

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 351**

51 Int. Cl.:

C12N 1/38	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)	
A61K 35/08	(2015.01)	
A61K 8/99	(2006.01)	
A61K 8/96	(2006.01)	
A61Q 1/00	(2006.01)	
A61Q 5/00	(2006.01)	
A61Q 7/00	(2006.01)	
A61Q 9/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2008 E 08750160 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2144995**

54 Título: **Preparación de principios activos cosméticos por cultivo de Vitreoscilla en agua termal y composiciones que los comprenden**

30 Prioridad:

10.05.2007 FR 0754957
25.06.2007 US 945969 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2015

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)
RIVER PLAZA - DIPI 25-29 QUAI AULAGNIER
92665 ASNIERES-SUR-SEINE, FR

72 Inventor/es:

MARTIN, RICHARD y
HILAIRE, PASCAL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 543 351 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

Preparación de principios activos cosméticos por cultivo de *Vitreoscilla* en agua termal y composiciones que los comprenden.

5 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para cultivar microorganismos, de uso en particular en el campo de la cosmética o farmacéutico, que confieren propiedades mejoradas a los mismos. También se refiere al uso de bacterias que se pueden obtener por estos procedimientos, o sus extractos, en la preparación de composiciones en particular con un uso cosmético o dermatológico.

10 La invención se refiere en particular al cultivo de bacterias filamentosas no fotosintéticas y no fructificantes como se define de acuerdo con la clasificación del Manual of Systematic Bacteriology de Bergey (vol. 3, secciones 22 y 23, 9ª edición, 1.989), entre las que se pueden mencionar las bacterias que pertenecen al orden de las Beggiatoales y más en particular las bacterias que pertenecen a los géneros Beggiatoa, *Vitreoscilla*, *Flexithrix* o *Leucothrix*.

El cultivo de dichas bacterias de la familia de las Beggiatoaceae se ha descrito en la solicitud de patente francesa FR 2 283 223, por multiplicación en un fermentador en un medio débilmente agitado.

15 La solicitud de patente internacional WO 94/02158 explica la preparación de composiciones inmunomoduladoras de envolturas de bacterias del género Beggiatoa o *Vitreoscilla*. Las bacterias se cultivan en un medio preparado con agua destilada y un monosacárido, en particular glucosa, como fuente de carbono.

Además, las bacterias filamentosas así obtenidas, o las fracciones, presentan propiedades ventajosas que se han descrito, por ejemplo, para combatir los signos del envejecimiento en la patente europea EP 681 831 o para tratar piel sensible en la patente europea EP 761 204.

20 Aún existe la necesidad de encontrar procedimientos mejorados para producir tales microorganismos.

Se ha encontrado, en el contexto de la presente invención, que la sustitución, en todo o en parte, del agua destilada presente convencionalmente en el medio para cultivar bacterias filamentosas por agua mineral no sulfurosa y/o agua termal no sulfurosa hace posible obtener una masa bacteriana que presenta propiedades mejoradas.

25 Por ello, un objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un principio activo cosmético o dermatológico, que comprende el cultivo de al menos una bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en un medio que comprende al menos un agua mineral y/o termal que sea no sulfurosa.

Las aguas sulfurosas generalmente contienen bacterias que tienen metabolismo autótrofo que desempeña una función en el ciclo del azufre. Las aguas no sulfurosas de acuerdo con la invención están desprovistas sustancialmente de dichas bacterias reductoras de sulfitos.

30 Como se indicó anteriormente, las bacterias filamentosas no fotosintéticas comprenden en particular las bacterias que pertenecen al orden de las Beggiatoales y más en particular las bacterias que pertenecen a los géneros Beggiatoa, *Vitreoscilla*, *Flexithrix* o *Leucothrix*.

El procedimiento según la invención es adecuado en particular para el cultivo de bacterias que pertenecen al género *Vitreoscilla*, en particular para bacterias de la especie *Vitreoscilla filiformis*.

35 Las bacterias que acaban de definirse, varias de las cuales ya se han descrito, presentan en general un hábitat acuático y se pueden encontrar en particular en aguas del mar o en aguas térmicas. Se debe mencionar entre las bacterias que se pueden usar, por ejemplo:

Vitreoscilla filiformis (ATCC 15551)

Vitreoscilla beggiatoïdes (ATCC 43181)

40 *Beggiatoa alba* (ATCC 33555)

Flexithrix dorotheae (ATCC 23163)

Leucothrix mucor (ATCC 25107)

Sphaerotilus natans (ATCC 13338)

45 Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención se aplica al cultivo de la bacteria que corresponde a la cepa depositada en la ATCC con el N° 15.551.

