

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 910**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/99** (2007.01)

**A61Q 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2012 PCT/EP2012/052282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12703792 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2672954**

54 Título: **Principio activo obtenido biotecnológicamente en composiciones cosméticas útiles para proteger la piel de daños inducidos o producidos por radiaciones infrarrojas**

30 Prioridad:

**11.02.2011 EP 11382038**

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

**16.08.2017**

73 Titular/es:

**LABORATORIOS CINFA, S.A. (100.0%)  
Olaz Chipi 10 Polígono Areta  
31620 Huarte, ES**

72 Inventor/es:

**ELIZARI GALAR, MAIALEN;  
GARRE CONTRERAS, AURORA DEL CARMEN y  
DE CASTELLARNAU CASTELLÀ, CONXITA**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 629 910 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

Principio activo obtenido biotecnológicamente en composiciones cosméticas útiles para proteger la piel de daños inducidos o producidos por radiaciones infrarrojas

5

La invención se refiere al campo de productos cosméticos y/o dermatológicos, más particularmente a los destinados a la protección de la piel frente a la radiación solar. En particular, la invención se refiere al uso de un principio activo obtenido biotecnológicamente para la protección de la piel frente al daño celular causado por la radiación infrarroja, así como a composiciones cosméticas que lo comprenden.

10

**Antecedentes en la técnica**

Se conocen bien que la radiación solar daña la piel humana, por ejemplo causando un envejecimiento prematuro de la piel (es decir, fotoenvejecimiento). Este daño no resulta solo de la radiación ultravioleta (UV), sino también de longitudes de onda mayores, en particular radiación infrarroja cercana (radiación IRA, 760-1440 nm). Dado que la luz solar natural es policromática, sus mayores efectos en la piel humana son el resultado no solo de la acción de cada longitud de onda por separado, sino también de interacciones entre numerosas longitudes de onda, que incluyen UV, luz visible, e infrarrojo (IR).

15

20 Los protectores solares son los protectores principales frente a la radiación solar. Pueden reflejar, absorber o dispersar la luz solar, protegiendo la piel de los efectos perjudiciales del sol. Los tratamientos fotoprotectores solares protegen y previenen el daño en la piel que resulta de la radiación solar. Los fotoprotectores clásicos solo protegen frente a UVB y UVA.

25 La luz UV es responsable de la destrucción de las fibras de colágeno y de la producción de fibras elásticas anómalas. También estimula alteraciones en la microvascularización dérmica. Dependiendo de la intensidad de los rayos, la piel puede padecer degeneración en su estructura y anomalías en su proceso de pigmentación normal. Además, la formación de radicales libres tiene un importante papel en el fotoenvejecimiento.

30 La luz UVB causa daños en el ADN pero también inhibe la reparación del ADN. Como consecuencia de los daños en el ADN, se produce la regulación positiva de IL-10 que, a su vez, conduce a la inhibición de la formación de IL-12. La IL-12 es uno de los protagonistas principales implicados en la orquestación de las respuestas inmunes. El mantenimiento del equilibrio IL10/IL12 es un requisito previo para contrarrestar el fotoenvejecimiento y las fotelesiones crónicas. En particular, la exposición intensa de la piel a la radiación UV conduce a modificaciones mutagénicas de bases del ADN, en particular, a la dimerización de timidina por cicloadición entre dos elementos de timidina adyacentes en el ADN. Este cambio en la estructura del ácido nucleico puede conducir a la muerte de la célula o a heredar el daño celular. El mecanismo natural de reparación del ADN de las células basado en una secuencia de reacciones controlada enzimáticamente con el fin de cortar los dímeros de timidina fuera de la hebra de ADN y reemplazar estos por monómeros de timidina posee únicamente una capacidad limitada.

40

Por lo tanto, un protector solar eficaz debe prevenir de las quemaduras pero también minimizar el daño en la piel debido a una acumulación de la radiación recibida. Existen principalmente tres tipos de filtros empleados en fotoprotección: filtros físicos, químicos y biológicos. Los filtros físicos son polvos inorgánicos o inertes de partículas pequeñas de aproximadamente 180-190 nm de diámetro, compuestos por TiO<sub>2</sub>, ZnO, óxido ferroso, MgO, mica o talco. Actúan reflejando las radiaciones solares independientemente de su longitud de onda. Los filtros químicos son compuestos químicos sintéticos que actúan absorbiendo la radiación solar. Funcionan como cromóforos que absorben la energía aportada por un fotón incidente, a continuación vuelven a su estado inicial y liberan el exceso de energía en forma de calor (inapreciable), radiación fluorescente o transformación química en un fotoproducto isómero potencialmente reactivo. Los filtros biológicos son sustancias con actividad antioxidante que, cuando se aplican por vía tópica, reducen el estrés oxidativo inducido por la radiación UV. Mejoran la protección de los protectores solares tradicionales al disminuir el daño celular que podría ser la causa de fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Son vitaminas (A, C o E), flavonoides (quelantes de Fe) o ciertos oligoelementos (actividad enzimática). Los antioxidantes son moléculas que actúan neutralizando algunos de los radicales libres resultantes que se generan por el daño UV y conducen a la descomposición del colágeno, y por lo tanto el antioxidante disminuye o previene los

45

50 signos del fotoenvejecimiento en la piel.

55 El documento de solicitud de patente Europea EP43128 desvela el uso de un lisado de microorganismo tal como un lisado de *Bifidobacterium longum*, para estimular la reparación del ADN en células de piel dañadas por exposición a radiación ultravioleta. Se ha mostrado que inhiben la liberación del inmunosupresor IL-10, que simultáneamente previene la inhibición de IL-12, y permite aumentar la capacidad de reparación del ADN propia del cuerpo de las células de la piel.

60 Con el fin de conseguir una protección completa frente a los efectos perjudiciales acumulativos de la exposición solar, las estrategias tópicas deberían proteger frente al intervalo de longitudes de onda solares que pueden dañar la piel. De forma importante, el perjuicio sostenido en la piel no se limita al causado por la parte ultravioleta (UV) del

65

espectro de luz, sino también incluye los efectos adversos infligidos por la energía infrarroja cercana.

La radiación infrarroja A (radiación IRA) supone más de la tercera parte de la energía solar que alcanza la piel humana. Esta radiación IRA se considera la mayor amenaza que proviene del sol debido a su capacidad para penetrar hasta la capa más profunda de la piel. Las radiaciones IRB e IRC son responsables de su efecto térmico. Mientras que la radiación infrarroja de longitudes de onda mayores (IRB e IRC) no penetran profundamente en la piel, más de un 65 % de la longitud de onda menor (IRA) alcanza la dermis.

Hasta hace relativamente poco se creía que el efecto IRA en la piel era térmico produciendo vasodilatación y enrojecimiento, pero estudios recientes muestran que su profunda penetración produce un ataque directo a las mitocondrias celulares, responsables del suministro de energía de la célula, produciendo un aumento de radicales libres, especialmente especies reactivas de oxígeno (ROS), que producen efectos biológicos perjudiciales en las células de la piel. Se ha indicado que IRA tiene una contribución considerable en las quemaduras solares, los daños en el ADN y el envejecimiento prematuro de la piel. También parece que el cáncer de piel no solo es consecuencia de la exposición a la radiación UV, sino el resultado de las quemaduras solares mediante estrés oxidativo (véanse Zastrow L. *et al.* "The Missing Link-Light-Induced (280-1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin", *Skin Pharmacol and Physiol* 2009, vol. 22, pp. 31-44, o Darvin M.E. *et al.* "Radical Production by Infrared A Irradiation in Human Tissue", *Skin Pharmacol and Physiol* 2010, vol. 23, pp. 40-46).

Cuando se acumulan radicales libres en la célula, como consecuencia de la respuesta al estrés oxidativo mitocondrial inducido por IRA, se producen un aumento en la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMP) y una reducción en la síntesis de colágeno y elastina. De ese modo, la radiación IRA altera el equilibrio del colágeno de la matriz extracelular dérmica al menos de dos formas: (a) conduciendo a un aumento de la expresión de la enzima de degradación de colágeno metaloproteinasa 1 de la matriz (MMP-1), y (b) disminuyendo la nueva síntesis del propio colágeno. Por lo tanto, la exposición a radiación IRA induce efectos biológicos similares a los de la radiación UV, pero los mecanismos subyacentes son básicamente diferentes, específicamente, la respuesta celular a la irradiación con IRA implica la cadena de transporte de electrones mitocondrial y una respuesta señalizadora, que genera ROS. P. Schroeder *et al.*, en "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling", *Free Radic. Biol. Med.* 2007, vol. 43, pp. 128-135 explican que las ROS derivadas de mitocondrias no están implicadas en la expresión de MMP-1 inducida por radiación UVA o UVB debido a que la coenzima Q10 dirigida mitocondrial o la manipulación de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial no se vieron afectadas por estas respuestas. Varios estudios indican que el inductor principal de generación y acumulación celular de ROS es el aumento de la temperatura intracelular causada por la radiación IRA.

De ese modo, además de filtros solares para bloquear los efectos de UV o moléculas para ayudar a reparar el ADN dañado debido a la radiación UV, es necesario desarrollar nuevas estrategias para bloquear daños por IR y calor, en particular el fotoenvejecimiento de piel inducido por IR y calor, para prevenir de forma más completa el fotoenvejecimiento de la piel, en particular, para prevenir o retrasar los signos cutáneos de fotoenvejecimiento. Los antioxidantes tales como carotenoides, flavonoides o vitaminas, son eficaces frente al estrés oxidativo, pero solos no son eficaces frente a IRA.

El documento de Patente EP2233127 desvela el uso de varios antioxidantes para la preparación de una composición farmacéutica o cosmética para la protección de la piel frente al daño por radiación infrarroja. Entre ellos se enumeran los siguientes: N-acetilcisteína, vitamina E, ácido de café, éster de ácido de café, [beta]-caroteno, Emblica, derivados de vitamina C, extracto verde favorecedor, extracto blanco noble, Luteína, Licopeno, extracto de pepitas de racimo de uvas, extracto de Achicoria, Curcumina, Silimarina, Apigenina y Resveratrol.

