

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 004**

51 Int. Cl.:

A61K 8/99 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12P 23/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010** **E 10187448 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2441433**

54 Título: **Olleya marilimosa y su uso en un método para la preparación de una composición que contiene zeaxantina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2016

73 Titular/es:

VIGENENT INC. (100.0%)
No. 335, Sec. 6, Zhonghua Rd., Xiangshan Dist.
Hsinchu City 300, TW

72 Inventor/es:

DAI, KEN-SHWO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 583 004 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

Olleya marilimosa y su uso en un método para la preparación de una composición que contiene zeaxantina

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 Esta invención proporciona una cepa aislada de bacterias Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201 para la producción de zeaxantina y un método para preparar una composición que contiene zeaxantina microbiana de bacterias marinas Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201. Dicha composición se puede utilizar para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o alteraciones de la piel humana que consiste en un extracto de bacterias marinas seleccionadas de Flavobacteriaceae, más específicamente, de la Olleya marilimosa, en donde el extracto contiene una cantidad eficaz de la zeaxantina. La composición también se puede utilizar en los campos de aditivos alimentarios, cosméticos/para cuidado de la piel y productos farmacéuticos y nutracéuticos.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Los carotenoides son un grupo de pigmentos lipófilos que se encuentra en abundancia en plantas, algas y bacterias. Estos pigmentos naturales son responsables de diferentes colores (por ejemplo, rojo, amarillo y naranja) que se muestran en los organismos vivos. Más de 600 carotenoides han sido identificados y se divide estructuralmente en carotenos (hidrocarburos) y xantofilas (carotenos oxigenados). Las xantofilas son pigmentos de color amarillo. Con la adición de átomos de oxígeno, las xantofilas (por ejemplo, la luteína, neoxantina, violaxantina, zeaxantina, criptoxantina y anteraxantina) exhiben más comportamiento hidrófilo que los carotenos. Plantas tales como diversos frutos y vegetales son la fuente natural de xantófilos (Sommerburg et al., (1998) Br J Ophthalmol. 82: 907-910; Deli et al., (2001) J Agric Food Chem. 49:1517-23; Molnár et al., (2005) Phytother Res. 19:700-7) puesto que los xantófilos juegan un papel importante en la fotoprotección de plantas haciendo disminuir la posibilidad de daños celulares causados por exceso de luz (Demmig et al., (1987) Plant Physiol. 84:218-224; Niyogi et al., (1998) Plant Cell. 10:1121-34; Havaux and Niyogi, (1999) Proc Natl Acad Sci USA. 96:8762-7; Morosinotto et al., (2002) J Biol Chem. 277: 36913-20). Es interesante anotar que los xantófilos juegan un papel esencial en la salud visual (Bone et al., (1988) Invest Ophthalmol Vis Sci. 29:843-849; Handelman et al., (1988) Invest Ophthalmol Vis Sci. 29:850-855; Yeum et al., (1995) Invest Ophthalmol Vis Sci. 36:2756-2761; Hammond et al., (1997) Invest Ophthalmol Vis Sci. 38:1795-1801; Johnson et al., (2000) Am J Clin Nutr. 71:1555-1562; Bone et al., (2003) J Nutr. 133: 992-998; Ribaya-Mercado and Blumberg, (2004) J Am Coll Nutr. 23 (6 Suppl):567S-587S). Además, se ha reportado que los xantófilos están asociados con riesgos menores de cáncer (Orjuela et al., (2005) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14:1433-40; Kelemen et al., (2006) Am J Clin Nutr. 83: 1401-10; Zhang et al., (2007) Nutr Cancer. 59:46-53; Tamimi et al., (2009) Cancer Res. 69: 9323-9; Lee et al., (2009) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18:1730-9) y enfermedades cardiovasculares (Street et al., (1994) Circulation 90:1154-1161; Dwyer et al., (2001) Circulation. 103:2922-7). Un amplio espectro de actividades biológicas descritas anteriormente sugiere que las xantofilas son sustancias bioactivas con beneficios para la salud a los seres humanos.

40 La zeaxantina, un miembro de los xantófilos, es uno de los componentes esenciales de la zona macular. Cabe señalar que la zeaxantina no puede ser sintetizada en cuerpos de animales y por lo tanto debe ser obtenida de la dieta. Para fines comerciales, la zeaxantina puede ser obtenida por síntesis química (patentes de los EE.UU números 4,952,716; 5,227,507) o por medio de extracción a partir de fuentes naturales tales como plantas (patentes de los EE.UU números 5,648,564; 6,784,351; 6,191,293; 7,150,890; 7,173,145) o microbios (patentes de los EE.UU números 3,891,504; 3,951,742; 3,951,743; 5,308,759; 5,427,783). Debido a la preocupación del coste en el proceso de la síntesis química de la zeaxantina y al riesgo para la salud relacionado con el consumo de esta zeaxantina artificial, se prefiere la zeaxantina natural. Aunque se informa de que la zeaxantina puede ser extraída de fuentes naturales como se mostró de la técnica anterior, los problemas de bajo rendimiento y baja pureza de zeaxantina todavía existen y dan como resultado el alto coste de la preparación de zeaxantina. Por lo tanto, se requiere de microorganismos capaces de producir zeaxantina natural de alta pureza.

Resumen

La presente invención proporciona una cepa de bacterias aisladas de Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201 para la producción de zeaxantina.

50 La presente invención también proporciona un método para la preparación de una composición que contiene zeaxantina microbiana a partir de bacterias marinas de Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201, que comprende: (a) cultivo de bacterias marinas Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201 en un medio de cultivo líquido para formar pigmentos que contienen zeaxantina; (b) la separación de pigmentos contenidos en la masa celular de las bacterias marinas a partir del medio de cultivo líquido y recolección de

la masa celular para obtener la composición.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las colonias bacterianas (*Olleya marilimosa* VIG2317) en la placa de agar.

5 La figura 2 muestra el análisis por HPLC de la zeaxantina microbiana extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317. La pureza microbiana de la zeaxantina (F3; tiempo de retención: 17.683 minutos) es mayor que 90%.

10 La figura 3 muestra la actividad de fotoprotección de la zeaxantina microbiana extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317. Después de 15 minutos de irradiación UV, el efecto de protección de la zeaxantina microbiana sobre la viabilidad de las células de fibroblastos de piel humana (CCD-966SK línea celular) se determinó a las 24 horas. La viabilidad de las células tratadas con el zeaxantina microbiana (20 mg/ml, 50 mg/ml) se incrementa en 18,9% y 33,7%, respectivamente, en comparación con la de tratamiento sin zeaxantina.

La figura 4 muestra la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de la zeaxantina microbiana, extraída de *Olleya marilimosa* VIG2317, determinada mediante el método de tiocianato férrico a la concentración de 60 mg/ml. Un análisis de comparación demuestra que las actividades inhibidoras (66.9%, 68.6% y 69.7%) son similares para la zeaxantina, la luteína y β -caroteno, respectivamente, en densidad óptica a 500 nm.

15 La figura 5 muestra la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de la zeaxantina microbiana, extraída de *Olleya marilimosa* VIG2317, determinada mediante el método de dieno conjugado a una concentración de 30 mg/ml. Un análisis de comparación demuestra que las actividades inhibidoras (67.4%, 68.7% y 70.3%) son similares para la zeaxantina, la luteína y el β -caroteno, respectivamente, en densidad óptica a 500 nm.

