un pocillo en medio de cada placa, y se añaden partes alícuotas de 200 µl de cada muestra a los pocillos individuales para cada organismo individual. A continuación, las placas son incubadas a 37°C durante 48 horas. Después de este tiempo, las placas son examinadas y se observan las zonas de inhibición (si las hay). Las zonas son medidas en milímetros desde el borde cada pocillo.

Resultados:

- Zonas MIC del fermento *Lactobacillus*: (Véase más arriba la descripción de los organismos y las muestras). Se considera actividad significativa una zona de inhibición > 2 mm.

| | EC | KP | PA | PC | SA | SE | CA | CP | AN |
|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| N° 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| N° 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 7 | 1 | 0 | 1 |
| N° 3 | 5 | 5 | 6 | 5 | 7 | 7 | 3 | 3 | 0 |
| N° 4 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| N° 5 | 3 | 3 | 2 | 4 | 6 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| N° 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Conclusión:

- Se evalúan cinco fracciones de *Lactobacillus* en busca de su actividad antimicrobiana contra varios microorganismos usados comúnmente para el ensayo de eficacia conservante de productos cosméticos. Todas presentaron un nivel significativo de actividad contra bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Se observó poca o nula actividad contra la levadura y el moho.

Ejemplo 5

Se somete a ensayo una loción antiacné que tiene la fórmula siguiente para determinar su capacidad de reducir las lesiones de acné inflamadas y no inflamadas.

| Material | Peso % |
|--|--------|
| Agua destilada | QS |
| EDTA sódico | 0,100 |
| Quaternium 22 | 0,100 |
| Goma de esclerocio | 0,500 |
| Ceteareth 20 | 2,500 |
| Butilenglicol | 5,000 |
| Polimetilmetacrilato | 1,000 |
| Zeolita | 0,500 |
| Ciclopentasiloxano | 10,500 |
| Dimeticona (100cts) | 2,000 |
| Alcohol miristílico | 0,750 |
| Hialuronato sódico | 2,000 |
| Extracto de alga (Alguard) | 0,900 |
| Bisabolol | 0,050 |
| Acetato de tocoferol | 0,100 |
| Conservante | 1,000 |
| Colorante | 0,0042 |
| Copolímero de acrilamida/taurato de acrilodimetilo de sodio/isohehexadecano/polisorbato 80 | 2,000 |
| Colorante | 0,0080 |
| Solución de <i>Lactobacillus</i> | 10,000 |

5 Después de un ensayo de seis semanas, se demuestra que la composición reduce significativamente ($p < 0,0001$) tanto las lesiones inflamadas como las lesiones no inflamadas. En la Figura 9 se muestran gráficamente los resultados.

Ejemplo 6

10 Se realiza un estudio clínico para estudiar la sensibilidad de la piel después de un tratamiento de 2 meses con materiales que estimulan la liberación de defensinas, concretamente extracto de *Lactobacillus* y Alguard. El estudio se realiza con tres productos de ensayo, cada uno en una base idéntica; los materiales sometidos a ensayo son: (1) un fermento de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*) al 1% (derivados de lactobacilo fragmentado con un tamaño inferior a $0,22 \mu$); (2) Triclosán (un antibacteriano) al 0,1% (control); y (3) Alguard (un polisacárido), que es un bioexudado de algas rojas (*Porphyridium sp*; Rhodophyta) al 1%. Contiene un 1% de polisacárido y se afirma que presenta propiedades antiirritantes.

15 Sujetos

Participan en el estudio un total de veintinueve mujeres con edades comprendidas entre 25 y 55 años. El panel se divide en tres grupos de 9-10 cada uno. Todos los sujetos tenían salud normal, sin evidencia alguna de enfermedad aguda ni crónica ni/o de problemas dérmicos u oftálmicos.