El documento de Patente WO 98/01107 desvela una composición cosmética para la hidratación de la piel y la protección frente a radiación UV e IR que comprende intervalos específicos de varios componentes. Entre estos componentes se encuentra un pigmento mineral, que es básicamente dióxido de titanio micronizado, que se cita que ejerce una función protectora frente a IR.

De ese modo, a partir de lo que se conoce en la técnica, se obtiene que aún permanece la necesidad de proporcionar nuevas moléculas capaces de interferir con y/o prevenir los efectos perjudiciales de la radiación infrarroja A (IRA).

### Resumen de la invención

Los inventores han descubierto, inesperadamente, que un lisado de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, demuestra ser eficaz en la prevención y/o el tratamiento del fotoenvejecimiento de la piel inducido o producido por radiación infrarroja. Este descubrimiento se basa en la demostración por parte de los inventores de la capacidad de un lisado de *Bifidobacterium longum* de disminuir la generación de ROS inducida directamente por la temperatura después de diferentes tiempos de exposición y de inhibir la producción de MMP-1. Muestra un efecto antioxidante frente a la radiación IRA. Como consecuencia, tiene la capacidad de proteger frente al daño celular producido por radiación IRA, lo que significa la protección de la piel frente al fotoenvejecimiento.

Un lisado específico de *Bifidobacterium longum* se comercializa con nombre Repair Complex CLR por la compañía K. Richter GmbH. Repair Complex se refiere a un lisado registrado con el nombre INCI: *lisado de fermento Bifidat*, con el nombre EINECS: *Bifidobacterium longum*, con el n.º EINECS: 306-168-4 y con el n.º CAS: 96507-89-0. Es un extracto de *Bifidobacteria*, que contiene productos de metabolitos, fracciones de citoplasma, constituyentes de la pared celular, así como complejos de polisacáridos. Se comercializa conservado en parabeno (Repair Complex) o exento de parabeno (Repair Complex PF, RCPF).

Por lo que consta a los presentes inventores, nunca se ha descrito esta eficacia de un lisado de un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular de un lisado de *Bifidobacterium longum*, y más en particular el producto Repair Complex, en la protección frente al daño en las células de la piel producidos por la radiación IRA.

Se conoce un lisado de *Bifidobacterium longum* del documento de Patente EP43128, pero solo con el fin de estimular la reparación del ADN de las células de la piel dañadas por exposición a radiación UV. Ya se conocen otros usos del producto. Por ejemplo, el documento de Patente WO2009/053564 (o FR2920306 de la misma familia) describe su uso para prevenir o tratar signos de envejecimiento cronológico en la piel y trastornos causados por el estrés oxidativo generado por un oxidante medioambiental tal como oxígeno, ozono y/o óxidos de nitrógeno y azufre, así como una composición que comprende un lisado de *Bifidobacterium*. El documento de solicitud de Patente de Estados Unidos US20090060962 describe su uso para tratar y/o prevenir sequedad y/o trastornos asociados a una sustancia queratinosa. También se describe su uso en la prevención y/o reducción de arrugas relacionadas con la sequedad cutánea. El documento de solicitud de Patente de Estados Unidos US20090068610 describe el uso del lisado de *Bifidobacterium longum* Repair Complex CLR para prevenir y/o tratar trastornos de la piel que tienden a manifestarse en una piel denominada piel sensible.

Finalmente, también se conocen en la técnica otras composiciones que comprenden un lisado de *Bifidobacterium*. El documento de Patente FR2937534 desvela una composición cosmética y/o dermatológica, que incluye al menos, en un medio fisiológicamente aceptable, un extracto de orquídea, biotina o un derivado de biotina y un lisado de *Bifidobacterium*.

Sin embargo, ninguno de estos documentos desvela la aplicación de un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, y aún menos de un lisado de acuerdo con la invención, como principio activo con efecto protector frente al daño en las células de la piel producidos por la radiación IRA.

De ese modo, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de signos cutáneos del fotoenvejecimiento inducidos o producidos por radiación infrarroja.

Esta sustancia biológica se puede combinar con filtros físicos, químicos, organominerales, y/o biológicos con el fin de proporcionar un fotoprotector de amplio espectro que evite el fotoenvejecimiento, permitiendo la exposición a la radiación solar con menos riesgo. Se desvela una composición, preferentemente una composición cosmética, que comprende un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, y al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en físico, químico, organomineral, biológico, y las combinaciones de los mismos, preferentemente en una cantidad de un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para aplicación tópica a la piel de una persona.

Mediante la aplicación de estas composiciones cosméticas se consigue una protección completa frente a los efectos perjudiciales acumulativos de la exposición solar, retrasando el proceso de envejecimiento de la piel causado por la luz, lo que imparte a estas composiciones un alto valor práctico desde el punto de vista cosmético. Por lo tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una cantidad eficaz de un lisado como se ha definido anteriormente, en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en un filtro físico, químico, organomineral, biológico, y las combinaciones de los mismos en una cantidad de un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducidos o producidos por radiación UV e IRA, en particular, radiación IRA.

Se desvela un método, en particular un método cosmético, para prevenir y/o tratar las células de la piel del daño por exposición a radiación IR, en particular a radiación IRA, que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables apropiados para aplicación tópica a la piel de una persona, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

También se considera como parte de la invención un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular, radiación IRA. El daño en las células de la

piel es el daño que se produce en la piel por una exposición prolongada a radiación IRA. Más particularmente, el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación IR, en particular radiación IRA.

- 5 También es parte de la invención la provisión de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular radiación IRA o radiación UV. Más particularmente, el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento inducido o  
 10 producido por radiación IR, en particular radiación IRA, y radiación UV. En ese caso el daño en las células de la piel es el daño que se produce en la piel por una exposición prolongada a radiación IR y radiación UV.

- En una realización particular, la prevención y/o el tratamiento comprende disminuir la generación de ROS inducida directamente por radiación IR, en particular radiación IRA. Comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado  
 15 de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables apropiados para aplicación tópica a la piel de una persona, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

- En una realización particular, la prevención y/o el tratamiento comprende inhibir la producción de MMP-1 inducida por radiación IR, en particular radiación IRA. Comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos  
 20 un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

## 25 Breve descripción de las figuras

- La Figura 1A muestra el efecto global de los controles a diferentes temperaturas (37 °C y 42 °C) en la medición del efecto directo del aumento de temperatura en la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos y la comparación con el estímulo de oxidativo de hidropéroxido de terc-butilo (TBHP). "t" significa tiempo de  
 30 incubación, "ctrl" significa control y "sonda c" significa la sonda sensible a ROS carboxi-H<sub>2</sub> DCFDA, C400 de Molecular Probes.

- La Figura 1B muestra el aumento relativo de ROS por el estrés térmico o el estímulo oxidativo (TBHP) en fibroblastos humanos después de incubar las células a 42 °C con respecto a su valor a 37 °C. "t" significa tiempo de  
 35 incubación, "ctrl" significa control, "X veces de incremento de ROS" significa las veces de incremento de ROS frente al control.

- La Figura 2A muestra la medición de la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 60 minutos en respuesta a varias concentraciones de RCPF y Trolox (100 µM). "Ctr" significa el control, RCPF significa el lisado de *Bifidobacterium longum* denominado Repair Complex PF. Trolox es un antioxidante de referencia y "sonda c" significa la sonda sensible a ROS carboxi-H<sub>2</sub> DCFDA, C400 de Molecular  
 40 Probes.

- La Figura 2B muestra la medición de la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 120 min en respuesta a varias concentraciones de RCPF y Trolox.  
 45

La Figura 2C muestra la medición de la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 180 min en respuesta a varias concentraciones de RCPF y Trolox.

- La Figura 2D muestra la medición de la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 240 min en respuesta a varias concentraciones de RCPF y Trolox.  
 50

- La Figura 3 muestra una comparación entre la medición de la producción de ROS intracelulares en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 60, 120, 180 y 240 min en respuesta a varias concentraciones de RCPF y Trolox.  
 55

- La Figura 4 muestra el efecto de RCPF sobre la síntesis de MMP-1 en fibroblastos humanos incubados a 37 °C y a 42 °C durante 1 h, 2 h, 3 h, y 4 h y posteriormente inflamados con interleuquina 1β antes de la adición o no (medio C) de los productos estudiados. "t" significa tiempo de tratamiento (24 h) posterior a la incubación a 42 °C.  
 60

La Figura 5A muestra el efecto de RCPF sobre la síntesis de MMP-1 en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 1 h. Se usan 5 ng/ml de IL-1β como inductor positivo de la síntesis de MMP-1 en estos ensayos.

- La Figura 5B muestra el efecto de RCPF sobre la síntesis de MMP-1 en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 2 h. Se usan 5 ng/ml de IL-1β como inductor positivo de la síntesis de MMP-1 en estos ensayos.  
 65

La Figura 5C muestra el efecto de RCPF sobre la síntesis de MMP-1 en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 3 h. Se usan 5 ng/ml de IL-1β como inductor positivo de la síntesis de MMP-1 en estos ensayos.

5 La Figura 5D muestra el efecto de RCPF sobre la síntesis de MMP-1 en fibroblastos humanos incubados a 42 °C durante 4 h. Se usan 5 ng/ml de IL-1β como inductor positivo de la síntesis de MMP-1 en estos ensayos.