20 La figura 6 muestra la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de la zeaxantina microbiana, extraída de *Olleya marilimosa* VIG2317, determinada usando el método de liposoma-TBARS (Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)). Los porcentajes de inhibición sobre la libre formación de MDA (malondialdehído) determinados a una densidad óptica de 532 nm son 55.23%, 61.05%, 71.16%, 78.45% y 80.75% para la zeaxantina microbiana a las concentraciones de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 1000 mg/ml y 2000 mg/ml respectivamente.

25 La figura 7 muestra la actividad antioxidante total de la zeaxantina microbiana, extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317, determinada a través del método TEAC (La capacidad antioxidante equivalente al Trolox). Los porcentajes de inhibición de absorbancia determinados a una densidad óptica de 734 nm son 15.68%, 28.13%, 53.35% y 91.22% para la zeaxantina microbiana en las concentraciones de 62.5 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml, y 500 mg/ml respectivamente.

30 La figura 8 muestra la actividad antioxidante de la zeaxantina microbiana, extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317, determinada usando el Método de captación de radicales libres DPPH (método de DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Los porcentajes de inhibición de la absorbancia determinados a una densidad óptica de 517 nm son 10.02%, 13.04%, 30.18%, 48.20% y 96.69% para la zeaxantina microbiana en las concentraciones de 62.5 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml y 1000 mg/ml, respectivamente.

35 La figura 9 muestra el efecto de la zeaxantina microbiana, extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317, sobre el contenido de melanina en las células B16-F10 de melanoma. Los porcentajes de inhibición sobre el contenido de melanina determinados en densidad óptica a 400 nm aumentaron de 6.74% a 22.71%, como las concentraciones de la zeaxantina microbiana aumentaron de 2 mg/ml a 20 mg/ml. Cuando el tiempo de incubación se aumentó de 24 horas a 48 horas, los porcentajes de inhibición en el contenido de melanina se aumentó de 6.74% a 32.49% y del 22.71% al 36.74% para las concentraciones de la zeaxantina microbiana en 2 mg/ml y 20 mg/ml respectivamente.

40 La figura 10 muestra la actividad antiproliferación de la zeaxantina microbiana, extraída de la *Olleya marilimosa* VIG2317, en células de cáncer humano utilizando el ensayo MTT. Las viabilidades de células de cáncer tratadas con 30 mg/ml y 60 mg/ml de zeaxantina natural, respectivamente son 74% y 67,7% para el carcinoma de próstata (PC-3); 72.3% y 75.3% para el adenocarcinoma colorrectal (LS123); 57.3% y 40.1% para el adenocarcinoma gástrico (AGS); 78.7% y 61.6% para el adenocarcinoma de mama (MCF7); 70.3% y 20.3% para el cáncer de ovario (TOV-112D); 72.6% y 28.5% para el carcinoma de células escamosas de faringe (FaDu); 75.6% y 33.4% para el adenocarcinoma de páncreas (BxPC-3); 72.1% y 40.0% para el corioncarcinoma (JAR); 45.9% y 16.4% para el carcinoma primario de la vejiga (5637) y 70.9% y 71.7% para el carcinoma de células escamosas de la tiroides (SW579). Para comparación, las viabilidades celulares de células no cancerosas son 105.6% y 12.2% para células epiteliales retinal pigmentadas (ARPE-19); 102.3% y 101.2% para los fibroblastos embrionarios (BCRC60118) y el 95.8% y el 99.8% para los fibroblastos de piel humana (BCRC 60153).

50 Descripción detallada de las realizaciones

Una composición que comprende un extracto de bacterias marinas, que contiene zeaxantina se prepara por el método

de la presente invención. Se proporciona dicha composición que se puede usar en los campos de aditivos alimentarios, cosméticos/cuidado de la piel y productos farmacéuticos y nutracéuticos.

El extracto que contiene una cantidad eficaz de la zeaxantina se obtiene de una cepa de bacterias marinas de la familia Flavobacteriaceae. Por lo tanto, la zeaxantina extraída de bacterias marinas de la familia Flavobacteriaceae es la llamada "zeaxantina microbiana" en la presente invención. Las características de las bacterias marinas de la familia de las Flavobacteriaceae son bacterias gram-negativas, pigmentadas de amarillo, con forma de barra y aerobias. Muchas bacterias marinas con las mismas características son aisladas de la familia Flavobacteriaceae como la *Zeaxanthinibacter enoshimensis* (Asker et al., (2007) Int J Syst Evol Microbiol. 57(Pt 4):837-43), *Olleya marilimosa* (Nichols et al., (2005) Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 4): 1557-61), *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (Berry et al., (2003) Int J Syst Evol Microbiol. 53(Pt 1):231-8), and *Hyunsoon-leella jejuensis* (Yoon et al., (2010) Int J Syst Evol Microbiol 60(Pt 2):382-6).

Según la presente invención, la bacteria marina es *Olleya marilimosa*. Más específicamente, la bacteria marina es una nueva cepa, *Olleya marilimosa* VIG2317, con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201, que se depositó en el Centro Chino para la Colección de Tipos de Cultivos.

La composición que comprende extracto bacteriano marino obtenido de *Olleya marilimosa* VIG2317 contiene de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg como cantidad eficaz de zeaxantina microbiana, más preferiblemente, la cantidad efectiva es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg.

Como referencia, la pureza de la zeaxantina microbiana obtenida de la *Olleya marilimosa* VIG2317 puede ser al menos 90% (área de HPLC%).

La composición de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir la alteración de la piel humana, como el envejecimiento de la piel resultado de la exposición a la radiación UV y/o pigmentación de la piel como resultado del aumento del contenido de melanina.

La composición de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir enfermedades tales como enfermedades oculares, enfermedades cardiovasculares, o cánceres. En una realización, las enfermedades de los ojos son causadas por niveles insuficientes de zeaxantina macular y/o zeaxantinas séricas. Las enfermedades cardiovasculares se asocian con un aumento de la peroxidación lipídica y/o malondialdehído. Los tipos de cáncer son carcinoma de próstata, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de mama, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas de faringe, adenocarcinoma de páncreas, corioncarcinoma primario de vejiga y/o carcinoma de células escamosas de la tiroides.

La composición de la presente invención comprende el extracto bacteriano que contiene zeaxantina microbiana marina, y un vehículo o excipiente adecuado, donde el vehículo es, por ejemplo pero sin limitación, agua, aceite, solvente orgánico. La composición de la presente invención se puede administrar por vía tópica o por vía oral.

La presente invención también proporciona un método para preparar una composición que contiene zeaxantina microbiana a partir de bacterias marinas de *Olleya marilimosa* con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201, que comprende las etapas de: (a) cultivar bacterias marinas de *Olleya marilimosa* con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201, que comprende un medio de cultivo líquido para formar pigmentos que contienen zeaxantina; (b) separar la masa de células que contiene pigmentos de las bacterias marinas con los pigmentos del medio de cultivo líquido y recolectar la masa celular para obtener la composición que contiene la zeaxantina microbiana, y (c) mezclar opcionalmente la masa celular y un vehículo. La composición puede ser usada directamente como aditivo alimentario o nutriente sin purificación adicional.