20 Los sujetos que presentaban en ese momento quemaduras solares, sarpullido, rasguños, marcas de quemaduras, etc., que podrían interferir en la evaluación de los resultados del ensayo, fueron excluidos del estudio. Fueron excluidas las mujeres embarazadas o lactantes. El sitio del ensayo carecía de verrugas, lunares, manchas, quemaduras solares, bronceado, cicatrices y lesiones dérmicas activas percibidas con la observación.

Procedimiento**Tratamientos**

25 El panel se divide en tres grupos de 9-10, correspondiendo cada uno a los materiales de ensayo. Se proporciona a las panelistas una crema para que la usen dos veces al día durante dos meses en todo el rostro y el antebrazo izquierdo. El brazo derecho es el control no tratado. Se les indica que no usen ningún otro hidratante ni productos de tratamiento; sin embargo, podían seguir usando las cremas limpiadoras y el maquillaje que usaban normalmente, con la condición de que no cambiaran de productos. En el día del estudio se indica a las panelistas que se presenten
30 en el laboratorio con la cara y los antebrazos limpios, sin ninguna crema, loción, maquillaje, etc. Se obtienen mediciones del escozor del ácido láctico en el panel en la referencia, 1 mes y 2 meses. Se aplica ácido láctico al diez por ciento en un lado de la cara y suero fisiológico en el otro lado (Frosch y Kligman, J Soc Cosmet Chem, 28:197-209, 1977). Se documenta la intensidad del escozor, según informan de ella las panelistas, después de 2,5 minutos y 5 minutos. La intensidad acumulada del escozor es la suma de la intensidad del escozor en el sitio tratado con ácido láctico menos la suma de la intensidad del escozor en el sitio tratado con suero fisiológico. Después del
35

tratamiento de 1 y 2 meses, las panelistas vuelven a ser objeto de ensayo con ácido láctico. *En el día del ensayo las panelistas no se aplican el producto.* Se calculó la diferencia entre la intensidad del escozor de la referencia con respecto al tratamiento de 4 semanas.

5 La Figura 10 presenta la puntuación del escozor acumulado del panel. Está claro por el gráfico que el extracto de *Lactobacillus* es significativamente efectivo en la reducción del escozor inducido por el ácido láctico. Después de un mes y de dos meses de uso, hay una reducción en el escozor del 27% ($p=0,035$) y del 39% ($p=0,009$), respectivamente. El Alguard presenta una reducción en el escozor del 8% ($p=0,53$) y del 27% ($0,058$) después de un uso de uno y dos meses, respectivamente. El Triclosán parece estar irritando la piel, dado que la respuesta del escozor aumentó después de usar este material.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo seleccionado del grupo consistente en a) un extracto hervido pero, por lo demás, no tratado; b) un extracto tratado por intercambio térmico; c) un extracto tratado por intercambio de calor sometido, además, a filtrado de flujo transversal con un filtro de 0,22 μ ; d) un retenido que contiene restos celulares insolubles en agua; y e) uno o una combinación de estos extractos o estas fracciones, para su uso para la reducción o la prevención del desarrollo de poblaciones microbianas en la piel mediante la estimulación de las betadefensinas.
2. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo según la reivindicación 1 en el que el *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum*.
- 10 3. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo según la reivindicación 1 para mantener un nivel saludable de la flora cutánea en base cotidiana.
4. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo según la reivindicación 1 en combinación con un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.
- 15 5. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo según la reivindicación 4, en el que el extracto de *Lactobacillus* o la fracción activa del mismo es empleado en una concentración del 0,001 al 50% en peso en base a una concentración del extracto de $1 \cdot 10^9$ a $1 \cdot 10^{10}$ células.
6. Un extracto de *Lactobacillus* o una fracción activa del mismo según la reivindicación 5, en el que el extracto de *Lactobacillus* o la fracción activa del mismo es empleado en una concentración del 1 al 20% en peso.