### Descripción detallada de la invención

10 Para los fines de la presente divulgación, el término "fotoenvejecimiento" se refiere a los efectos de la exposición de luz ultravioleta UV en la piel y/o la exposición de luz IR en la piel asociados a la formación de arrugas gruesas, pigmentación irregular de la piel, pérdida de elasticidad de la piel, alteración de las funciones de barrera de la piel, o una combinación de los mismos. De ese modo, los signos cutáneos de fotoenvejecimiento incluyen cambios de la pigmentación (pigmentación moteada), amarilleado, arrugas profundas, sequedad, telangiectasia, lesiones premalignas, laxitud, atrofia, aspecto de cuero, elastosis (un efecto basto, amarillo, empedrado de la piel), o púrpura  
15 actínica (amoratamiento fácil relacionado con fragilidad de la pared vascular en la dermis).

Para los fines de la presente divulgación, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad que es suficiente para obtener el efecto esperado.

20 Para los fines de la presente divulgación, el término "prevenir" significa reducir el riesgo de manifestación de un fenómeno.

Para los fines de la presente divulgación el término "tratar" significa compensar una disfunción fisiológica y más generalmente reducir o incluso eliminar un trastorno indeseable, cuya manifestación es especialmente una  
25 consecuencia de esta disfunción.

Para el fin de la invención, el término "cosmético" pretende indicar el uso destinado, principalmente, a proporcionar un efecto estético y/o de comodidad, en particular, mejorar el aspecto de la piel, específicamente las propiedades de la piel.  
30

Para el fin de la invención, la expresión "excipientes o vehículos cosméticamente aceptables" se refiere a los excipientes o vehículos adecuados para su uso en contacto con la piel humana sin una indebida toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, o respuesta alérgica, entre otras.

35 Todos los porcentajes mencionados en el presente documento son en peso.

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto de la presente invención es la provisión de una cantidad eficaz de un lisado de al menos una especie del género *Bifidobacterium*, en particular, *Bifidobacterium longum* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o provocado por radiación  
40 IR, en particular radiación IRA. También se puede formular en forma de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación IR, en particular, radiación IRA, y en particular, en el que el uso es cosmético, es decir, para fines cosméticos. En una realización preferente de este aspecto, el lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium* es parte formadora de una composición  
45 cosmética. Se desvela un método cosmético para prevenir y/o tratar los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación IR, en particular, radiación IRA, que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables apropiados para aplicación tópica a la piel de una persona, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.  
50

En una realización preferente, el uso es para la prevención de signos cutáneos de fotoenvejecimiento.

Para los fines de la invención, un "lisado" representa convencionalmente un material obtenido después de la destrucción o disolución de células biológicas a través de un fenómeno conocido como lisis celular, dando lugar de  
55 ese modo a la liberación de los constituyentes biológicos intracelulares contenidos de forma natural en las células del microorganismo en consideración. Para los fines de la presente invención, el término "lisado" se usa sin preferencia para indicar el lisado completo obtenido a través de la lisis del microorganismo en consideración o solo una fracción del mismo.

60 De ese modo, el lisado está formado total o parcialmente a partir de constituyentes biológicos intracelulares y a partir de los constituyentes de las paredes y membranas celulares. Esta lisis celular se puede conseguir mediante diversas técnicas, tales como un choque osmótico, un choque térmico, mediante aplicación de ultrasonidos, o alternativamente con un estrés mecánico de tipo centrifugación. Más particularmente, este lisado celular se puede obtener de acuerdo con la tecnología que se describe en los documentos de Patente US 4464362, y EP 43128. El  
65 microorganismo de las especies de *Bifidobacterium* del tipo considerado se puede cultivar de forma anaerobia en un

medio de cultivo adecuado, por ejemplo de acuerdo con las condiciones que se describen en los documentos de Patente US 4464362, y EP 43128. Cuando se alcanza la fase estacionaria desarrolló, el medio de cultivo se puede inactivar por pasteurización, por ejemplo, a una temperatura de 60 a 65 °C durante 30 min. A continuación, los microorganismos se recogen mediante una técnica de separación convencional, por ejemplo filtración de membrana, 5 centrifugación y resuspensión en una solución de NaCl fisiológica estéril. El lisado se puede obtener mediante disgregación ultrasónica de dicho medio con el fin de liberar sus fracciones citoplasmáticas, los fragmentos de la pared celular y los productos resultantes del metabolismo. A continuación, todos los componentes en su distribución natural se estabilizan en una solución acuosa débilmente ácida.

10 De este modo, se obtiene generalmente un lisado que tiene una concentración del orden de un 0,1 a un 50 %, en particular de un 1 a un 20 % y en particular aproximadamente un 5 % en peso de sustancias activas con respecto a su peso total.

El lisado se puede usar de diversas formas, en forma de una solución o en forma pulverulenta.

15 El microorganismo que pertenece a las especies del género *Bifidobacterium* se selecciona entre las especies: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatemulation*, y las mezclas de las mismas.

20 La especie preferente es *Bifidobacterium longum*, que resulta ser particularmente adecuada para los fines de la invención.

El producto comercializado con el nombre Repair Complex CLR® se incluye en el contexto de la divulgación. De acuerdo con la información del proveedor, Repair Complex CLR PF se obtiene por fermentación de la especie "longum". Después de que se complete el crecimiento, las bacterias se disgregan por medio de ultrasonidos liberando de ese modo las fracciones citoplasmáticas y los constituyentes de la pared celular. Después de la disgregación celular, ninguna fracción queda sin aislar, asegurando de este modo la presencia de todos los constituyentes en su distribución natural en el producto Repair Complex CLR PF. Se pueden usar ambos, el 25 comercializado en forma CLR conservado en parabenos o el comercializado exento de parabenos, para los fines de la presente invención.

El lisado de *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, se puede formular en una composición de acuerdo con la presente invención en una cantidad de un 0,1-10 % en peso basado en el peso total de la 35 composición. Preferentemente, en una cantidad de un 0,5-5 % en peso basado en el peso total de la composición. Más preferentemente, en una cantidad de un 0,5-4 % en peso basado en el peso total de la composición. Incluso más preferentemente, en una cantidad de un 0,5-3 % en peso basado en el peso total de la composición. Incluso aún más preferentemente, en una cantidad de un 0,5-1 % en peso basado en el peso total de la composición.

40 Todos los porcentajes mencionados en el presente documento son porcentajes en peso a menos que se indique otra cosa.

También puede ser deseable incluir uno o más protectores solares en una composición que comprende el lisado de las especies del género *Bifidobacterium*, preferentemente *Bifidobacterium longum*. Este lisado se puede combinar 45 con filtros de UVA o UVB, con el fin de proporcionar un fotoprotectores de amplio espectro. La composición cosmética se puede usar para la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiaciones UV e IR, en particular radiaciones UVA, UVB e IRA. Como se ha mencionado anteriormente, los signos cutáneos de fotoenvejecimiento incluyen cambios en la pigmentación, amarilleado, arrugas profundas, sequedad, telangiectasia, lesiones premalignas, laxitud, atrofia, aspecto de cuero, elastosis, o púrpura 50 actínica, entre otras.

Se considera parte de la invención la provisión de una cantidad eficaz de un lisado de al menos una especie del género *Bifidobacterium*, en particular, *Bifidobacterium longum*, en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y 55 las combinaciones de los mismos, en una cantidad de un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiaciones UV e IR, en particular radiaciones UVA, UVB e IRA, y en particular, en el que el uso es cosmético. Eso significa que el lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en 60 combinación con al menos un filtro frente a radiación solar forman parte de una composición cosmética. Se desvela un método cosmético para prevenir y/o tratar los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiaciones UV e IR, en particular radiaciones UVA, UVB e IRA que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel 65 de un paciente, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

De forma ventajosa, la inclusión de protectores solares en una composición que comprende el lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium* proporciona protección adicional para la piel expuesta a la radiación solar. Se desvela una composición que consiste en un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, y al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que  
5 consiste en físico, químico, organomineral, biológico, y las combinaciones de los mismos, preferentemente en una cantidad de un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona.

En la composición de la invención, también se pueden usar excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

10

Los filtros orgánicos, por ejemplo, se pueden seleccionar entre los aprobados por la Consejo de las Comunidades Europeas (texto revisado de la versión consolidada de la Directiva Europea 76/768/EEC, Anexo VII páginas 121-126, publicado el 24-04-2008). Los filtros inorgánicos se pueden seleccionar entre un grupo que incluye: óxidos metálicos tales como pigmentos, nanopigmentos, tratados y sin tratar, tales como dióxido de titanio (amorfo o cristalino), hierro,  
15 cinc, circonio o cerio.

Si estuvieran presentes, la cantidad de los filtros orgánicos e inorgánicos en la composición cosmética que se desvela en el presente documento puede variar de aproximadamente un 0,1 % a un 50 %. Generalmente, la cantidad de los filtros orgánicos e inorgánicos en la composición cosmética está entre un 29 % y un 50 % en peso de  
20 la composición total. En una realización preferente, la cantidad de los filtros orgánicos e inorgánicos en la composición cosmética está entre un 29 % y un 35 % en peso de la composición total.

De ese modo, la composición puede comprender uno o más protectores de UVA. La expresión "protector de UVA" significa un compuesto químico que bloquea la radiación UV en la longitud de onda de aproximadamente 320-  
25 440 nm. Algunos ejemplos de protectores solares de UV son 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (oxibenzona, nombre INCI: benzofenona-3); 3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis [7,7-dimetil-2-oxo-biciclo-(2,2,1) hept-1-il metansulfónico] o sus sales cosméticamente aceptables (nombre INCI: ácido tereftalidendialcanforsulfónico); 1-(4-terc-butil-fenil)-3-(4-metoxifenil)propan-1,3-diona (nombre INCI: butil metoxidibenzoil metano); fenol, 2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)-disiloxani)propilo) (nombre INCI: drometrisol trisiloxano); ácido 2-hidroxi-  
30 4-metoxibenzofenona-5-sulfónico o su sal sódica (nombre INCI: benzofenona-4 o sulisobenzona); 2,2'-metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol (nombre INCI: metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol); sal monosódica del ácido 2-2'-bis-(1,4-fenileno)1H-benzoimidazol-4,6-disulfónico (nombre INCI: fenil dibenzoimidazol tetrasulfonato disódico); (1,3,5)-triazin-2,4-bis[[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidroxi]-fenil]-6-(4-metoxifenilo) (nombre INCI: bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina); o éster de hexilo del ácido 2-(4-(diethylamino)-2-hidroxibenzoil)-benzoico  
35 (nombre INCI: dietilamino hidroxibenzoil benzoato de hexilo). Si estuviera presente, el protector de UVA puede variar de aproximadamente un 0,01 % a un 20 %, preferentemente, de un 1 a un 10 %, más preferentemente, de un 2 a un 5 %, en peso de la composición total.