En una realización, la presente invención comprende además las siguientes etapas: (d) pulverización de la masa celular de las bacterias marinas; (e) digestión de los restos de células y la disolución de los pigmentos mediante el uso de un solvente; y (f) eliminación del solvente para obtener zeaxantina. De pasos anteriores, la zeaxantina microbiana puede ser aislada y purificada adicionalmente, la zeaxantina obtenida de la etapa (f) tiene al menos 90% (% de área por HPLC) de pureza. En otra realización, la pureza es de al menos 95%, o al menos 97%.

En un método de referencia fuera de la invención reivindicada, las bacterias marinas son seleccionadas de un grupo que consiste en *Zeaxanthinibacter*, *Olleya*, *Paracoccus*, *Hyunsoonleella*, y mutantes de la misma. Más particularmente, las bacterias marinas se seleccionan de un grupo que consiste en *Zeaxanthinibacter enoshimensis*, *Olleya marilimosa*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, *Hyunsoonleella jejuensis*, y mutantes de las mismas. De acuerdo con el método de la presente invención, la bacteria marina es *Olleya marilimosa* VIG2317 con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201.

Ejemplos

Los siguientes pasos se utilizan para la extracción de la zeaxantina de *Olleya marilimosa* VIG2317.

1. Cultivo y caracterización bacterianos.

Una cepa bacteriana (*Olleya marilimosa* VIG2317 con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201), aislada a partir de una muestra de agua de mar recogida del Océano Pacífico en la costa este de Taiwán, forma colonias amarillas en agar marino (Fig. 1) que se habían incubado a 25°C durante 2 días. La caracterización de la cepa VIG2317 se llevó a cabo por el Instituto para la Investigación y el Desarrollo de la Industria de los Alimentos (FIRDI), Hsinchu, Taiwán. Las células son gram-negativas, pigmentadas de amarillo, en forma de barra, móviles, aerobias y no formadoras de endosporas. De acuerdo con el análisis de la secuencia de los ARNr 16S, la cepa VIG2317 estaba estrechamente relacionada (99% de similitud de secuencias) con la *Olleya marilimosa*. Las características bioquímicas y morfológicas de VIG2317 y *Olleya marilimosa* CIP 108537 se muestran en la Tabla 1.

Las colonias individuales de VIG2317 en las placas se recogieron y se cultivaron en medios ricos, tal como caldo marino en el matraz, los cuales fueron usados como cultivo de siembra para la fermentación. Un volumen de cultivo de siembra se transfiere al fermentador.

Tabla 1 [0038]

Características	VIG2317	<i>Olleya marilimosa</i> CIP 108537T
Crecimiento a 25°C	+	+
Crecimiento a 30°C	+	+
Motilidad	+	+
Producción de: pigmento	+	+
H ₂ S	-	-
Indol	-	-
β-galactosidasa	-	-
Ureasa	-	-
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Acetoína	+	-
Arginina hidrolasa	-	-
β-glucosidasa	+	-
Degradación de genalina	+	+
Reducción de nitratos	-	-
Asimilación de:		
Glucosa	+	+
Maltosa	+	+
Manosa	+	+
Arabinosa	-	-
Manitol	-	-

D-gluconato	-	-
Ácido cáprico	-	-
Ácido adípico	-	-
Citrato trisódico	-	-

2. Extracción, purificación y análisis por HPLC de Zeaxantina microbiana

Muestra del cultivo recogido del fermentador se extrajo con solvente tal como acetona. El extracto de acetona fue aplicado sobre una columna sílica gel y se eluyó con una mezcla de acetato de etilo-hexano 3:7 (v/v). Usando un liofilizador, la fracción recogida se pulverizó para el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

El extracto seco se disolvió en metanol y se filtró para el análisis por HPLC. El sistema de HPLC se programó para inyectar muestras de 10 µl en una columna C-18 ODS 4.6x250 mm. La fase móvil contenía 20% de metanol, 73% de acetonitrilo, solución amortiguadora Tris-HCl 7%. La columna se hizo funcionar a temperatura ambiente. La separación se llevó a cabo a un flujo de 1,0 ml/min. La longitud de onda de detección fue de 450 nm. La pureza de zeaxantina microbiana es mayor que 90% analizada mediante HPLC (Fig. 2).

3. Determinación de la actividad de fotoprotección de la zeaxantina microbiana

Células de fibroblastos de piel humana (línea celular CCD-966SK) se cultivaron sobre la placa. Las células fueron tratadas con zeaxantina microbiana disuelta en sulfóxido de dimetilo. Después de ser tratadas durante 24 horas las placas se irradiaron con UV durante 15 min y las células fueron incubadas durante 24 horas. Las células se separaron con tripsina y se contaron mediante un hemocitómetro. Se proporciona el efecto de protección de la zeaxantina microbiana sobre la viabilidad de células de fibroblastos (Fig. 3).

Las células de fibroblastos de la piel, células esenciales de la piel, son responsables de la producción de colágeno, un componente estructural de la piel (Stanley et al., (1985) J Invest Dermatol. 85:542-545; Olsen et al., (1989) J. Clin. Invest. 83: 791-795; Akagi et al., (1999) J. Invest. Dermatol. 113: 246-250). La reducción de colágeno es un fenómeno biológico responsable de la apariencia arrugada que se encuentra en la piel envejecida, ya sea causado intrínsecamente (envejecimiento cronológico) o extrínsecamente (por ejemplo, fotoenvejecimiento: exposición a irradiación UV) (Burke et al., (1994) Exp Gerontol 29:37-53; Fisher et al., (1997) New Eng J Med 337:1419-1428; Fligiel et al., (2003) J Invest Dermatol. 120:842-848; Varani et al., (2006) Am J Pathol. 168:1861-8; Chauhan and Shakya, (2009) Indian J Dermatol Venereol Leprol, 75:463-8). Adicionalmente, la irradiación UV ha reportado que causa la pérdida de la viabilidad celular (Kulms and Schwarz (2000) Photodermatol Photoimmunol Photomed.16:195-201; Murphy et al., (2001) Exp. Dermatol. 10:155-160; Ichihashi et al., (2003) Toxicology. 189:21-39; Philips et al., (2007) Arch Dermatol Res. 299:373-9). Después de la irradiación UV, la viabilidad de células de fibroblastos de piel humana tratadas con zeaxantina microbiana (20 mg/ml, 50 mg/ml) se incrementa 18.9% y 33.7%, respectivamente, en comparación con la de tratamiento sin zeaxantina microbiana. Cabe señalar que este aumento de la viabilidad celular se asocia con el aumento de la concentración de zeaxantina microbiana lo que sugiere que la zeaxantina microbiana es un agente fotoprotector importante que puede ser utilizado en los campos de aditivos alimentarios, cosméticos/cuidado de la piel y productos farmacéuticos y nutracéuticos.

4. Determinación de actividades antioxidantes de la Zeaxantina Microbiana

Se proporcionan actividades antioxidantes de la zeaxantina microbiana (figuras. 4-7). Debido a que los carotenoides son un grupo de pigmentos orgánicos conocidos por reducir los riesgos para la salud de los sistemas biológicos a través de sus actividades antioxidantes (Burton, (1989) J. Nutr. 119: 109-11), es por lo tanto esencial demostrar si la zeaxantina microbiana es un ingrediente bioactivo para la prevención del daño celular causado por reacciones en cadena de la oxidación.