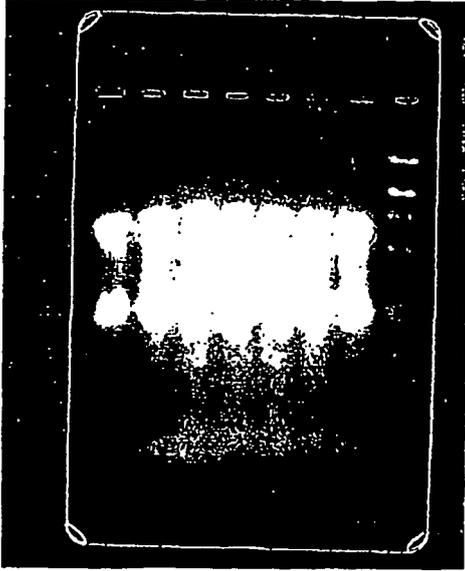


Figura 1

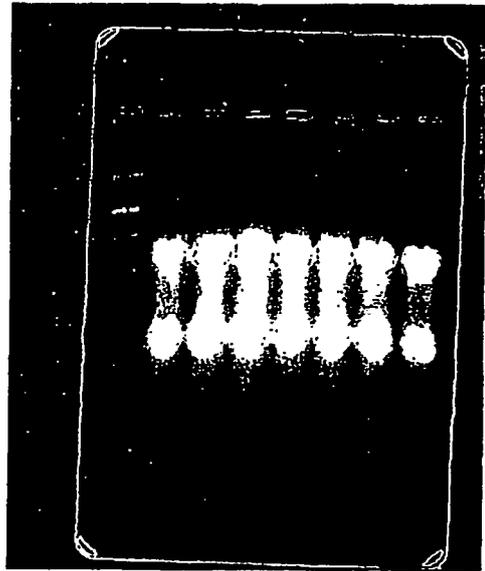


Figura 2

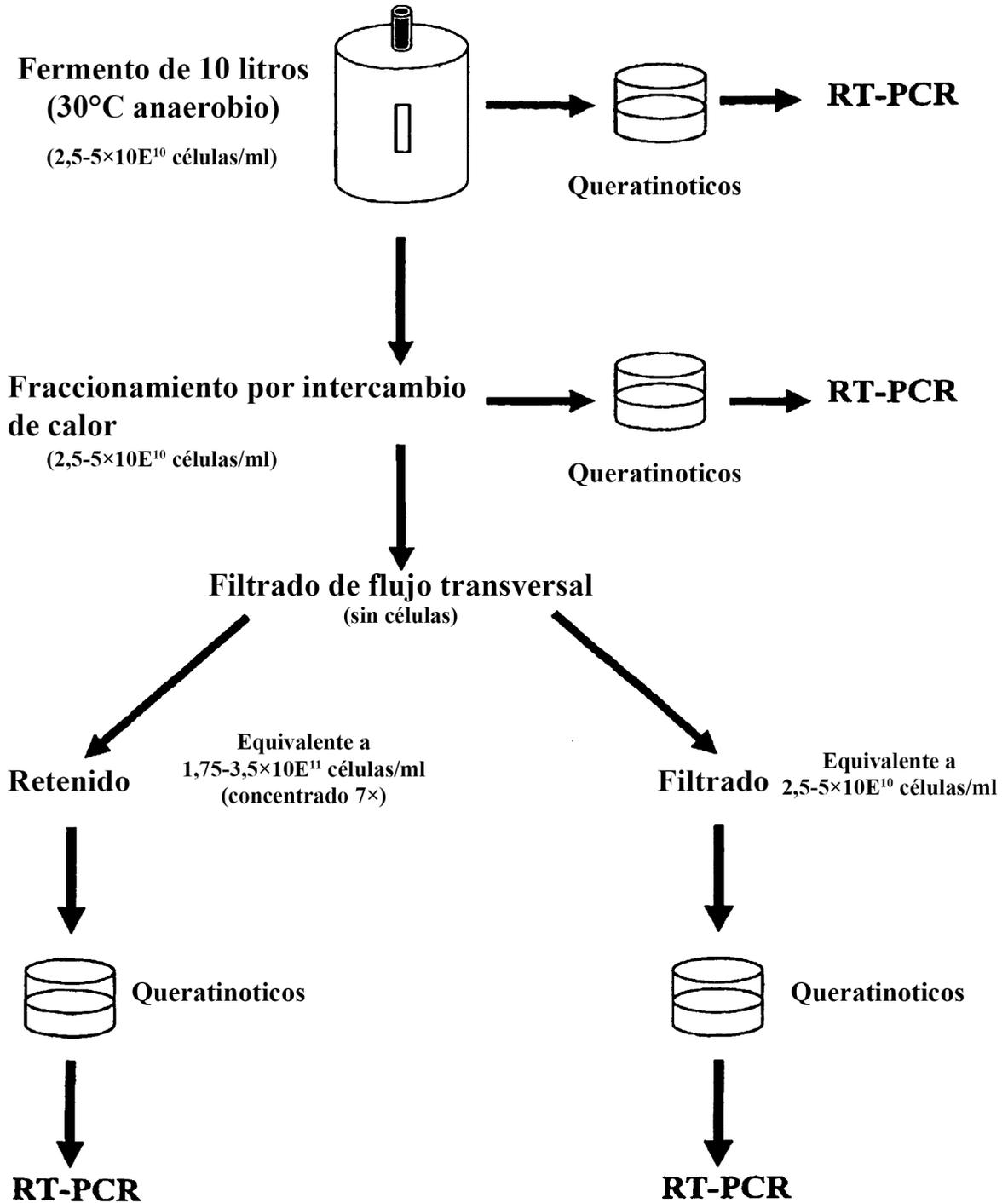


Figura 3

Efecto de extractos de *Lactobacillus* (1839 en contraposición con 1844) sobre los niveles de ARN ribosómico 18 S de queratinocitos después de 48 horas (las muestras incluyen las no procesadas, las sometidas a intercambio de calor, el filtrado y el retenido)