Preferentemente, la composición cosmética usada para los fines de la invención comprende como filtros de UVA  
40 butil metoxidibenzoil metano, metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, bis-etilhexiloxifenol metoxi fenil triazina, o las combinaciones de los mismos. Generalmente, la cantidad de butil metoxidibenzoil metano está comprendida entre un 1-5 % en peso de la composición total. Además, generalmente, las cantidades de metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol y de bis-etilhexiloxifenol metoxi fenil triazina están comprendidas entre un 1-10 % en peso de la composición total.

45

La composición también puede comprender uno o más protectores de UVB. La expresión "protector de UVB" significa un compuesto químico que bloquea la radiación UV en la longitud de onda de aproximadamente 290 a 320 nm. Existe una diversidad de protectores solares químicos de UVB y se puede usar para los fines de la presente invención. Algunos ejemplos de protectores solares de UVB son varios ésteres del ácido alfa-ciano-beta,beta-difenil  
50 acrílico tales como 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexilo (nombre INCI: octocrileno). Otros protectores solares de UVB adecuados son derivados de bencilidenalcanfor tales como 3-4'-metilbenciliden)-d-l-alcanfor (nombre INCI: 4-metilbencilidenalcanfor) o 3-bencilidenalcanfor; derivados de cinamato tales como 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo (nombre INCI: metoxicinamato de etilhexilo); 4-metoxicinamato de isopentilo (nombre INCI: p-metoxicinamato de isoamilo); derivados de benzofenona tales como oxibenzona o sulisobenzona, o sulisobenzona sódica; derivados de salicilato tales como salicilato de 2-etilo (nombre INCI: salicilato de etilhexilo), salicilato de 3,3,5-trimetilciclohexilo (nombre INCI: homosalato); diversos derivados del ácido aminobenzoico tales como ácido p-aminobenzoico (nombre INCI: PABA), 4-dimetil-amino-benzoato de etil-2-hexilo (nombre INCI: etilhexil dimetil PABA), benzoato de 4,4-((6-(((1,1-dimetiletil)amino)carbonil)fenil)amino) 1,3,5-triazin-2,4-di)diimino)bis-,bis(2-etilhexilo) (nombre INCI: dietilhexil butamido triazona); drometrisol trisiloxano; bis-etilhexiloxifenol metoxi fenil triazina; o 2,4,6-trianilino-p-(carbo-2'-etilhexil-1'oxi)-1,3,5-triazina (nombre INCI: etilhexil triazona). Si estuviera presente, el protector de UVB puede variar de aproximadamente un 0,01 % a un 20 %, preferentemente, de un 1 a un 10 %, más preferentemente, de un 2 a un  
60 5 %, en peso de la composición total.

Preferentemente, la composición cosmética usada para los fines de la invención comprende como protectores de  
65 UVB octocrileno, metoxicinamato de etilhexilo, dietilhexil butamido triazona o las combinaciones de los mismos.

Generalmente, el contenido de octocrileno está comprendido entre un 1 y un 10 % en peso de la composición total, preferentemente un 6-10 % en peso de la composición total. Generalmente, la cantidad de metoxicinamato de etilhexilo está comprendida entre un 5-10 % en peso de la composición total. Generalmente, la cantidad de dietilhexil butamido triazona está comprendida entre un 1-10 % en peso de la composición total.

- 5 Los protectores preferentes de acuerdo con la invención son dietilhexil butamido triazona, octocrileno, metoxicinamato de etilhexilo, butil metoxidibenzoilmetano, dietilamino hidroxibenzoil benzoato de hexilo, o salicilato de etilhexilo.
- 10 Las composiciones usadas para los fines de la invención se pueden formular para que tengan ciertos valores del factor de protección solar (SPF) que varían de aproximadamente 1-50, preferentemente 2-45, más preferentemente 5-30. El SPF indica el aumento de tiempo en que la piel puede estar expuesta al sol sin padecer efectos adversos: enrojecimiento, eritema y quemaduras. El cálculo de los valores de SPF se conoce bien en la técnica.
- 15 Si estuviera presente, un protector físico preferente de acuerdo con la invención es dióxido de titanio micronizado.
- Si estuvieran presentes, los filtros organominerales preferentes incluyen metilen-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (tinosorb® m) o bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (tinosorb® s).
- 20 Si estuvieran presentes, los protectores biológicos preferentes son sustancias con actividad antioxidante tales como vitaminas (A, C o E), flavonoides (quelantes de Fe) y otros oligoelementos (actividad enzimática). Los filtros biológicos más preferentes son vitaminas (A, C, o E).
- En una realización particular, las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden el lisado de
- 25 *Bifidobacterium longum* en combinación con al menos un filtro químico y al menos un filtro organomineral. En otra realización particular, la composición usada para los fines de la invención comprende además al menos un filtro físico. Preferentemente, los filtros químicos y organominerales se seleccionan entre los mencionados anteriormente.
- En otra realización particular, las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden el lisado de
- 30 *Bifidobacterium longum* en combinación con al menos un filtro químico y al menos un filtro físico. Preferentemente, los filtros químicos y físicos se seleccionan entre los mencionados anteriormente.
- En una realización preferida, la combinación comprende el lisado de *Bifidobacterium longum* en combinación con metoxicinamato de etilhexilo, octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano, dietilhexil butamido triazona, y bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina.
- 35
- Las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden excipientes o vehículos adicionales apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona.
- 40 Entre estos excipientes o vehículos, son preferentes los siguientes: agentes hidratantes tales como extracto de lichi; agentes emolientes; agentes antioxidantes tales como extracto de argán, acetato de vitamina E, o aceite de té verde; agentes revitalizantes tales como proteína de arroz, elevadores del SPF tales como derivados de proteínas de trigo o aminoácidos con compatibilidad cutánea; polímeros resistentes al agua; conservantes; emulgentes; siliconas volátiles; agentes gelificantes tales como goma de xantano o goma de esclerocio; perfumes; o colorantes.
- 45
- Las composiciones cosméticas usadas para los fines de la invención pueden estar en forma de una emulsión, crema, leche, loción, ungüento, barra sólida, espuma, pulverización, aceite, pomada y fluido, entre otros. Pueden estar en forma anhidra, en una solución acuosa, en forma de suspensión, o en forma de emulsión de agua en aceite o aceite en agua.
- 50
- En general, cualquier composición usada para los fines de la invención se puede aplicar a la piel, en cualquier parte de la piel, en cualquier parte del cuerpo.
- Las composiciones usadas para los fines de la presente invención se vuelven preferentes antes, durante o después
- 55 de una irradiación de la piel con IR.
- Se desvela un método, para prevenir y/o tratar células de la piel del daño por exposición a radiación IR, en particular radiación IRA, es decir, daños celulares inducidos o producidos por radiación IRA, que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento. Se pueden usar vehículos o excipientes cosmética o farmacéuticamente aceptables. Más particularmente, el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación IRA.
- 60
- 65 También se desvela que el método comprende además prevenir y/o tratar las células de la piel del daño por

exposición a radiación UV, por administración del lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium* en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos.

- 5 El método comprende una administración individual o una administración repetida dependiendo del tiempo de exposición a la luz solar.

En una realización particular, la prevención y/o el tratamiento comprenden proteger la piel de los daños inducidos o producidos por la exposición a radiación IR, en particular a radiación IRA.

10

En una realización particular, la prevención y/o el tratamiento comprenden disminuir la generación de ROS inducida directamente por radiación IRA. En otra realización particular del método, la prevención y/o el tratamiento comprenden inhibir la producción de MMP-1 inducida por radiación IRA.

- 15 Este aspecto de la invención y las correspondientes realizaciones se pueden formular como un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular, radiación IRA. El daño en las células de la piel es el daño que se produce en la piel por una exposición prolongada a radiación IRA. Más particularmente, el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación

- 20 IR, en particular radiación IRA. También se pueden formular como el uso de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, para la preparación de una composición para la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular, radiación IRA.

- 25 También es parte de la invención la provisión de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular radiación IRA y radiación ultravioleta. Más particularmente, el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento

- 30 inducido o producido por radiación IR, en particular radiación IRA y radiación UV. En ese caso el daño en las células de la piel es el daño que se produce en la piel por una exposición prolongada a radiación IR y radiación UV. Este aspecto también se puede formular como el uso de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, para la preparación de una composición para la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación IR, en particular, radiación

- 35 IRA y radiación UV.

En una realización preferente, el lisado de al menos un microorganismo es un lisado de *Bifidobacterium longum*.

En otra realización preferente, el uso es para la prevención de daño en las células de la piel.

40

En otra realización preferente, la cantidad eficaz del lisado está comprendida entre un 0,1-5 % en peso basado en el peso total de una composición que lo comprende. En una realización más preferente, la cantidad eficaz del lisado está comprendida entre un 0,5-3 % en peso basado en el peso total de una composición que lo comprende. En una realización aún más preferente, la cantidad eficaz del lisado está comprendida entre un 0,5-1 % en peso basado en el peso total de una composición que lo comprende.