El término "agua termal" se entiende que significa un agua caliente o fría que se usa por sus poderes terapéuticos o para baño. La presente invención puede usar un agua termal o un agua mineral. En general, es adecuada un agua mineral para consumo, que no siempre es el caso con un agua termal. Cada una de estas aguas comprende, entre otros, minerales disueltos y elementos traza. Se sabe que estas aguas se emplean para fines de tratamiento

específicos dependiendo de los elementos traza particulares y minerales presentes en la misma.

Preferiblemente, en el procedimiento según la invención, se hace uso de un agua termal y/o mineral que presenta un contenido mineral total mayor que o igual a 400 mg/l.

5 En la invención, el término "contenido en mineral total" se entiende que significa la suma de las concentraciones de aniones y cationes presentes en el agua termal o mineral. En las aguas termales o minerales de uso de acuerdo con la invención, el contenido en mineral total está generalmente entre 400 y 900 mg/l.

10 El agua termal y/o mineral usada de acuerdo con la invención puede tener un contenido en minerales total de al menos 700 mg/l, en particular una concentración total de carbonatos y de bicarbonatos de al menos 150 mg/l y más preferiblemente de al menos 360 mg/l y en particular de carbonato y bicarbonato de sodio mayor que 2 mg/l. La concentración de óxido de silicio en el agua usada en la composición según la invención puede ser preferiblemente al menos 6 mg/l y más preferiblemente al menos 9 mg/l.

El agua termal o el agua mineral usada de acuerdo con la invención se puede elegir de agua de Vittel, aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas, agua de La Roche-Posay o agua de La Bourboule.

15 Entre estas aguas, las que presentan una concentración total de carbonatos o bicarbonatos mayor que 360 mg/l son agua de Vittel, agua de La Bourboule, agua de La Roche-Posay o agua de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas.

Entre estas aguas, aquéllas que comprenden al menos 2 mg/l de carbonato o bicarbonato de sodio son agua de La Roche-Posay, agua de Vittel o aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas.

20 Las aguas que comprenden al menos 9 mg/l de óxido de silicio son agua de La Roche-Posay, agua de Vittel o aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas.

Las aguas termales o minerales que son adecuadas en particular para la implantación de la invención tienen una concentración de iones calcio mayor que o igual a 100 mg/l, de hecho incluso 140 mg/l.

25 Según una realización ventajosa, el agua termal o mineral tiene una concentración de iones hidrogenocarbonato mayor que o igual a 300 mg/l. Los hidrogenocarbonatos, también conocidos como bicarbonatos, están presentes en particular a una concentración mayor que o igual a 350 mg/l.

Según una realización ventajosa, las bacterias se cultivan en un medio que comprende al menos un agua termal. La última se puede elegir en particular de agua de Vittel, aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas, agua de La Roche-Posay, o agua de La Bourboule.

30 Las aguas que hacen posible obtener un resultado ventajoso particular de acuerdo con la invención se eligen en particular de agua de La Roche-Posay y agua de Vittel o un agua con una composición similar.

El agua de La Roche-Posay se extrae del manantial del mismo nombre; es un agua que comprende bicarbonato, calcio, silicato y selenio. En general comprende aproximadamente 387 mg/l de iones bicarbonato, aproximadamente 140 mg/l de iones calcio y al menos 40 mg/l de sulfatos.

35 El agua de Vittel es rica en calcio y en sales minerales (841 mg/l) y comprende en particular 202 mg/l de calcio, 402 mg/l de bicarbonatos y 336 mg/l de sulfatos.

El cultivo se puede llevar a cabo en particular en el medio siguiente:

Composición	Concentración
Extracto autolítico de levadura	0,5 a 5 g/l
Peptona	0,5 a 5 g/l
Glucosa anhidra	0,5 a 7 g/l
Microelementos de Heller	0,5 a 5 ml/l
CaCl ₂ •10H ₂ O	0,010 a 0,200 g/l

La composición se completa hasta 1.000 ml con agua destilada y/o agua mineral o termal.

Se tiene que mencionar, entre las peptonas que se pueden usar, por ejemplo, peptona de papaína de soja.

40 Este medio se distingue de los medios usados en general por la ausencia de catalasa y sulfuro. Se han descrito los microelementos de Heller por Heller, Ann. Sci. Nat. Biol. Veg., 14, 1-223 (1.953). Son mezclas de diversos elementos minerales que se recomiendan por Heller no para el cultivo de bacterias sino para la nutrición de los tejidos

vegetales cultivados in vitro.

El cultivo se puede llevar a cabo a la temperatura apropiada adecuada para las especies bacterianas cultivadas. En general, esta temperatura es entre 18 y 40°C, dependiendo de las cepas. El pH del medio de cultivo está preferiblemente entre 5,5 y 8.