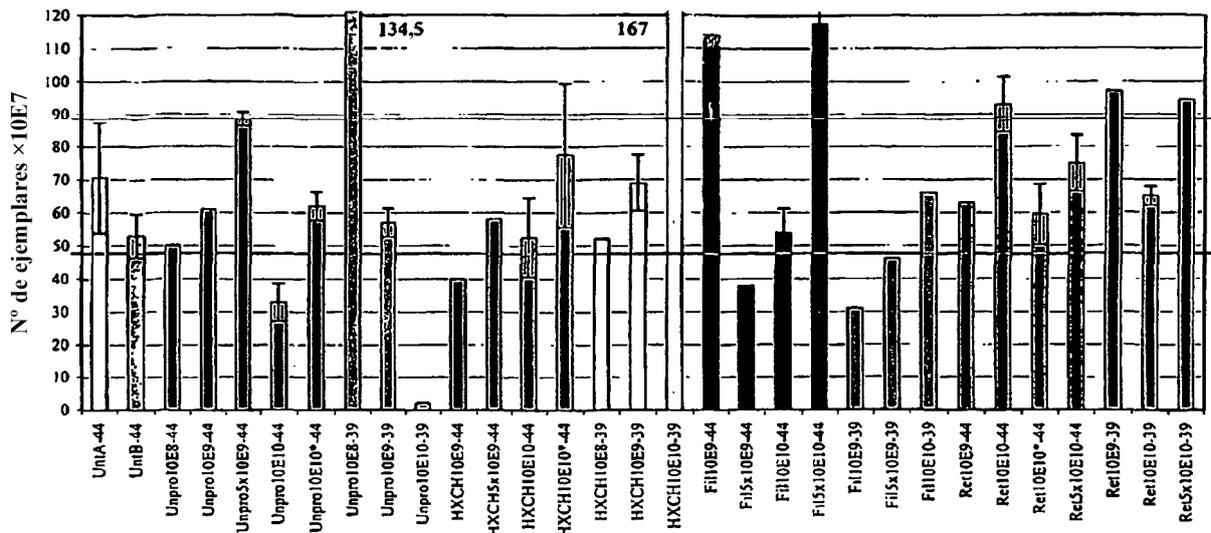


Figura 4

Efecto de extractos de *Lactobacillus* (1839 en contraposición con 1844) sobre los niveles de ARNm hBD-2 después de 48 horas de incubación con NHEK (las muestras incluyen las no procesadas, las sometidas a intercambio de calor, el filtrado y el retenido)

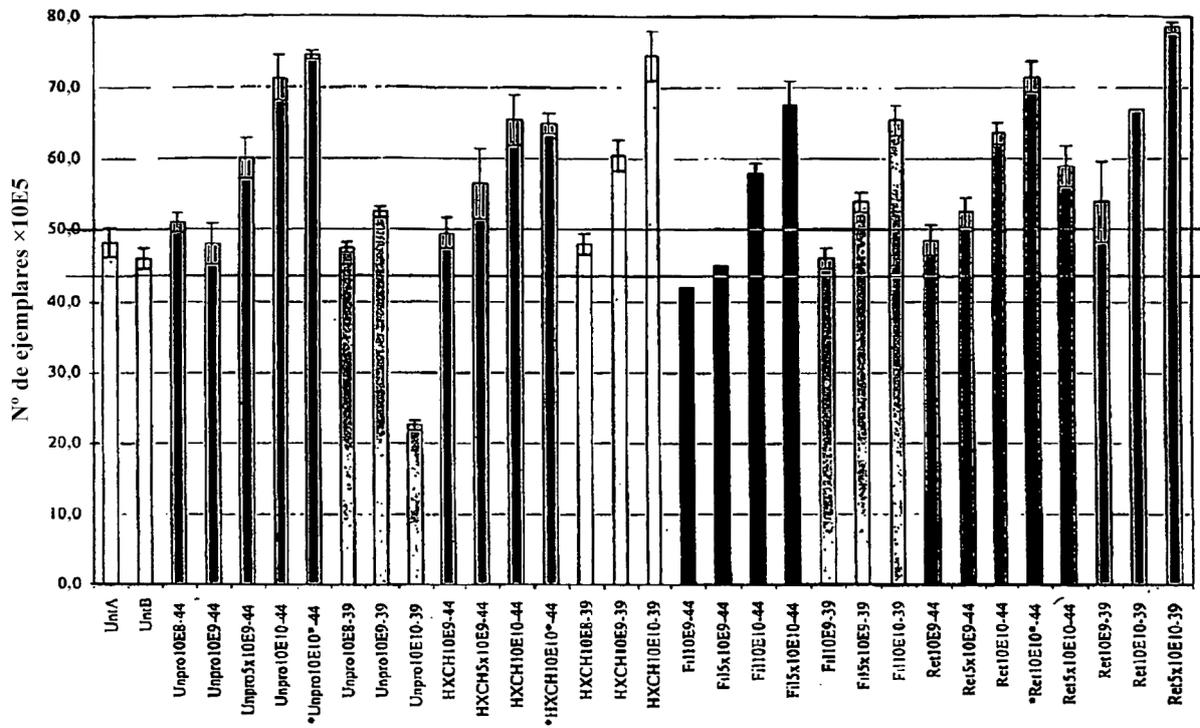


Figura 5

Efecto de extractos de *Lactobacillus* (fermentados 24 horas, sometidos a intercambio de calor, el filtrado y el retenido) sobre los niveles de ARNm hBD-2 después de 48 horas de incubación con NHEK