45

También se considera parte de la invención un método para disminuir la generación de ROS inducida directamente por radiación IRA, que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

50

Finalmente, también se desvela un método para inhibir la producción de MMP-1 inducido por radiación IRA, que comprende administrar una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables, a un sujeto con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

55

En la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, no se pretende que excluyen otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Los objetivos, ventajas y características adicionales de la invención se volverán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción y se pueden aprender poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de

60

ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferentes que se describen en el presente documento.

## ES 2 629 910 T3

### Ejemplos

Repair Complex PF o RCPF se usa indistintamente para indicar el compuesto Repair Complex exento de parabenos.

#### 5 Ejemplo 1: Crema facial para piel seca con SPF 20

Se usaron los siguientes ingredientes:

Código de ingrediente	Nombre INCI	% en peso
1	Salicilato de etilhexilo	5
2	Octocrileno	10
3	Butil metoxidibenzoilmetano	4
4	Metoxicinamato de etilhexilo	8
5	Adipato de dibutilo	3
6	Poliisobuteno hidrogenado	2
7	Dietilhexil butamido triazona	3
8	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenilo triazina	2,5
9	Alcohol cetearílico (y) cocoglucósido	1
10	Alcoholes C <sub>20-22</sub>	3
	Fosfato de alquilo C <sub>20-22</sub>	
11	Copolímero de VP/Eicoseno	2,5
12	Aqua (Agua)	47,025
13	Goma de esclerocio	4
	Aqua (Agua)	
	Fenoxietanol	
14	Aqua (Agua)	0,5
	Etilendiamina tetrametilfosfonato pentasódico	
15	Trometamina	0,375
16	Etilhexilglicerina	1
	Fenoxietanol	
17	Lisado de fermento de Bifida	1
	Fenoxietanol	
	Benzoato sódico	
18	Perfume	0,1
19	AEDT	2
	Etilhexilglicerina	
	Sorbato potásico	
	Proteína de trigo hidrolizada/crospolímero de PVP	
	Fenoxietanol	
	Aqua(Agua)	
	Total:	100

Cuando un código de ingrediente tiene más de un componente es debido a que este ingrediente es una mezcla de varios componentes.

La preparación de la composición se efectuó por combinación de los ingredientes 1-6 a 70 °C ± 10 °C. Posteriormente, se añadió el ingrediente 7 con agitación, y a continuación se añadió el ingrediente 8 también con agitación. Una vez se obtuvo una solución transparente, se añadieron los ingredientes 9 y 10. Una vez se obtuvo una solución transparente se añadió el ingrediente 11. Se calentó el ingrediente 12 (agua) a 70 °C ± 10 °C y se añadió el ingrediente 13 con agitación. A esta fase acuosa se añadieron los ingredientes 14 y 15. A continuación, ambas fases se homogeneizaron y se enfriaron a 40 °C. A esa temperatura se añadieron los ingredientes 16, 17, 18, y 19.

## Ejemplo 2: evaluación de la eficacia del producto Repair Complex PF (RCPF) como protector frente a radiación IRA

Se llevó a cabo una reproducción de la situación celular inducida por IRA por inducción de ROS unido al aumento de la temperatura celular. Se conoce que existe una relación proporcional entre el tiempo de exposición a la radiación IRA y el aumento en la generación de ROS. Cuanto mayor es la exposición a IRA, mayor es el aumento de la temperatura de la piel y de la generación de ROS. De ese modo, se llevó a cabo una simulación *in vitro* de las condiciones de estrés térmico análogas a las producidas por la radiación IRA en un modelo de fibroblastos dérmicos humanos (HDF). El ensayo se llevó a cabo con fibroblastos dérmicos humanos a una temperatura constante de 42 °C en presencia y ausencia del lisado de *Bifidobacterium longum* (el producto comercial denominado Repair Complex PF, RCPF) y con controles celulares mantenidos a 37 °C.

El efecto protector se determinó por medición de la producción intracelular de ROS como consecuencia de un efecto indirecto de aumento de temperatura que sería causado por la radiación IRA, y por determinación de los niveles de síntesis de metaloproteína 1 como efecto final del estrés térmico (señal producida por el aumento de ROS debido al aumento de temperatura).

### Equipo:

Lector de fluorescencia para microplacas (Fluoroskan Ascent CF Thermofisher Labsystems).

Lector de ELISA (espectrofotómetro) Multiskan RC Thermofisher Labsystems. Lector SAPHIRE-2 (fluorescencia, luminiscencia y espectrofotómetro) de TECAN.

### Modelo celular:

Como modelo celular *in vitro* se usaron principalmente cultivos de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), obtenidos de piel humana, de una o más muestras de piel (mezcla) de operación de fimosis en niños entre 0 y 3 años. Estos fibroblastos se caracterizaron y expandieron en medio de Dulbecco, 1 g/l de glucosa complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 %, L-glutamina 2 mM y antibióticos (100 mg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina).

### Evaluación de la citotoxicidad celular en fibroblastos dérmicos humanos

La determinación de citotoxicidad se llevó a cabo mediante el método WST1, un ensayo colorimétrico estándar para la cuantificación no radiactiva de proliferación celular, viabilidad celular, y citotoxicidad. Este ensayo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio mediante la acción de reductasas mitocondriales, formando un producto coloreado soluble cuya concentración se determina por medición de la densidad óptica a 450 nm. Los valores elevados son indicativos de células sanas, y mientras que los valores bajos son indicativos de daño citotóxico.

En resumen, 24 horas después de la siembra, las células se expusieron a 6 concentraciones (20, 10, 5, 1, 0,5 y 0,25 % en medio de ensayo) de la suspensión de RCPF durante 24 h y se mantuvieron a 37 °C, y a 42 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24 horas de exposición al producto, el medio de cultivo celular se decantó, y se añadió el reactivo WST1 directamente en el medio de cultivo en ausencia del producto. Después de 1 y 2 horas de revelado, se leyó la densidad óptica o absorbancia con un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

El producto Repair Complex sometido a ensayo no mostró ningún efecto tóxico dentro del intervalo del 20, 10, 5, 1, 0,5 y 0,25 % en fibroblastos.

### Determinación del efecto de RCPF en la capacidad antioxidante intracelular en células HDF

La tasa de formación de ROS se evaluó en células tratadas y células no tratadas, y mantenidas a 37 °C (control) y 42 °C (efecto IRA) durante tiempos diferentes (60, 120, 180, y 240 minutos), usando la sonda di-acetato de 2,7-dicloro-di-hidro-fluoresceína (Carboxi-H<sub>2</sub> DCFDA). C-400 de Molecular Probes. Este es un marcador fluorogénico fiable para ROS en células vivas, sensible a especies reactivas de oxígeno (ROS), que permite obtener una medida cuantificable de la producción de ROS intracelulares y de ese modo estudiar la eficacia de compuestos con supuesta

actividad antirradical y antioxidante. Esta sonda es un indicador de la producción de ROS intracelulares, que permanece en estado no fluorescente hasta que se produce la oxidación dentro de la célula, cuando sus grupos acetato se retiran por esterasas intracelulares.

- 5 La tasa de formación de ROS a diferentes tiempos se midió en un fluorímetro de placa después de 40 minutos de incubación de las células con la sonda de carboxi-H<sub>2</sub> DCFDA en presencia del producto (RCPF), y posterior activación de las células, habitualmente con hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) 250 µM, también en presencia del producto. En el presente estudio la tasa de formación de ROS también se midió usando como estímulos la exposición de las células a una temperatura de 42 °C (estrés térmico) durante diferentes tiempos (0, 60 min, 120 min, 180 min, y 240 min). Esto se comparó con la formación de ROS producido en una placa de control mantenida en condiciones de control idénticas pero a 37 °C. En ambos casos se usó TBHP como control positivo del ensayo.

- 15 Día 0 (siembra): se sembraron fibroblastos en la parte central de placas de 96 pocillos con una densidad de 5000 células/pocillo (48 pocillos/placa). Se preparó una placa de células diferente para cada tiempo de incubación de estudio a 42 °C (60 min, 120 min, 180 min, y 240 min) y se preparó una quinta placa de células para llevar a cabo el experimento en paralelo a 37 °C. Estas 5 placas con células se dejaron durante 2-3 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, hasta que se formó una monocapa de células (80-90 % de confluencia) y antes del inicio del tratamiento.

- 20 Día 3 (tratamiento): se prepararon 5 placas sin células pero configuradas idénticamente como las anteriores, que se nombraron como placas de transición: P-1 (1 h, 42 °C), P-2 (2 h, 42 °C), P3 (3 h, 42 °C), P-4 (4 h, 42 °C) y P-5 (37 °C). En estas placas, los productos del estudio se añadieron a una concentración 2x (concentrados 2 veces) de las concentraciones finales deseadas (0,1 %, 1 %, y 5 % para RCPF y 100 µM para análogo de α-tocoferol y antioxidante de referencia Trolox<sup>TM</sup>) en solución salina tamponada de Hank (tampón HBSS) o el tampón en los pocillos no tratado con compuesto.

- 30 Las placas de transición permiten una transferencia más sencilla de 50 µl de los compuestos a 2x o el tampón (control) a la correspondiente placa de células, donde se había añadido previamente la sonda preparada previamente a 2x (40 µM en tampón HBSS) para alcanzar a continuación una concentración final de 20 µM como sigue continuación.

- 35 El medio de una de las placas con células se decantó y se añadieron 50 µl de la sonda 2x a todos los pocillos, con la excepción del control negativo (ctr -). A continuación, se añadieron 50 µl de la placa de transición correspondiente que contenía el RCPF, Trolox y los controles a 2x y se incubaron 40 minutos a 37 °C para incorporar la sonda a las células. Después de este tiempo de marcado, la placa de las células marcadas se decantó en papel absorbente, se lavó y se añadieron de vuelta el compuesto RCPF y los controles (50 µl de la misma placa de transición). Inmediatamente, se añadió TBHP solo a los pocillos del control positivo. Se realizó una lectura de la fluorescencia a T = 0 e inmediatamente se inició la estimulación moviendo la placa a la temperatura que correspondiera (42 °C para las placas P-1 a P-4) o 37 °C (para P-5).