5 La composición de los microelementos de Heller, por 1 l de agua, es como sigue:

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,076 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,003 g
KI	0,010 g
10 H ₃ BO ₃	1 g
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0,050 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,030 g

Dichas aguas termales o minerales pueden reemplazar toda o parte de la fase acuosa del medio de cultivo. Se pueden encontrar así como una mezcla en cualquier proporción con el agua, en particular agua destilada o tratada osmóticamente, presente en el medio de cultivo.

Después de mezclar todos los elementos del medio, el medio de cultivo que comprende el agua termal y/o mineral se esteriliza ventajosamente; esta fase se lleva a cabo por métodos conocidos para un experto en la materia, tales como esterilización por filtración o por calor. Con posterioridad se inocula el medio de cultivo con las bacterias.

20 Otro objeto de la invención es así un procedimiento para cultivar microorganismos o para preparar un principio activo cosmético o dermatológico como se definió anteriormente, caracterizado por que el medio de cultivo comprende una mezcla: (i) de agua tratada osmóticamente o destilada y (ii) de agua termal, en una proporción (i)/(ii) de entre 1 y 100, en particular de 1 a 50, especialmente de 1 a 25.

25 Inesperadamente, se ha encontrado, en el contexto de la invención, que la incorporación de agua termal no sulfurosa y/o mineral no sulfurosa en el medio de cultivo en una proporción relativamente pequeña puede conferir, en el microorganismo, propiedades ventajosas distintas de las de un microorganismo cultivado en un medio en que el agua incorporada es exclusivamente agua destilada y/o tratada osmóticamente.

30 Así, en medios adecuados para la implantación de la invención, el agua termal o mineral representa preferiblemente al menos 0,1% de la cantidad de agua introducida para la preparación del medio, en particular de 0,1 a 99,9%. Se obtienen buenos resultados con concentraciones de agua termal de aproximadamente 1% o 2%, con respecto al agua tratada osmóticamente y/o destilada, por ejemplo de 0,5 a 20%, de hecho incluso de 0,5 a 50%, pero estas concentraciones se pueden aumentar sin desventaja.

De manera conocida, el procedimiento comprende al menos una fase en que se recuperan las bacterias al final del cultivo, en particular separándolas del medio de cultivo.

35 Después de cultivar las bacterias, la biomasa se puede aislar por diversos métodos conocidos, por ejemplo por filtración, por coagulación con un alcohol (etanol, isopropanol, isobutanol), por secado en un cilindro con una precapa raspada (almidón, diátomos y similares) o por liofilización. Una concentración preliminar, por ejemplo a 80 °C a presión reducida, mejora esta separación.

Una operación de ruptura de las envolturas se puede llevar a cabo, por ejemplo por la acción de ultrasonidos. Además, los extractos se pueden preparar usando un alcohol, tal como etanol o propanol.

40 Los extractos de lipopolisacárido también se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos; por ejemplo, véase Noris y Ribbons, *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, Academic Press (1.971). El método usado en general es el método "Westphal" conocido (o un método relacionado), que consiste en llevar a cabo la extracción con mezclas de fenol/agua a 65 °C. El extracto se somete con posterioridad a diálisis para retirar el fenol.

45 La invención se refiere en particular a un procedimiento para la preparación de un principio activo cosmético o dermatológico como se definió anteriormente, caracterizado por que comprende una fase durante la cual: (i) se cultiva al menos una bacteria que pertenece al orden de las Beggiatoales en un medio que comprende un monosacárido como fuente de carbono principal y al menos un agua mineral no sulfurosa o térmica no sulfurosa y después (ii), después de fermentación, las bacterias se separan del medio de cultivo para recuperar dicha masa de las bacterias.

50 Las bacterias recuperadas en el momento en que concluye la fase de fermentación se pueden someter en particular

a un tratamiento de estabilización y/o extracción. Es el extracto de bacterias filamentosas lo que se obtiene por lo tanto, que se usará en general en o para la preparación de composiciones cosméticas o dermatológicas. De una manera conocida de por sí, el extracto se puede esterilizar así, en particular por filtración o por esterilización en autoclave.

- 5 El término “extracto de bacterias filamentosas no fotosintéticas” se entiende que significa igualmente bien el sobrenadante del cultivo de dichas bacterias, la biomasa obtenida después de cultivar dichas bacterias o los extractos de la biomasa que se obtienen por tratamiento de esta biomasa.

Para preparar el extracto de acuerdo con la invención, dichas bacterias se pueden cultivar de acuerdo con el procedimiento según la invención y se pueden separar después de la biomasa obtenida, por ejemplo por filtración, centrifugación, coagulación y/o liofilización.