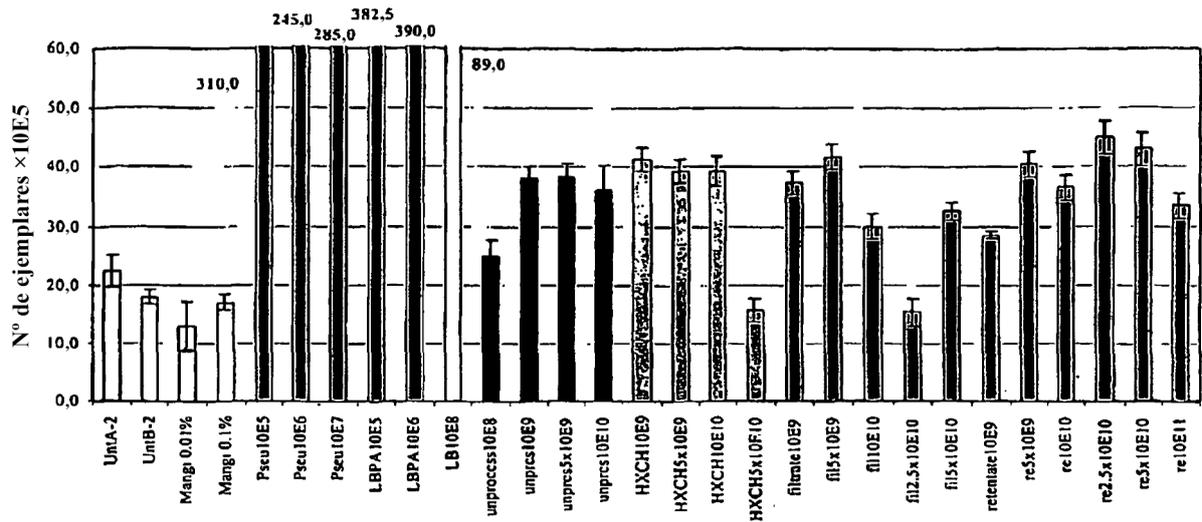


Figura 6

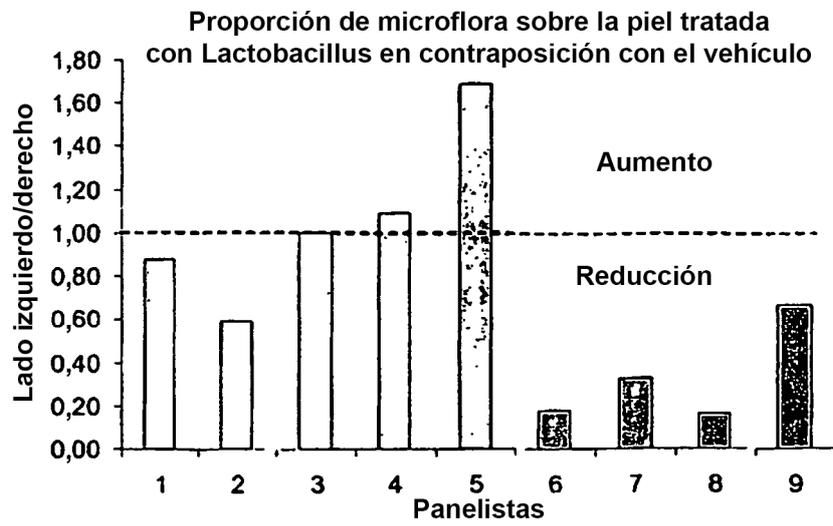


Figura 7

Número de panelistas que mostraron reducción en los microbios en comparación con el control Experimento 1