- 40 Cuantificación de ROS: se cuantificó la producción de ROS a partir de cada placa mediante análisis fluorométrico por medición de la intensidad media de fluorescencia (MFI), en un Lector de Fluorescencia en Microplaca (Fluoroskan Ascent CF; LabSystem) a tiempo 0, y a un tiempo correspondiente a 60, 120, 180, y 240 minutos a longitudes de onda de 485 y 527 nm de excitación y emisión, respectivamente. Se leyó la fluorescencia de la placa de transición que a continuación se restó de todas las lecturas como objetivo para obtener la fluorescencia específica (control MFI).

- 50 Los resultados en este caso de estrés térmico se expresaron como el aumento sobre la sonda y el control positivo a 37 °C y como % del medio de control con la sonda y sin el producto de cada tiempo y placa.

El resultado de MFI se comparó con el compuesto prooxidante hidroperóxido de terc-butilo (TBHP), usado como control positivo, y con el control de sonda sin tratamiento de la misma placa y tiempo.

- 55 Los resultados se resumen en la Tabla 1 y se ilustran gráficamente en la Figura 1-Figura 3. La Tabla 1 muestra el aumento relativo de ROS a 42 °C (efecto IRA) y el % de inhibición o de aumento con respecto al control de sonda.

Tabla 1:

Tiempo de exposición a IRA	Control de sonda		RCPF al 0,1 %			RCPF al 1 %		
	42 °C		42 °C	% de Ctrl	% de inhib.	42 °C	% de Ctrl	% de inhib.
60 min	3,08	100 %	2,44	79,3	20,7	2,57	83,6	16,4
120 min	4,75	100 %	3,59	75,7	24,3	4,63	97,6	2,4
180 min	6,02	100 %	4,42	73,3	26,7	4,03	66,9	33,1
240 min	15,63	100 %	9,66	61,8	38,2	10,84	69,4	30,6

Tiempo de exposición a IRA	RPCF al 5 %			TROLOX			TBHP Ctrl +		
	42 °C	% de Ctrl	% de inhib	42 °C	% de Ctrl	% de inhib	42 °C	% de Ctrl	% de inhib
60 min	3,16	102,7	-2,7	3,3	107,9	-7,9	8,33	271	-170,8
120 min	7,60	160,1	-60,1	10,1	212,1	-112,1	18,87	398	-297,8
180 min	8,77	145,5	-45,5	14,0	232,8	-132,8	22,40	372	-271,8
240 min	19,46	124,6	-24,6	26,8	171,3	-71,3	38,09	244	-143,8

Estos resultados muestran que el estrés térmico (temperatura fija a 42 °C) produjo un aumento en la producción de ROS intracelulares con respecto al tiempo en comparación con el control a 37 °C y con los valores de TBHP (control positivo de ensayo de ROS). En estas condiciones, el producto RCPF protege del aumento de ROS directo inducido por temperatura (efecto IRA) con respecto al tiempo.

Con RCPF al 0,1 % el efecto inhibitor es dependiente del tiempo y máximo a 240 minutos (32 % de inhibición). También se observó un efecto inhibitor del mismo orden (30-33 %) con un 1 % pero solo después de 180 y 240 minutos de estrés térmico. El antioxidante clásico Trolox no tiene ningún efecto protector para tiempos prolongados, y el control positivo (TBHP) aumenta con el tiempo la respuesta de control en un 171 %, 298 %, 272 % y 144 % a diferentes tiempos posteriores al estrés.

Para resumir, los resultados muestran que el RCPF antes de un aumento de temperatura inducida por IRA, protege del aumento de ROS directo con respecto al tiempo.

#### Determinación del efecto de RCPF en la síntesis de metaloproteinasa-1 (MMP-1) en células HDF

La síntesis de MMP-1 (ng/mg de proteína) se midió por ELISA en el medio de cultivo después de mantener las células a 42 °C (efecto IRA) durante diferentes tiempos (60, 120, 180 y 240 minutos) y después de incubarlas durante 24 h, con o sin los tratamientos.

La determinación del efecto del producto (RCPF) en la regulación de MMP-1 se llevó a cabo usando un kit comercial de Biotrack para medir la síntesis total y la actividad de metaloproteinasa-1 (MMP-1), una de las metaloproteinasas principales de la piel, responsable de la degeneración del colágeno de tipo I y de tipo III, entre otros.

Se evaluó el efecto protector del producto en células mantenidas a 42 °C a diferentes tiempos de incubación antes de llevar a cabo el ELISA y la cuantificación de acuerdo con las indicaciones del kit (véase posteriormente).

Para estos ensayos se sembraron células en placas de cultivo de 24 pocillos a 30.000 células/pocillo y después de 48 horas de crecimiento, se incubó una placa durante un tiempo (1 h, 2 h, 3 h, y 4 h) a 42 °C con medio completo de crecimiento y una placa adicional permaneció a 37 °C. Se aplicaron los compuestos (0,5 ml pocillo) en las concentraciones indicadas en medio de ensayo, 1 g/l de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternera fetal al 1 % (FCS) por triplicado como se indica en el esquema de placa posterior y se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C (Tabla 2), antes de la cuantificación de MMP-1.

Se usó IL-1 $\beta$  a 5 ng/ml como activador conocido de la síntesis de MMP-1. Se determinó si el producto RCPF, a una concentración (1 %) era capaz de inhibir la síntesis de MMP-1 inducida por un estímulo inflamatorio en la piel tal como IL-1 $\beta$ . Se usó como control positivo dexametasona (DEXA) 1  $\mu$ M para validar el ensayo.

40

Tabla 2:

Medio de Ctrl	Medio de Ctrl	Medio de Ctrl	IL-1 $\beta$ 5 ng/ml Ctr +	IL-1 $\beta$ 5 ng/ml Ctr +	IL-1 $\beta$ 5 ng/ml Ctr +
RCPF al 0,1 %	RCPF al 0,1 %	RCPF al 0,1 %	RCPF al 1 %	RCPF al 1 %	RCPF al 1 %
RCPF al 5 %	RCPF al 5 %	RCPF al 5 %	TROLOX 100 $\mu$ M	TROLOX 100 $\mu$ M	TROLOX 100 $\mu$ M
IL-1 $\beta$ + RCPF al 1 %	IL-1 $\beta$ + RCPF al 1 %	IL-1 $\beta$ + RCPF al 1 %	IL-1 $\beta$ + DEXA 1 $\mu$ M	IL-1 $\beta$ + DEXA 1 $\mu$ M	IL-1 $\beta$ + DEXA 1 $\mu$ M

Las celdas de color gris significan pocillos inflamados con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) sola y combinada con los compuestos mencionados. CTRL en la tabla anterior significa medio de control.

5

Después del tiempo de incubación, 24 horas a 37 °C, se recogió el medio de cultivo y se prepararon varias alícuotas y se congelaron a -80 °C hasta que se midió la cantidad de MMP-1 sintetizada por pocillo. La medición se realizó por duplicado usando un kit comercial de BIOTRACK para la medición de MMP-1, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En paralelo, se congelaron placas a -80 °C y a continuación se prepararon lisados celulares a partir de cada pocillo. La cantidad de proteína total en los pocillos del ensayo se determinó mediante el Kit de Reactivo de Ensayo de Proteína BCA de Pierce. El valor de la cuantificación de MMP-1 en ng/ml se corrigió para la proteína total en cada condición experimental, y de esta forma se obtuvo el valor de MMP-1 ng/proteína total.

Los resultados se resumen en la Figura 4 y las Figuras 5A-D. Los resultados muestran que la síntesis de MMP-1 se aumentó en 24 h después de incubación a 42 °C durante 60 min en un máximo de 12 veces (2571,03  $\pm$  165,4) cuando se comparó con los valores basales de MMP-1 a 37 °C ( $\approx$  216  $\pm$  18,6 ng/ml) y aproximadamente 3,5 veces cuando se comparó con el efecto de 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  (6422,8  $\pm$  537,6). Para los tiempos de incubación restantes, el aumento fue menor y similar a 120 min, 180 min, y 240 min ( $\approx$  8 - frente a  $\approx$  6,5 veces, control a 37 °C). En estas condiciones, el producto RCPF inhibió en un 10 % y un 50 % la síntesis de MMP-1 inducida durante 24 h en los pocillos previamente incubados a 60, 120, 180, y 240 minutos a una temperatura de 42 °C. El efecto fue dependiente de la dosis solo durante periodos cortos (60 y 120 minutos a 42 °C) y cuando la síntesis de MMP-1 del control había sido mayor. A una concentración del 5 %, se descubrió que la inhibición variaba entre un 30-50 % a 60 y 240 minutos. La inhibición con un antioxidante tal como Trolox ( $\alpha$ -tocoferol) fue de un 20-25 % a 60 y 120 minutos. Una concentración intermedia de un 1 % del producto RCPF no inhibe la síntesis de MMP-1 inducida por IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) e incluso potencia el efecto de esta citoquina, tanto para tiempos cortos de temperatura (h a 42 °C + 24 h a 37 °C en presencia de producto (RCPF)) como para tiempos mayores 4 h.

Para resumir, los resultados muestran que el RCPF antes de un aumento de temperatura inducido por IRA protege del aumento del MMP-1.