Así, después de cultivo, las bacterias se concentran por centrifugación. La biomasa obtenida se esteriliza en autoclave. Esta biomasa se puede liofilizar para constituir lo que se refiere como el extracto liofilizado. Cualquier método de liofilización conocido para un experto en la materia se puede usar para preparar este extracto.

- 15 La fracción de sobrenadante de esta biomasa también se puede filtrar en un envase estéril para retirar las partículas suspendidas. Esta fracción sobrenadante se puede decantar también en condiciones estériles en un envase estéril. De acuerdo con una realización específica de la invención, la fracción de sobrenadante así obtenida se usa como principio activo cosmético o dermatológico.

20 Inesperadamente, se ha encontrado, en el contexto de la presente invención, que el cultivo de una bacteria en un medio que comprende al menos un agua termal no sulfurosa o mineral no sulfurosa, en particular constituyendo de 1 a 100% del agua presente en el medio de cultivo, confería, en la bacteria obtenida en el momento en que concluyen las diversas fases de fermentación y aislamiento, propiedades específicas distintas de las de la misma bacteria cultivada en un medio no enriquecido con agua termal y/o mineral sino que comprende sólo agua tratada osmóticamente o destilada.

25 Según otro aspecto de la invención, la sustitución de toda o parte del agua del medio de cultivo para cultivar la bacteria por agua mineral o termal hace posible aumentar la velocidad de crecimiento de la bacteria y mejorar así el volumen de producción.

El volumen de producción se puede aumentar en particular al menos 10%, para una velocidad de crecimiento controlada y con condiciones de cultivo idénticas y controladas.

- 30 Por ello, otro objeto de la invención es el uso de al menos un agua termal no sulfurosa o mineral no sulfurosa, como se definió anteriormente, como agente para mejorar la actividad y/o el crecimiento de una bacteria del género Vitreoscilla, en particular Vitreoscilla filiformis.

La invención también se refiere a un procedimiento para mejorar el crecimiento y/o las propiedades de una bacteria del género Beggiatoa o Vitreoscilla que consiste en añadir un agua termal no sulfurosa y/o mineral no sulfurosa al medio de cultivo en al menos una fase del cultivo.

- 35 Como se mencionó anteriormente, las aguas termal o mineral se seleccionan de las aguas de Vittel, aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas y agua de La Roche-Posay.

Otro objeto de la invención es un medio de cultivo adecuado para cultivar bacterias filamentosas no fotosintéticas como se definió anteriormente, comprendiendo el agua presente en dicho medio al menos 1% de agua mineral y/o termal, en particular de 1 a 99,9%, preferiblemente de 1 a 25%.

- 40 Otro objeto de la invención es las bacterias, en particular Vitreoscilla filiformis, que se pueden obtener por el procedimiento de acuerdo con la invención, y también sus extractos y sus usos en composiciones, siendo las bacterias, sus extractos o las composiciones de utilidad en la mejora de la afección de excrecencias cutáneas y/o superficiales.

45 Otro objeto de la invención es así una composición, en particular una composición cosmética o dermatológica, caracterizada por que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos una bacteria del género Vitreoscilla que se puede obtener por el procedimiento descrito anteriormente o un extracto de la última.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención se pueden proporcionar en todas las formas adecuadas para las aplicaciones previstas, en particular por vía oral o por vía tópica, en los campos cosmético y dermatológico.

- 50 El término “por vía tópica” se entiende preferiblemente que significa uso por aplicación tópica a las excrecencias cutáneas o superficiales; el término “piel” también incluye, a menos que se indique de otro modo, el cuero cabelludo o las membranas mucosas.

La composición de acuerdo con la invención se puede aplicar así a cualquier región cutánea del cuerpo, el pelo, las uñas o las membranas mucosas y se puede proporcionar en cualquier forma de formulación adecuada por un

experto en la materia. Se puede proporcionar en particular en forma de una disolución o suspensión acuosa u oleosa, de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o múltiple, de una emulsión de silicona, de una microemulsión o nanoemulsión, de un gel acuoso u oleoso o de un producto anhidro líquido, pastoso o sólido.

Para aplicación tópica a la piel, la composición puede tener la forma en particular de disoluciones acuosas u oleosas o de dispersiones del tipo loción o suero, de emulsiones con una consistencia de líquido o semilíquido del tipo leche, obtenida por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (o/a) o viceversa (a/o) o de suspensiones o emulsiones con una consistencia suave del tipo crema o gel acuoso o anhidro, o bien de microcápsulas o micropartículas o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico. También puede estar presente en la forma de un parche o de un sistema de liberación controlada. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos usuales.