(1) La actividad inhibidora de la peroxidación lipídica de la zeaxantina microbiana se determina utilizando el método de tiocianato férrico (Fig. 4):

La zeaxantina microbiana se disolvió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,2 M y se mezcló con la mezcla de emulsión de ácido linoleico preparada con una solución amortiguadora de fosfato de potasio. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se añadió una mezcla con 75% de etanol, tiocianato de amonio y cloruro de hierro II tetrahidratado. La absorbancia a 500 nm fue determinada después de 1 min de incubación. Actividad Inhibidora = [1-(Abs de muestra/Abs del blanco)] * 100%. Un análisis de comparación demuestra que las actividades inhibidoras (66.9%, 68.6% y 69.7%) son similares para la zeaxantina, la luteína y el β-caroteno, respectivamente.

(2) La actividad inhibidora de la peroxidación lipídica de la zeaxantina microbiana es determinada utilizando el método de dieno conjugado (Fig. 5):

La zeaxantina microbiana se disolvió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,2 M y se mezcló con la mezcla de emulsión de ácido linoleico preparada mediante un regulador de fosfato de potasio. Se determinó la absorbancia de 234 nm después de la incubación por 15 horas a 37°C. Actividad inhibidora = $[1 - (\text{Abs de muestra}/\text{Abs del blanco})] \times 100\%$. Un análisis de comparación demuestra que las actividades inhibidoras (67.4%, 68.7% y 70.3%) son similares para la zeaxantina, la luteína y el β -caroteno, respectivamente.

(3) la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de la zeaxantina microbiana fue determinada usando TBARS en liposomas (el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) (Fig. 6). La zeaxantina microbiana se disolvió en metanol y se mezcló con la emulsión de liposomas, cloruro de hierro (III), y ácido ascórbico. Después de 2 horas en un baño de maría a 37 °C, se añadió a la mezcla hidroxitolueno butilado, ácido tiobarbitúrico y el ácido tricloroacético. Después de 20 min en baño de maría (100 °C), la mezcla se enfrió con hielo. Se determinó la absorbancia a 532 nm. Actividad Inhibidora del MDA (malondialdehído) = $[1 - (\text{Abs de muestra}/\text{Abs del blanco})] \times 100\%$. Los porcentajes de inhibición del MDA libre se incrementaron de 55.23% al 80.75% a medida que las concentraciones de la zeaxantina microbiana aumentaron de 125 mg/ml a 2000 mg/ml.

(4) La actividad antioxidante de la zeaxantina microbiana se determinó utilizando el método TEAC (La capacidad antioxidante equivalente al Trolox) (Fig. 7).

La zeaxantina microbiana se disolvió en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,01 M y se mezcló con ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenc-tiazolina-6- sulfónico que contenía persulfato de potasio. La absorbancia a 734 nm se determinó después de 30 minutos de incubación. Actividad inhibidora = $[1 - (\text{Abs de muestra}/\text{Abs del blanco})] \times 100\%$. Los porcentajes de inhibición se aumentaron de 15.68% a 91.22%, a medida que las concentraciones de la zeaxantina microbiana aumentaron de 62,5 mg/ml a 500 mg/ml.

(5) La actividad antioxidante de la zeaxantina microbiana fue determinada usando el método de eliminación de radicales libres DPPH (método de DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Fig. 8).

La zeaxantina microbiana se disolvió en metanol y se mezcló con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en metanol. La absorbancia se determinó a 517nm después de 30 minutos de incubación. Actividad inhibidora = $[1 - (\text{Abs de muestra}/\text{Abs del blanco})] \times 100\%$. Los porcentajes de inhibición se aumentaron de 10,02% a 96,69%, a medida que las concentraciones de la zeaxantina microbiana aumentaron de 62,5 mg / ml a 1,000 mg/ml. Estos resultados sugieren que la zeaxantina microbiana es un potente antioxidante, que puede ser utilizado en los campos de los aditivos alimentarios, cosméticos/cuidado de la piel y productos farmacéuticos y nutracéutico.

5. El efecto de la zeaxantina microbiana sobre el contenido de melanina en células de melanoma B16-F10 (Fig. 9).

Se cultivaron células de melanoma B16-F0 de ratón sobre placa. Las células fueron tratadas con zeaxantina microbiana disuelta en sulfóxido de dimetilo. Después de ser tratadas durante 24 hrs y 48 hrs respectivamente, el medio se retiró y las células se lavaron con PBS y después se disolvieron en NaOH 1 N que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). El contenido de melanina relativa se determinó en densidad óptica a 400nm. Los porcentajes de inhibición sobre el contenido de melanina aumentaron de 6.74% a 22.71%, a medida que las concentraciones de la zeaxantina microbiana aumentaron de 2 mg/ml a 20 mg/ml. Cuando el tiempo de incubación se aumentó de 24 horas a 48 horas, la inhibición se aumentó de 6.74% a 32.49% y del 22.71% al 36.74% para las concentraciones de zeaxantina microbiana a 2 mg/ml y 20 mg/ml respectivamente. Los resultados indican que las zeaxantinas microbianas causan una inhibición dependiente del tiempo y la dosis sobre el contenido de melanina. Este hallazgo sugiere que la zeaxantina microbiana puede ser utilizada como agente blanqueante para uso cosmético.

6. La actividad antiproliferativa de la zeaxantina microbiana en células cancerosas (Fig. 10).

Se cultivaron células cancerosas en placa. Las células fueron tratadas con zeaxantina microbiana disuelta en sulfóxido de dimetilo. Después de 24 horas de incubación, se agregó a las células bromuro de tiazolil azul de tetrazolio y se incubaron durante 4 horas. El medio se retiró y los cristales se disolvieron en dimetilsulfóxido seguido de la medición de la absorbancia a 590 nm. Viabilidad celular = $(\text{Abs de células tratadas con zeaxantina}/\text{Abs de células no tratadas}) \times 100\%$. Ya que se ha reportado que las xantofilas están asociadas con un menor riesgo de los cánceres Orjuela et al., (2005) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14:1433-40; Kelemen et al., (2006) Am J Clin Nutr. 83: 1401-10; Zhang et al., (2007) Nutr Cancer. 59:46-53; Tamimi et al., (2009) Cancer Res. 69: 9323-9; Lee et al., (2009) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18:1730-9, es necesario determinar si la zeaxantina microbiana contiene actividad anticáncer. Usando 30 mg/ml de zeaxantina microbiana, las viabilidades celulares son 74% para el carcinoma de próstata (PC-3); 72.3% para el adenocarcinoma colorrectal (LS123); 57.3% para el adenocarcinoma gástrico (AGS); 78.7% para el adenocarcinoma de mama (MCF7); 70,3% para el cáncer de ovario (TOV-112D); 72.6% para el carcinoma de células escamosas de faringe (FaDu); 75.6% para el adenocarcinoma de páncreas (BxPC-3); 72.1% de coriocarcinoma (JAR);