30

#### Referencias citadas en la solicitud

- EP43128
- US4464362
- 35 - EP2233127
- WO2009/0535642
- US20090060962
- US20090068610
- Zastrow L. *et al.* "The Missing Link - Light-Induced (280-1,600nm) Free Radical Formation in Human Skin", *Skin Pharmacol and Physiol* 2009, vol. 22, pp. 31-44
- 40 - Darvin M.E. *et al.* "Radical Production by Infrared A Irradiation in Human Tissue", *Skin Pharmacol and Physiol* 2010, vol. 23, pp. 40-46).
- P. Schroeder *et al.*, "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling", *Free Radic. Biol. Med.* 2007, vol. 43, pp. 128-135
- 45 - Consejo de las Comunidades Europeas (texto revisado de la versión consolidada de la Directiva Europea 76/768/EEC, Anexo VII páginas 121-126, publicado el 24-04-2008

**REIVINDICACIONES**

1. Una cantidad eficaz de un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación Infrarroja A.
2. El lisado como se define en la reivindicación 1, en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación Infrarroja A y radiación Ultravioleta.
3. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el lisado de al menos un microorganismo es un lisado de *Bifidobacterium longum*.
4. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el uso es para la prevención de signos cutáneos de fotoenvejecimiento.
5. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se usa una cantidad eficaz del lisado, estando comprendida entre un 0,1-5 % en peso basado en el peso total de una composición cosmética que lo comprende.
6. El lisado para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cantidad eficaz del lisado está comprendida entre un 0,5-3 % en peso basado en el peso total de una composición cosmética que lo comprende.
7. El lisado para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cantidad eficaz del lisado está comprendida entre un 0,5-1 % en peso basado en el peso total de una composición cosmética que lo comprende.
8. Composición cosmética tópica que comprende un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, y al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos en una cantidad entre un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los signos cutáneos de fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación Infrarroja A y radiación Ultravioleta.
9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, que consiste en un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, y al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos en una cantidad entre un 29-50 % en peso de la composición total, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona.
10. Un lisado de al menos un microorganismo de las especies del género *Bifidobacterium*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación Infrarroja A.
11. El lisado para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, que es un lisado de *Bifidobacterium longum*.
12. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que la prevención y/o el tratamiento comprenden disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno inducida directamente por radiación Infrarroja A.
13. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la prevención y/o el tratamiento comprenden inhibir la producción de metaloproteinasa-1 de la matriz inducida por radiación Infrarroja A.
14. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que el lisado está en combinación con al menos un filtro frente a radiación solar seleccionado entre el grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos, y las combinaciones de los mismos, y la combinación es además para su uso en la prevención y/o el tratamiento de daño en las células de la piel producido por radiación Ultravioleta.
15. El lisado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en el que el daño en las células de la piel es fotoenvejecimiento.

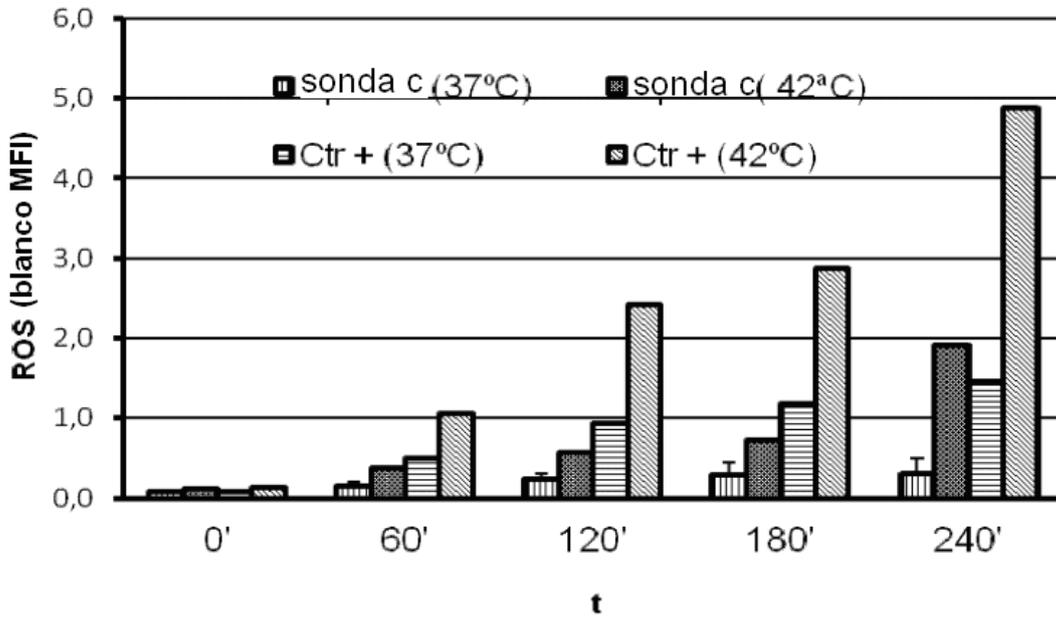


FIG. 1A

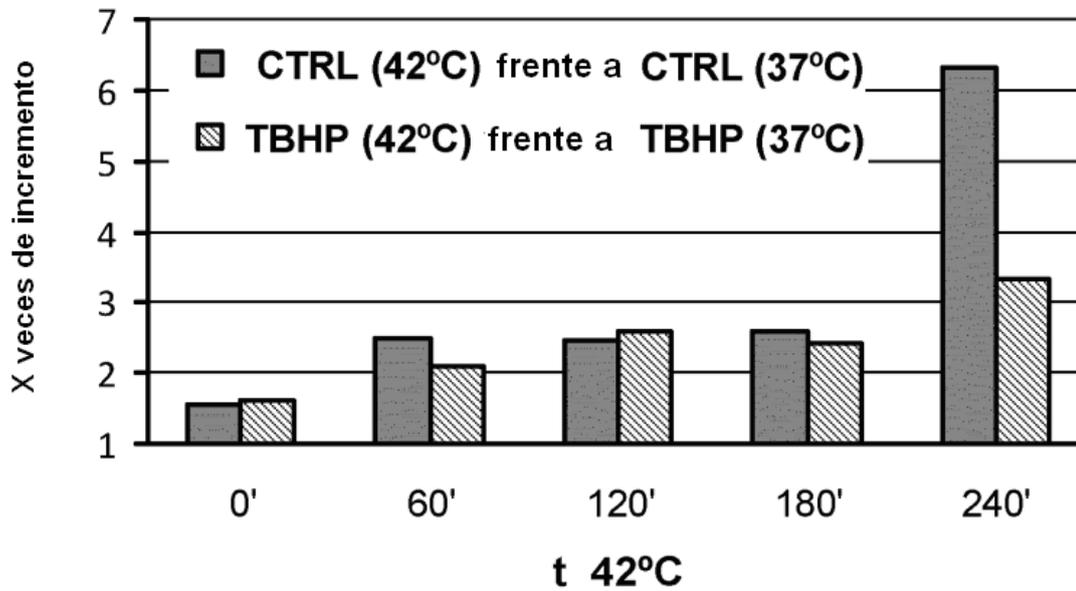
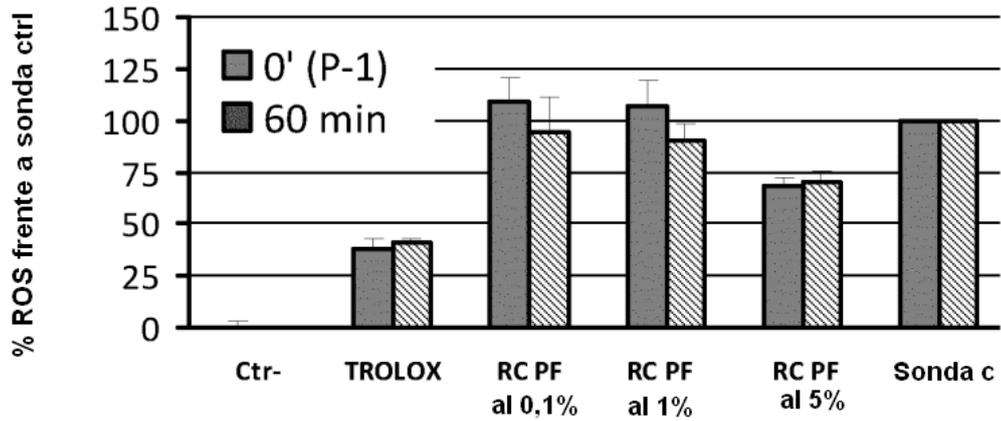