También se pueden usar para el pelo en forma de disoluciones acuosas, alcohólicas o acuosas/alcohólicas o en la forma de cremas, geles, emulsiones o espumas o también en la forma de composiciones en aerosol que comprenden también un propelente presurizado.

Para los ojos, la composición se puede proporcionar en la forma de gotas y, para ingestión, se puede proporcionar en la forma de cápsulas, gránulos, geles, pastas para mascar, jarabes o comprimidos.

Las cantidades de los diversos constituyentes de las composiciones de acuerdo con la invención son las usadas convencionalmente en los campos en consideración.

Estas composiciones constituyen en particular cremas para limpieza, protección, tratamiento o cuidado para la cara, para las manos, para los pies, para los principales pliegues anatómicos o para el cuerpo (por ejemplo, cremas de día, cremas de noche, cremas para retirar el maquillaje, cremas de base o cremas solares), mascarillas para dejar reposar sobre la piel o el pelo, bases líquidas, leches para retirar el maquillaje, leches protectoras o del cuidado corporal, leche solares, lociones, geles o espumas para el cuidado de la piel, tales como lociones de limpieza, lociones solares, lociones para bronceado artificial, composiciones para el baño, composiciones desodorantes que comprenden un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias, composiciones para contrarrestar picaduras o mordeduras de insectos, composiciones para aliviar el dolor o composiciones para tratar de ciertas enfermedades de la piel, tales como eczema, rosácea, soriasis, liquen o prurito grave.

Las composiciones según la invención también pueden consistir en preparaciones sólidas que constituyen jabones o barras de limpieza.

Las composiciones también se pueden envasar en la forma de una composición en aerosol que comprende también un propelente presurizado.

La composición de acuerdo con la invención también puede ser una composición para el cuidado del cabello, y en particular un champú, una loción de fijación del cabello, una loción de tratamiento, una crema o gel para el peinado, una composición colorante (en particular una composición de coloración de oxidación), opcionalmente en la forma champú-tintes, lociones reestructurantes del cabello, una composición de permanente (en particular una composición para la primera etapa de una permanente), una loción o un gel para combatir la pérdida del cabello, un champú antiparasitario y similares.

La composición también puede ser para uso oral, por ejemplo, una pasta de dientes. En este caso, la composición puede comprender adyuvantes y aditivos convencionales para composiciones para uso oral y en particular agentes tensioactivos, agentes espesantes, humectantes, agentes de abrillantado, tales como sílice, diversos ingredientes activos, tales como fluoruros, en particular fluoruro de sodio, y opcionalmente agentes edulcorantes, tales como sacarinato de sodio.

Cuando la composición es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede oscilar de 5% a 80% en peso y preferiblemente de 5% a 50% en peso, con respecto al peso total de la composición. Los aceites, ceras, emulsionantes y coemulsionantes usados en la composición en la forma de emulsión se eligen de los usados convencionalmente en el campo de la cosmética. El emulsionante y coemulsionante están presentes en la composición en una proporción que oscila de 0,3% a 30% en peso y preferiblemente de 0,5% a 20% en peso, con respecto al peso total de la composición. Además, la emulsión puede comprender vesículas de lípidos.

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

De una manera conocida, la composición cosmética también puede comprender adyuvantes convencionales en el campo de la cosmética, tales como agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, aditivos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, agentes de apantallamiento, absorbedores de olores y materiales colorantes. Las cantidades de estos diversos adyuvantes son las usadas convencionalmente en el campo de la cosmética y, por ejemplo, de 0,01% a 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, dependiendo de su naturaleza, se pueden introducir en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas de lípidos.

Se pueden mencionar, como aceites o ceras que se pueden usar en la invención, aceites de parafina (vaselina líquida), aceites vegetales (fracción líquida de manteca de karité, aceite de girasol), aceites animales (perhidroescualeno), aceites sintéticos (aceite de purcellina), aceites o ceras de silicona (ciclometicona) y aceites fluorados (perfluoropolíéters), cera de abejas, cera de carnauba o cera de parafina. Se pueden añadir a estos aceites alcoholes grasos y ácidos grasos (ácido esteárico).

Se pueden mencionar, como emulsionantes que se pueden usar en la invención, por ejemplo, estearato de glicerilo, polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/glicol estearato vendida bajo el nombre Tefose® 63 por Gattefosse.

Se puede mencionar como disolventes que se pueden usar en la invención, alcoholes inferiores, en particular etanol e isopropanol, o propilenglicol.