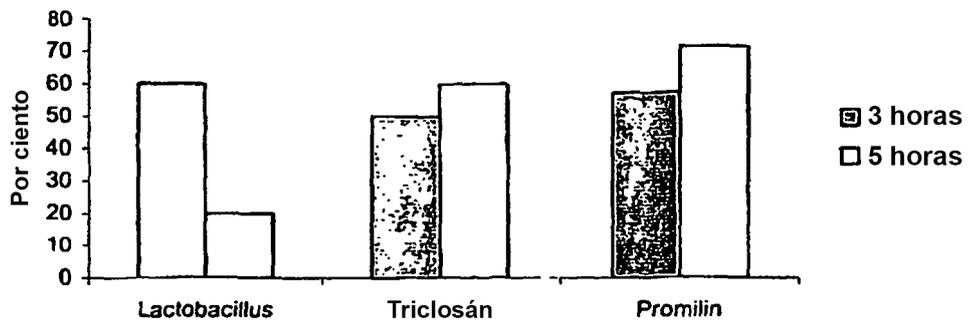


Figura 8a

Número de panelistas que mostraron reducción en los microbios en comparación con el control Experimento 2

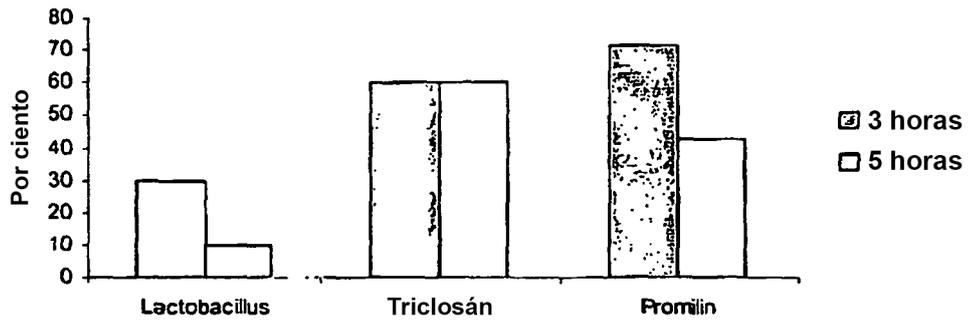


Figura 8b

Efecto de la formulación de *Lactobacillus* al 10% en pápulas y pústulas

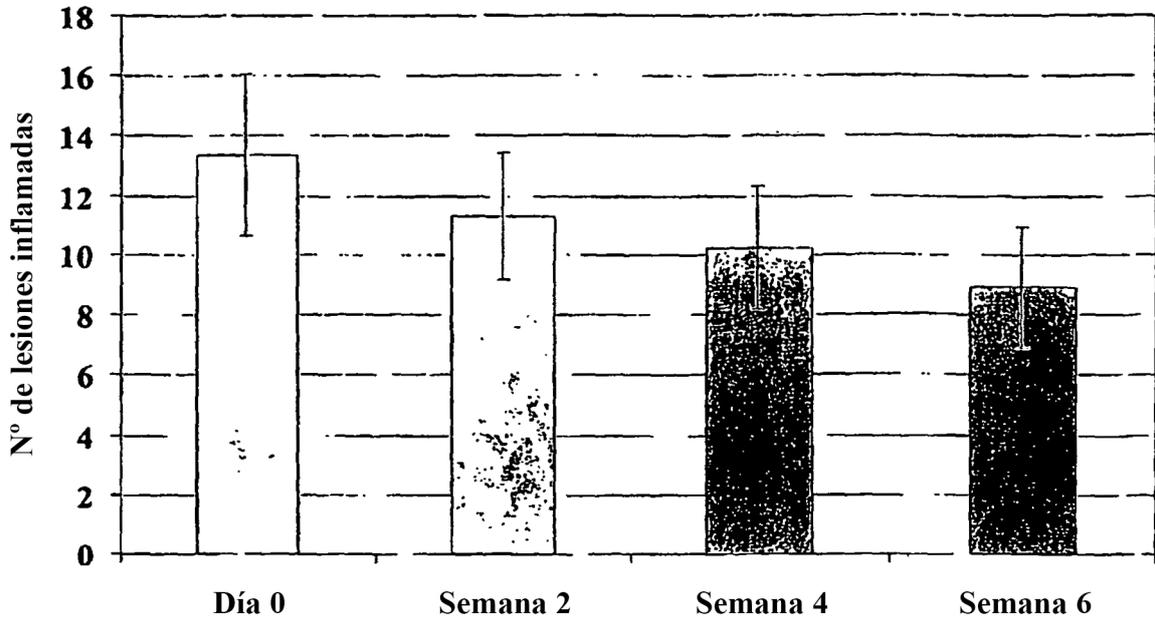


Figura 9a

Efecto de la formulación de *Lactobacillus* al 10% en comedones abiertos y cerrados