45.9% para el carcinoma primario de la vejiga (5637) y 70,9% para el carcinoma de células escamosas de la tiroides (SW579). Para comparación, las viabilidades celulares de células no cancerosas son 105,6% para células epiteliales retinales pigmentadas (ARPE-19); 102,3% para fibroblastos embrionarios (BCRC60118) y 95.8% para los fibroblastos de piel humana (BCRC 60153). Bajo la condición de aumento de la concentración de zeaxantina microbiana a 60 mg/ml, las viabilidades celulares son de 67.7% para el carcinoma de próstata (PC-3); 75.3% para el adenocarcinoma colorrectal (LS123); 40.1% para el adenocarcinoma gástrico (AGS); 61.6% para el adenocarcinoma de mama (MCF7); 20.3% para el cáncer de ovario (TOV-112D); 28.5% para el carcinoma de células escamosas de faringe (FaDu); 33.4% para el adenocarcinoma de páncreas (BxPC-3); 40.0% de coriocarcinoma (JAR); 16.4% para el carcinoma primario de la vejiga (5637) y 71.7% para el carcinoma de células escamosas de tiroides (SW579). Para comparación, las viabilidades celulares de células no cancerosas son 124,2% células epiteliales retinales pigmentadas (ARPE-19); 101,2% para fibroblastos embrionarios (BCRC60118) y el 99,8% de fibroblastos de piel humana (BCRC 60153). Los resultados indican que todas las células cancerosas ensayadas en la presente invención son sensibles a la zeaxantina microbiana a una concentración de 30 µg/ml. Sin embargo, hay que señalar que la supresión de la proliferación celular dependiente de la dosis se encuentra en algunas células de cáncer como el cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas de faringe, adenocarcinoma de páncreas, coriocarcinoma y carcinoma primario de vejiga cuando la concentración de la zeaxantina microbiana se aumenta a 60 µg/ml. Estos resultados sugieren que la zeaxantina microbiana es un agente anticáncer que se puede utilizar en los campos de los aditivos alimentarios, cosméticos/cuidado de la piel y productos farmacéuticos y nutracéuticos.

Las siguientes formulaciones se proporcionan para ilustración, pero no para limitar la invención.

20 Formulación 1: Esencia

Se mezcla zeaxantina microbiana (400 ppm en butilenglicol) con metabisulfito de sodio, etilhexilglicerina, fenoxietanol, arginina, glicirrizato dipotásico, hialuronato de sodio, PEG-16 glicéridos de macadamia, acrilatos/C10-30 acrilato de alquilo polímero reticulado, EDTA disódico y agua.

Formulación 2: Loción de leche

25 Se mezcla zeaxantina microbiana (400 ppm en butilenglicol) con metabisulfito de sodio, ácido cítrico, citrato de sodio, acetato de tocoferol, goma de celulosa, sorbato de potasio, etilhexilglicerina, bisabolol, acriloldimetiltaurato de amonio/copolímero VP, butyrospermum parkii (manteca de karité), beheneth-25, alcohol cetílico, glicerina, olivato cetearílico, isononanoato de isononilo, helianthus annuus (girasol) aceite de semilla, fenoxietanol, hialuronato de sodio, EDTA disódico y agua.

30 Formulación 3: Suplementos dietarios/dosis farmacéutica □

Zeaxantina microbiana 10 mg se disuelve en aceite de maíz y se envasa en forma de cápsula de gelatina blanda.

Formulación 4: Suplementos dietarios / dosis farmacéutica

Se mezclan 10 mg de zeaxantina microbiana con agentes de granulación y se envasa en forma de tableta.

Formulación 5: Suplementos dietarios

35 Se mezclan 10 mg de zeaxantina microbiana con luteína y/u otros nutrientes y/o antioxidantes disueltos en aceite de de maíz/maní y se envasa en forma de cápsulas de gelatina blanda.

Formulación 6: Suplementos dietarios □

Se mezclan 10 mg de zeaxantina microbiana con luteína y/o otros nutrientes y/o minerales y se envasa en forma de tableta.

40 Referencias

Akagi et al., Expression of type XVI collagen in human skin fibroblasts: enhanced expression in fibrotic skin diseases. J. Invest. Dermatol. 113: 246-250, (1999).

45 Asker et al., Zeaxanthinibacter enoshimensis gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater off Enoshima Island, Japan. Int J Syst Evol Microbiol. 57(Pt 4):837-43, (2007).

Berry et al., Paracoccus zeaxanthinifaciens sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 53(Pt

- 1):231-8, (2003).
- Bone et al., Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29:843-849, (1988).
- 5 Bone et al., Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. J Nutr 133:992-998, (2003).
- Burke et al., Altered transcriptional regulation of human interstitial collagenase in cultured skin fibroblasts from older donors. Exp Gerontol 29:37-53, (1994).
- Chauhan and Shakya, Modeling signaling pathways leading to wrinkle formation: identification of the skin aging target. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 75:463-8, (2009).
- 10 Deli et al., Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; biosynthesis of carotenoids in red paprika. J Agric Food Chem. 49:1517-23, (2001).
- Demmig et al., Photoinhibition and Zeaxanthin Formation in Intact Leaves: A Possible Role of the Xanthophyll Cycle in the Dissipation of Excess Light Energy. Plant Physiol. 84:218-224, (1987).
- 15 Dwyer et al., Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. Circulation. 103:2922-7, (2001).
- Fisher et al., Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New Eng J Med 337:1419-1428, (1997).
- Hammond et al., Dietary modification of human macular pigment density. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1795-1801, (1997).
- 20 Handelman et al., Carotenoids in the human macula and whole retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29:850-855, (1988).
- Havaux and Niyogi, The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism Proc Natl Acad Sci USA. 96:8762-7, (1999).
- Ichihashi et al., UV-induced skin damage. Toxicology. 189:21-39, (2003).
- 25 Johnson et al., Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. Am J Clin Nutr. 71:1555-1562, (2000).
- Kelemen et al., Vegetables, fruit, and antioxidant-related nutrients and risk of non-Hodgkin lymphoma: a National Cancer Institute-Surveillance, Epidemiology, and End Results population-based case-control study. Am J Clin Nutr. 83: 1401-10, (2006).
- 30 Kulms and Schwarz, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 16:195-201, (2000).
- Lee et al., Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18:1730-9, (2009).
- Molnár et al., Biological activity of carotenoids in red paprika, Valencia orange and Golden delicious apple. Phytother Res. 19:700-7, (2005).
- 35 Morosinotto et al., Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. J Biol Chem. 277:36913-20, (2002).
- Murphy et al., The molecular determinants of sunburn cell formation. Exp Dermatol. 10:155-160, (2001).
- Nichols et al., *Olleya marilimosa* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family Flavobacteriaceae, isolated from the Southern Ocean. Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 4):1557-61, (2005).
- 40 Niyogi et al., Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. Plant Cell. 10:1121-34, (1998).