Se puede mencionar como agentes gelificantes hidrófilos que se pueden usar en la invención, polímeros carboxivinílicos (carbómero), copolímeros acrílicos, tales como copolímeros de acrilato/acrilato de alquilo, poliacrilamidas, polisacáridos, tales como hidroxipropilcelulosa, gomas naturales y arcillas, y se pueden mencionar como agentes gelificantes lipófilos arcillas modificadas, tales como Bentones®, sales de metal de ácidos grasos, tales como estearatos de aluminio y sílice hidrófoba, etilcelulosa o polietileno.

En una realización ventajosa, las composiciones de acuerdo con la invención son composiciones de aceite en agua (O/W), en particular composiciones que comprenden principios activos lipófilos. Dichas composiciones se basan en particular en glóbulos oleosos provistos de un recubrimiento de cristal líquido laminar, como se describe en la solicitud de patente europea EP 641 557. La composición cosmética o dermatológica está constituida por una emulsión del tipo aceite en agua formada por glóbulos oleosos provistos de un recubrimiento de cristal líquido laminar dispersado en una fase acuosa; comprendiendo cada glóbulo oleoso al menos un compuesto lipófilo que es cosméticamente o dermatológicamente activo se recubre individualmente con una capa mono-laminar u oligo-laminar obtenida de al menos un agente tensioactivo lipófilo, de al menos un agente tensioactivo hidrófilo y de al menos un ácido graso, teniendo los glóbulos oleosos recubiertos un diámetro medio menor que 500 nanómetros, y la fase acuosa comprende un agente básico en el estado disuelto. Cuando las composiciones de acuerdo con la invención se usan para el tratamiento cosmético de la sustancia queratinosa, el principio activo presente en la fase oleosa se elige, por ejemplo, de reguladores de melanina, liporreguladores, agentes antiseborreicos, agentes antienviejimiento, agentes para combatir la radiación ultravioleta, agentes queratolíticos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes anticapa, agentes para combatir la pérdida del cabello, tintes para el cabello, aclaradores para el cabello o acondicionadores.

Se deben mencionar, como ejemplos de principios activos para el tratamiento de la piel y/o el cabello que se puede usar en el contexto de la presente invención, los siguientes compuestos:

D- α -tocoferol, DL- α -tocoferol, acetato de D- α -tocoferilo, acetato de DL- α -tocoferilo, palmitato de ascorbilo, glicéridos de vitamina F, vitaminas D, vitamina D₂, vitamina D₃, retinol, retinil ésteres, retinil palmitato, retinil propionato, β -caroteno, D-pantenol, farnesol, acetato de farnesilo, aceites de jojoba y grosella negra que son ricos en ácidos grasos esenciales, ácido 5-(n-octanoil)salicílico, ácido salicílico, ésteres alquílicos de α -hidroxiácidos, tales como ácido cítrico, ácido láctico o ácido glicólico, ácido asiático, ácido madecásico, asiaticósido, extracto total de centella asiática, ácido β -glicirretínico, α -bisabolol, ceramidas, tales como 2-oleoilamino-1,3-octadecano, fitanetriol, esfingomielina de la leche, fosfolípidos de origen marino ricos en ácidos grasos esenciales poliinsaturados, etoxiquina, extracto de romero, extracto de melisa, quercetina, extracto de microalgas secas (Rojo Algoxan de Algatec), metoxicinamato de octilo (Parsol MCX, Givaudan-Roure), butilmetoxidibenzoilmetano (Parsol 1.789, Givaudan-Roure), octil-triazona (Uvinul T150, BASF), óxidos de hierro amarillo, pardo, negro o rojo u óxidos de titanio, que se pueden proporcionar en la forma micrométrica o nanométrica o en la forma recubierta.

La cantidad de biomasa cultivada en agua termal o de sus extractos presente en las composiciones de acuerdo con la invención se ajustará por un experto en la materia para obtener la actividad deseada, de acuerdo con el tipo de extracto usado. Como indicación, la cantidad en las composiciones estará entre 0,001% y 10% en peso, con respecto al peso total de la composición, preferiblemente de 0,01% a 5% en peso; en particular, será al menos 0,1% en peso.

También se describió un método para mejorar la afección de las excrecencias cutáneas y/o superficiales, en el que al menos una bacteria, que se puede obtener por cultivo en un medio que comprende un agua termal no sulfurosa o mineral no sulfurosa como se definió anteriormente, uno de sus extractos o una composición que los comprende se aplica a las excrecencias cutáneas y/o superficiales.

De acuerdo con uno de los aspectos de la invención, se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición cosmética o dermatológica, en que al menos una bacteria, que se puede obtener por cultivo en un medio que comprende un agua no sulfurosa o mineral no sulfurosa como se definió anteriormente, o uno de sus extractos se mezcla con al menos un medio fisiológicamente aceptable y adyuvantes apropiados para el método de administración.