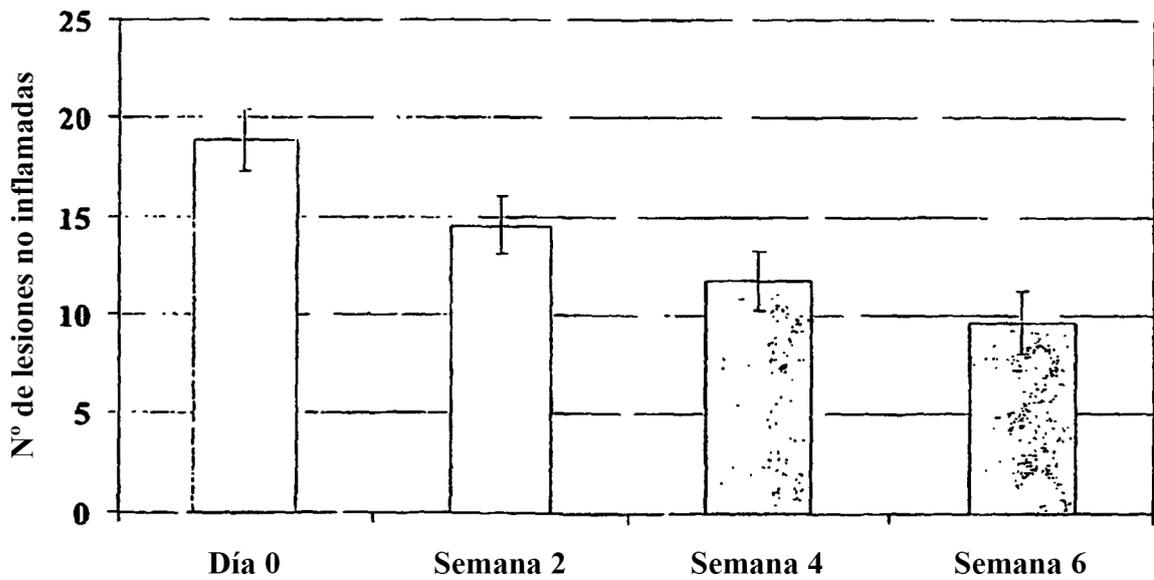
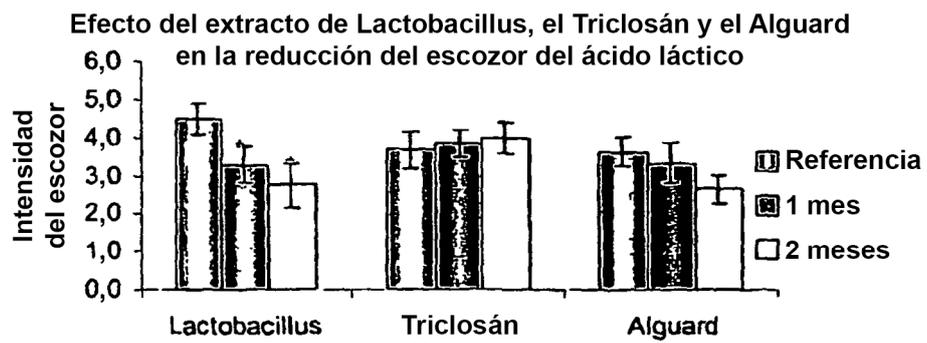


Figura 9b



* $p < 0,05$

Figura 10