- Olsen et al., Collagen gene expression by cultured human skin fibroblasts. Abundant steady-state levels of type VI procollagen messenger RNAs. *J. Clin. Invest.* 83: 791-795, (1989).
- Orjuela et al., Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:1433-40, (2005).
- 5 Philips et al., Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 299:373-9, (2007).
- Ribaya-Mercado and Blumberg, Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 23 (6 Suppl):567S-587S, (2004).
- 10 Sommerburg et al., Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br J Ophthalmol.* 82: 907-910, (1998).
- Stanley et al., Epidermolysis bullosa acquisita antigen is synthesized by both human keratinocytes and human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 85:542-545, (1985).
- Street et al., Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation* 90:1154 -1161, (1994).
- 15 Tamimi et al., Circulating carotenoids, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer. *Cancer Res.* 69: 9323-9, (2009).
- Varani et al., Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 168:1861-8, (2006).
- 20 Yeum et al., Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:2756 -2761, (1995).
- Yoon et al., *Hyunsoonleella jejuensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(Pt 2):382-6, (2010).
- Zhang et al., Plasma carotenoids and prostate cancer: a population-based case-control study in Arkansas. *Nutr Cancer.* 59:46-53, (2007).
- 25 Patentes
- Patentes de EE.UU. números:
- 3,891,504: Proceso para la fabricación de zeaxantina (24 de junio de 1975)
- 3,951,742: Producción de zeaxantina (20 de abril de 1976)
- 3,951,743: Producción de zeaxantina (20 de abril de 1976)
- 30 4,952,716: Compuestos de etinil ciclohexano (28 de agosto de 1990)
- 5,227,507: Compuestos de etinil ciclohexano y procesos para la fabricación de los mismos (13 de julio de 1993)
- 5,308,759: Fabricación de zeaxantina y composiciones que contienen zeaxantina (3 de mayo de 1994)
- 5,427,783: Fabricación de composiciones que contienen zeaxantina producida a partir de *flavobacterium multivorum* (27 de junio de 1995)
- 35 5,648,564: Proceso para formación, aislamiento y purificación de cristales de xantofila comestibles a partir de plantas (15 de julio de 1997)
- 6,784,351: Caléndulas *Tagetes erecta* con composiciones de carotenoides alterados y proporciones (31 de agosto de 2004)
- 6,191,293: Concentrados de éster de trans-xantofila de pureza incrementada y métodos de fabricación de los mismos

(20 d e febrero de, 2001)

7,150,890: Proceso para la purificación de xantofilas de caléndula (19 de diciembre de 2006)

7,173,145: Proceso para la extracción y purificación de luteína, zeaxantina y carotenoides raros de las flores y plantas de caléndula (6 de febrero de 2007)

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacteria aislada de Olleya marilimosa con Número de acceso de Depósito CCTCC M2010201 para la producción de zeaxantina.
- 5 2. Un método para preparar una composición que comprende zeaxantina microbiana a partir de bacterias marinas de Olleya marilimosa con Número de Acceso de Depósito CCTCC M2010201, que comprende:
 - (a) cultivo de las bacterias marinas Olleya marilimosa con Número de Acceso CCTCC M2010201 en un medio de cultivo líquido para formar pigmentos que comprenden la zeaxantina;
 - 10 (b) separación de los pigmentos contenidos en la masa celular de las bacterias marinas a partir del medio de cultivo líquido y recolección de la masa celular para obtener la composición.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, que comprende además las siguientes etapas:
 - (d) pulverización de la masa celular de las bacterias marinas;
 - (e) digestión de los restos de células y la disolución de los pigmentos mediante el uso de un solvente; y
 - 20 (f) eliminación del solvente para obtener zeaxantina.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el solvente es acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, alcohol isopropílico o ciclohexano.
- 25 5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde la zeaxantina obtenida de la etapa (f) tiene al menos 90%, preferiblemente 95%, más preferido 97% de pureza (% de área por HPLC).