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

Ejemplo 1: Preparación de la biomasa

Preparación del medio de cultivo:

Composición:

* Extracto de levadura	2 g
* Peptona de papaína de soja	2 g
* Glucosa	2 g
* Microelementos de Heller	2 ml
* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	66,21 mg
* Agua termal de La Roche-Posay	c.s. para 1 litro

- 5 El pH del medio se ajusta a 5,00 con una disolución molar de H_3PO_4 . El medio se esteriliza por autoclave a 121°C durante 30 minutos. Después de enfriamiento a temperatura ambiente, el pH es reajustado a 7,20 por adición de una disolución molar de KOH.

Cultivo:

- 10 Después de inocular el medio al 1% con *V. filiformis* depositado en ATCC con el N° 15.551, se pone el cultivo en agitación orbital a 0,5 rad/s (100 revoluciones/min) y a 26°C. Después de cultivo durante 48 horas, se centrifuga el cultivo a 8.000 g durante 15 minutos. Se recogen los sedimentos y después se esterilizan en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Esta biomasa se puede usar para ensayos de evaluación.

Ejemplo 2: Comparación del efecto de una biomasa obtenida con o sin agua termal.

- 15 El objeto de este estudio es tratar de determinar los efectos sobre la expresión diferencial de genes en cultivos de queratinocitos humanos de la biomasa obtenida por cultivo en un medio de cultivo reconstituido con agua tratada osmóticamente (registrado como "biomasa" en la tabla), de la biomasa obtenida por cultivo en un medio reconstituido con agua termal de La Roche-Posay ("biomasa LRP") y de agua termal de La Roche-Posay ("agua termal LRP").

La biomasa se obtiene por cultivo del microorganismo (*V. filiformis* depositado en ATCC con el N° 15.551) en presencia o en ausencia de agua termal de La Roche-Posay. Se introduce a una concentración del 2%.

20

		Queratinocito	
Producto	ensayado	Corneodesmosina	LEP16
Control		-	-
Biomasa		-	-
Biomasa	LRP	+ 130%	+ 128%
Agua termal	LRP	-	-

(-) indica la no expresión del gen investigado.

Estos resultados se confirman por análisis por RT-qPCR de la corneodesmosina y marcadores LEP16 en un cultivo de queratinocitos.

- 25 En un cultivo de queratinocitos, sólo la biomasa cultivada en agua termal de La Roche-Posay estimula las expresiones de la corneodesmosina y LEP16. La biomasa cultivada en agua tratada osmóticamente o el agua termal de La Roche-Posay no presentan efecto sobre la expresión de estos genes marcadores para los queratinocitos. Paralelamente, el agua ultrapura de Merck usada como control no tiene efecto sobre la expresión de los genes en consideración.

Ejemplo 3: Diferencias en expresión entre el cultivo de *Vitreoscilla filiformis* en agua de La Roche-Posay frente al cultivo de *Vitreoscilla filiformis* en agua tratada osmóticamente.

Se usó electroforesis bidimensional como medio para separar y visualizar las proteínas expresadas en la biomasa de *Vitreoscilla filiformis*, en un caso cultivadas en agua de La Roche-Posay y en el otro caso cultivadas en agua tratada osmóticamente.

Este método de análisis consiste en separar las proteínas como una función de su pHi en una primera dimensión "horizontal" (esto es enfoque isoelectrico o IEF). Esta separación tiene lugar vía un gel que comprende un gradiente de pH inmovilizado, también conocido como tiras de IPG. Las proteínas se separan con posterioridad como una función de sus pesos moleculares en una segunda dimensión de migración "vertical". Los resultados muestran que los geles 2D son muy ricos en proteínas; las últimas se distribuyen en un intervalo de peso molecular entre 6 kDa y 100 kDa, con una abundancia de proteínas en la región de valores de pH ácidos. El análisis rápido de la imagen muestra 6 pintas diferentes, por otra parte, la sobreexpresión de dos proteínas en la biomasa cultivada en agua de La Roche-Posay y, por otra parte, 4 proteínas que parecen estar más expresadas en la biomasa cultivada en agua tratada osmóticamente.

Estos resultados muestran que existe una diferencia en nivel de expresión de las proteínas en las biomásas cultivadas en agua tratada osmóticamente en comparación con la cultivada en agua de La Roche-Posay.

Ejemplo 4: Incremento en el crecimiento con agua de Vittel

Los ensayos sobre cultivo de *Vitreoscilla filiformis* en un fermentador de 10 litros en modo continuo se llevaron a cabo partiendo de medios parcialmente reconstituídos con agua tratada osmóticamente (ensayo de control) y con agua mineral de Vittel (a 2%). El grado de crecimiento establecido por el método de cultivo continuo se fijó a $0,12 \text{ h}^{-1}$ y las condiciones de cultivo fueron idénticas en los 2 ensayos. La biomasa se concentró por centrifugación de un volumen de cultivo recogido de manera continua. La medición de la observancia a 600 nm hace posible vigilar el crecimiento del cultivo. Los sedimentos obtenidos se estabilizaron por tratamiento en autoclave a 121°C durante 30 minutos. El contenido en sólidos y la cantidad de sedimentos recogidos hace posible, a partir del volumen de cultivo centrifugado, determinar la concentración de células (en g/l) del correspondiente cultivo.

Tabla resumen para los ensayos:

Disolvente para reconstituir el medio de cultivo concentrado	Volumen de cultivo (l)	Cantidad de sedimentos (g)	Contenido en sólidos (%)	[Célula] (g/l)	Absorbancia (600 nm)
Agua tratada osmóticamente	10,98	220	5,41	1,08	3,17
Agua mineral Vittel	7,938	415	2,37	1,24	4,39

Conclusión:

En comparación con el cultivo de control en un medio reconstituído con agua tratada osmóticamente, el uso de agua de Vittel mejora el crecimiento de la bacteria; el rendimiento de células aumenta por 13%.

Ejemplo 5: Composición que comprende un extracto de *Vitreoscilla filiformis*.

Las fases A, B, C y D se preparan y se mezclan sucesivamente:

Fase		Cantidad (g)
A	PEG/PPG-18/18 dimeticona	10
A	Polisorbato 20	0,5
A	Ciclopentasiloxano	17
A	Cetildimeticona	6
A	Tocoferol	0,1

ES 2 543 351 T3

Fase		Cantidad (g)
A	Conservantes	0,7
B	Agua	25
B	Sulfato de magnesio	1
B	Glicerol	7
B	Propilenglicol	3
C	Agua	18,4
D	Agua	10
D	Extracto de Vitreoscilla filiformis*	1

* cultivado según el Ejemplo 1 pero en un medio que comprende 1% de agua de La Roche-Posay, siendo el resto agua tratada osmóticamente.

La composición así obtenida se puede aplicar por la mañana y/o por la noche en la cara, cuello, manos y/o el total del cuerpo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un principio activo cosmético o dermatológico, que comprende el cultivo de al menos una bacteria filamentosa no fotosintética y no fructificante en un medio que comprende al menos un agua mineral no sulfurosa y/o termal no sulfurosa.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que al menos una bacteria pertenece al género *Vitreoscilla*.
3. Procedimiento según una al menos de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la bacteria pertenece a la especie *Vitreoscilla filiformis*.
- 10 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la bacteria es la cepa depositada en ATCC con la referencia ATCC15551.
5. Procedimiento para la preparación de un principio activo cosmético o dermatológico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el agua termal y/o mineral presenta un contenido mineral total de mayor que o igual a 400 mg/l.
- 15 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la bacteria se cultiva en un medio que comprende un agua termal.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el agua termal o mineral presenta una concentración de iones calcio mayor que o igual a 100 mg/l.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el agua termal o mineral presenta una concentración de hidrogenocarbonatos mayor que o igual a 300 mg/l.
- 20 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la bacteria se cultiva en un medio que comprende al menos un agua termal elegida de agua de Vittel, aguas de la cuenca de Vichy exceptuando aguas sulfurosas, agua de La Roche-Posay o agua de La Bourboule.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el agua termal se elige de agua de La Roche-Posay y agua de Vittel.
- 25 11. Procedimiento para la preparación de un principio activo cosmético o dermatológico según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que comprende una fase durante la cual (i) al menos una bacteria que pertenece al orden de las Beggiatoales se cultiva en un medio que comprende un monosacárido como fuente principal de carbono y al menos un agua mineral o termal y después (ii), después de fermentación, se separan las bacterias del medio de cultivo para recuperar dicha masa de las bacterias.
- 30 12. Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que la masa de las bacterias que se recupera en el momento de la terminación de la fase de fermentación se somete a un tratamiento de estabilización.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el medio de cultivo comprende una mezcla (i) de agua tratada osmóticamente o destilada y (ii) de agua termal, con una proporción (i)/ (ii) de entre 1 y 100, en particular de 1 a 50.
- 35 14. Uso de al menos un agua termal no sulfurosa o mineral no sulfurosa como se define en una de las reivindicaciones precedentes, como agente para mejorar la actividad y/o el crecimiento de una bacteria del género *Vitreoscilla*.
- 40 15. Composición cosmética o dermatológica, caracterizada por que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos una bacteria del género *Vitreoscilla* que se puede obtener por el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, o un extracto de la última.