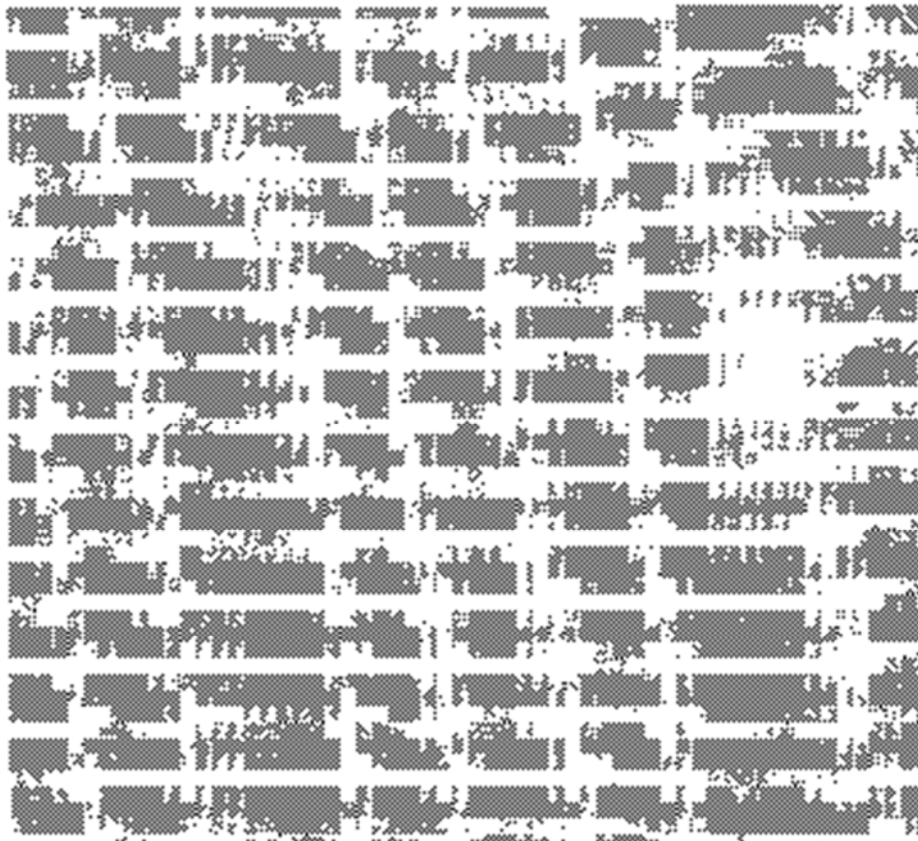


FIG. 1

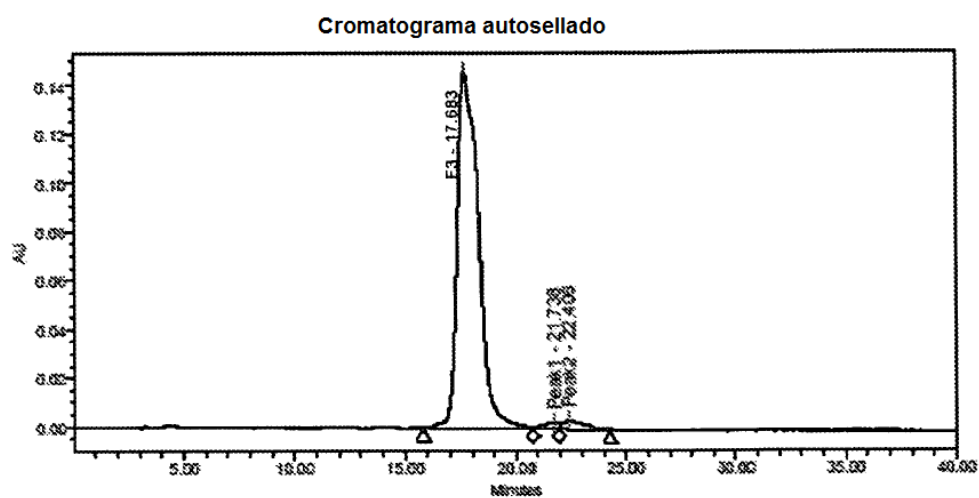


FIG. 2

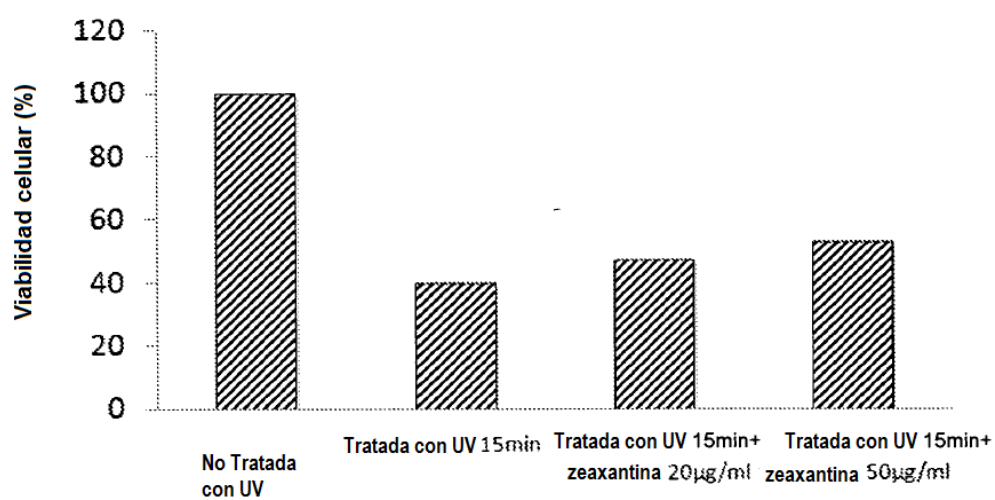


FIG. 3

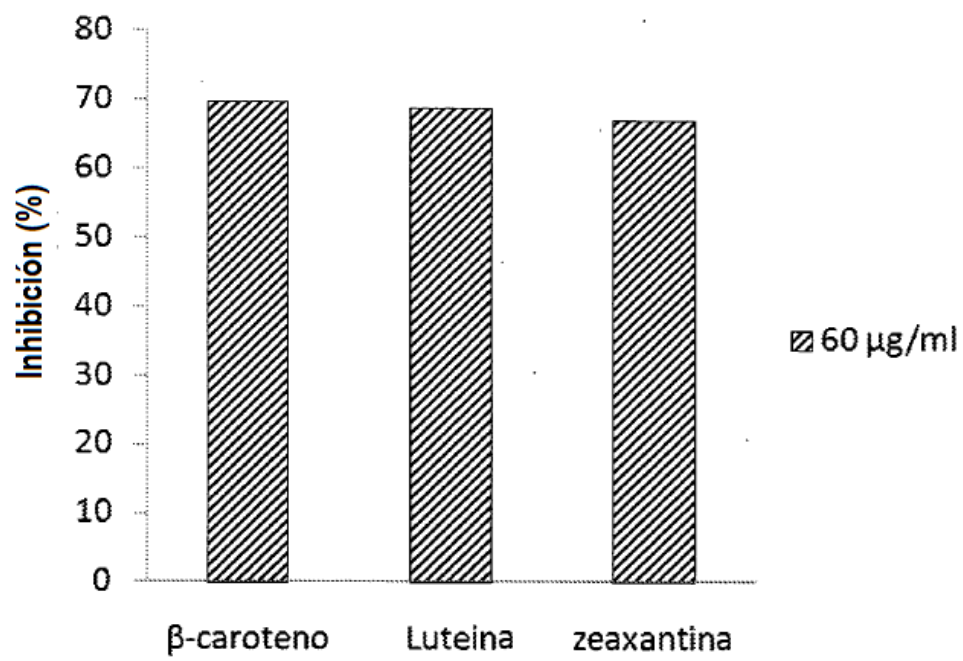


FIG. 4

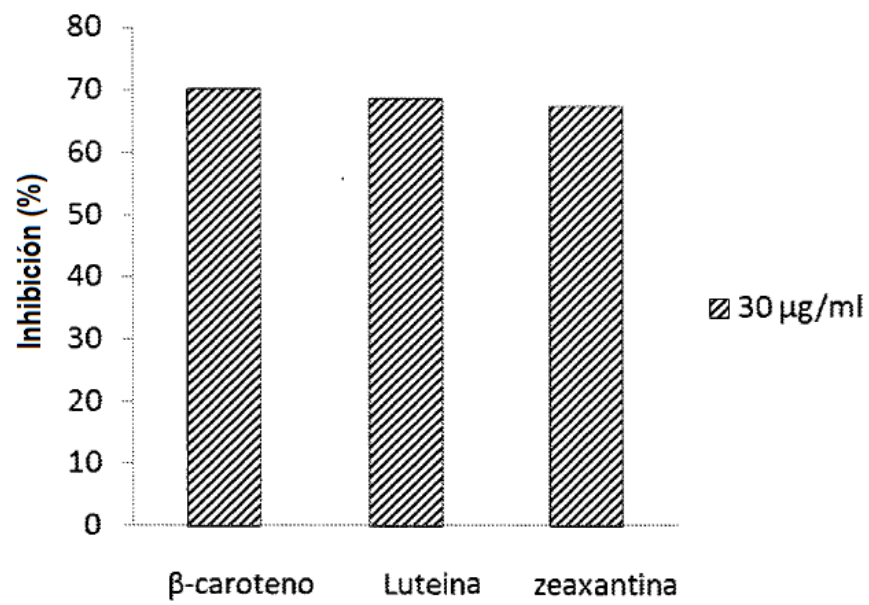


FIG. 5

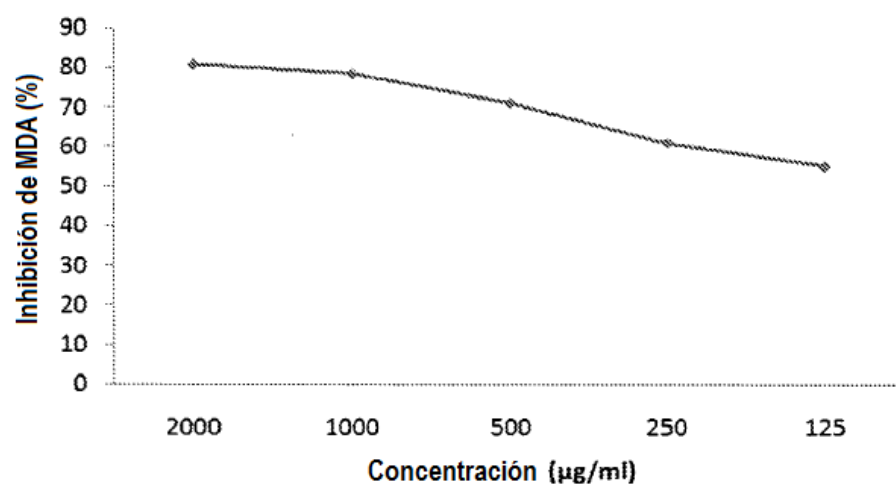


FIG. 6

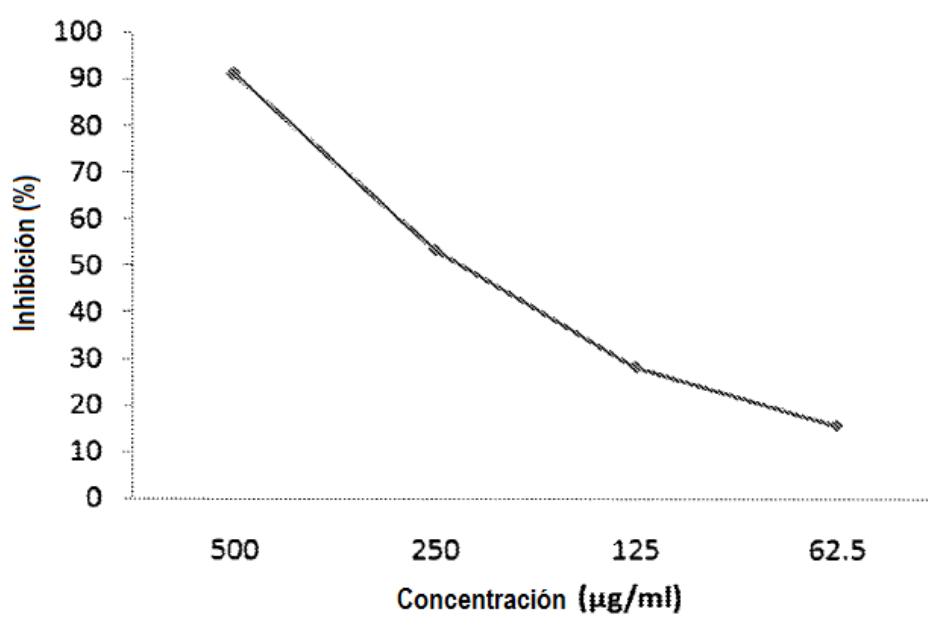


FIG. 7

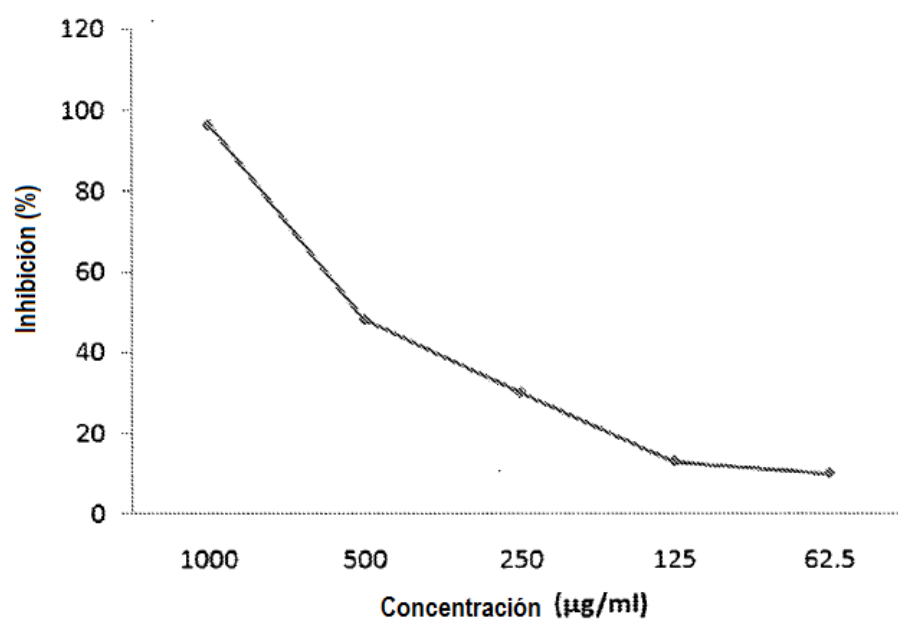


FIG. 8

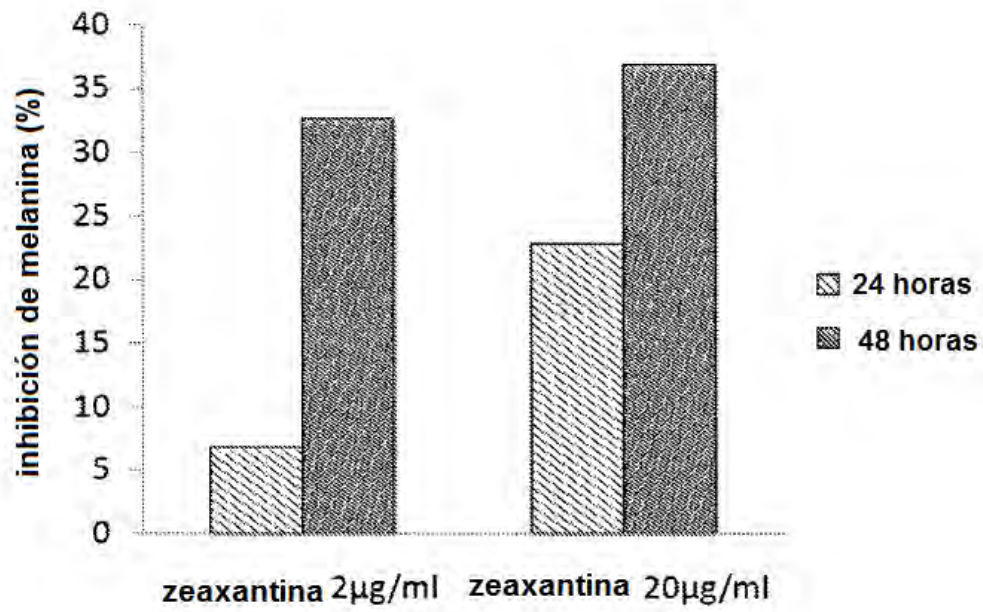


FIG. 9

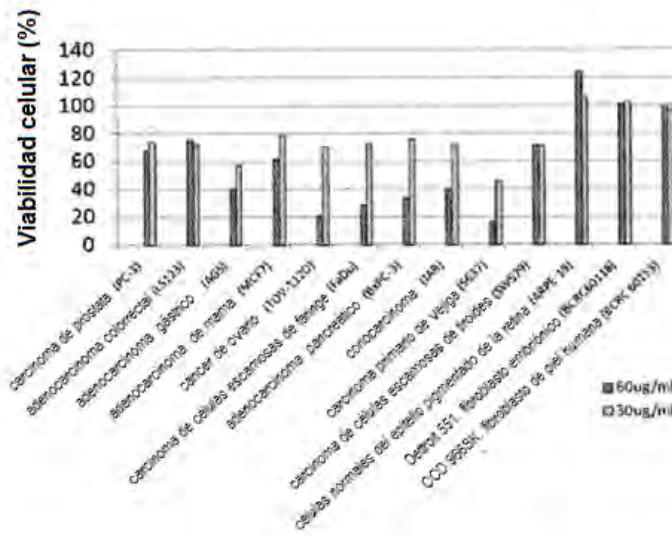


FIG. 10