FIG. 1B

**A**

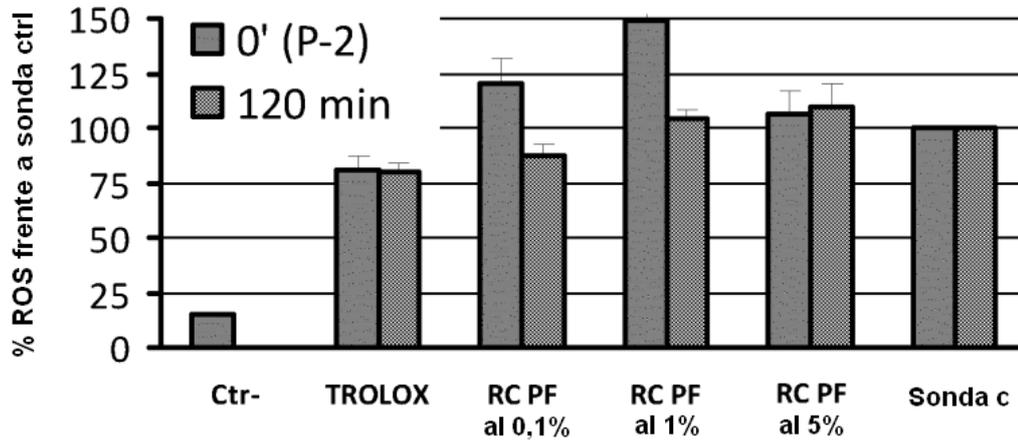
**60 min 42 °C**



**FIG. 2A**

**B**

**120 min 42 °C**



**FIG. 2B**

C

180 min 42 °C

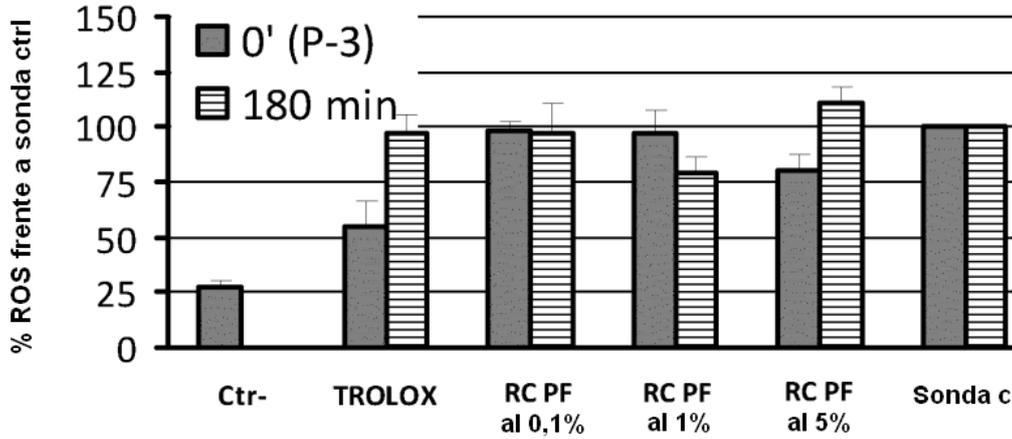


FIG. 2C

D

240 min 42 °C

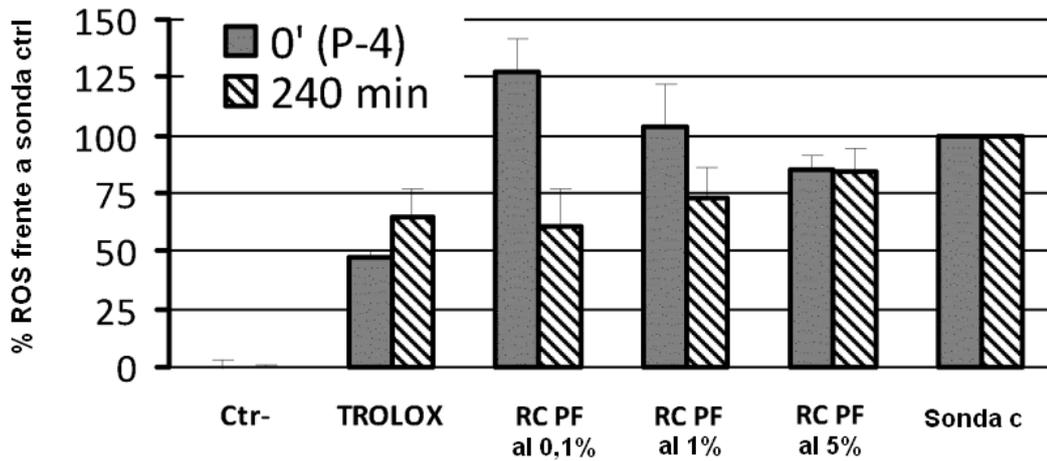


FIG. 2D

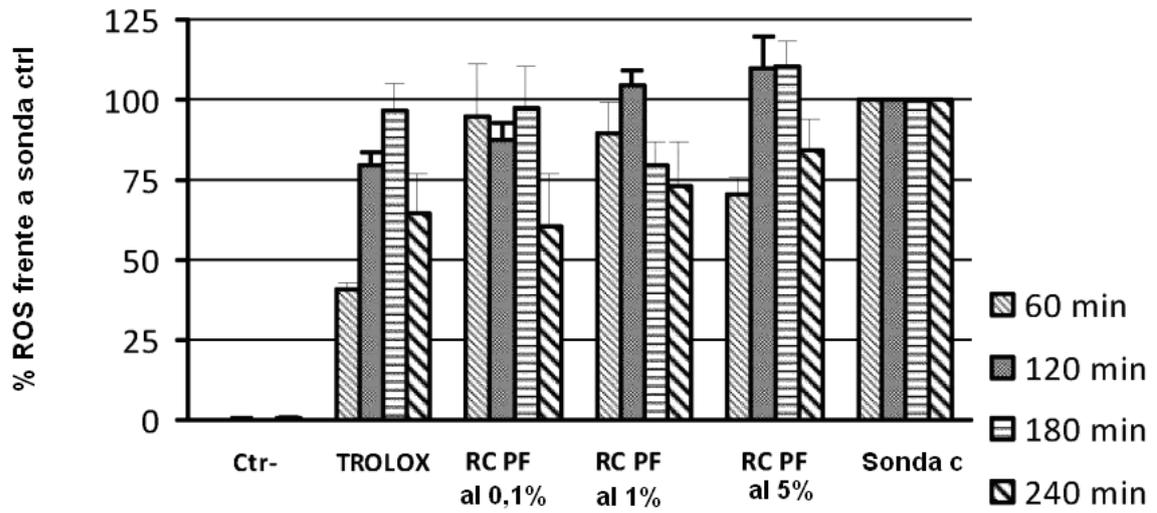


FIG. 3

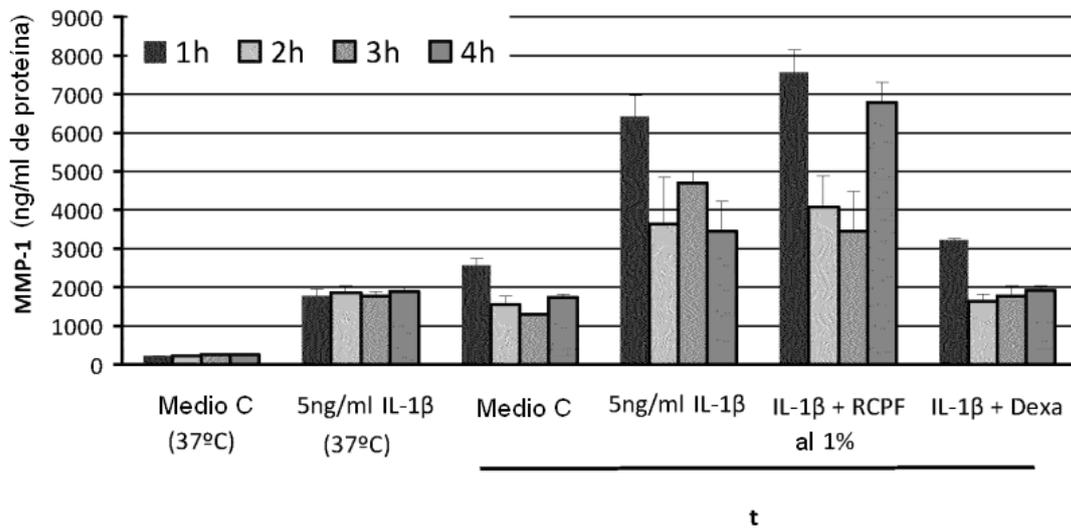
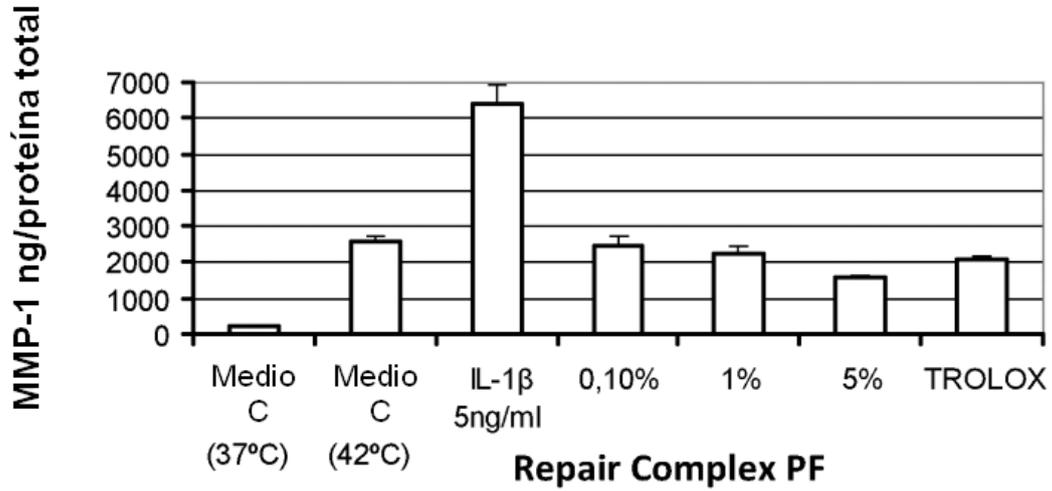


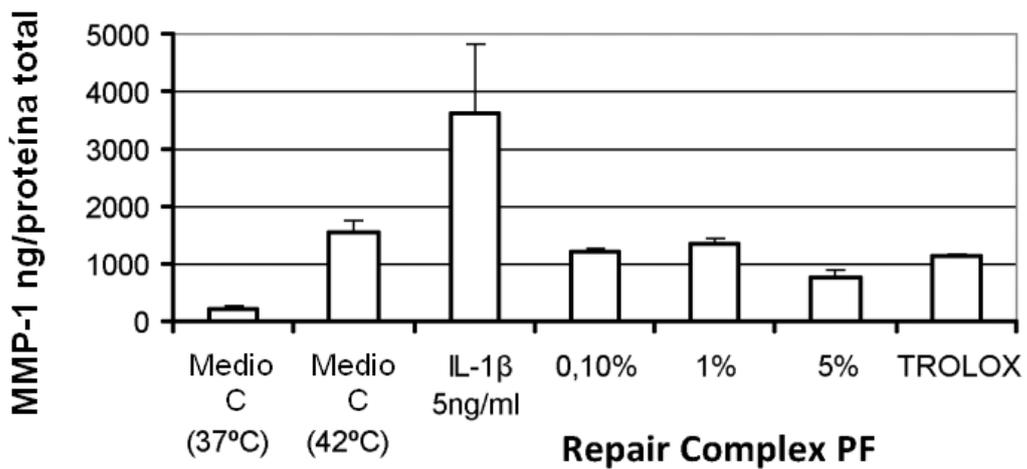
FIG. 4

**1 h a 42 °C**



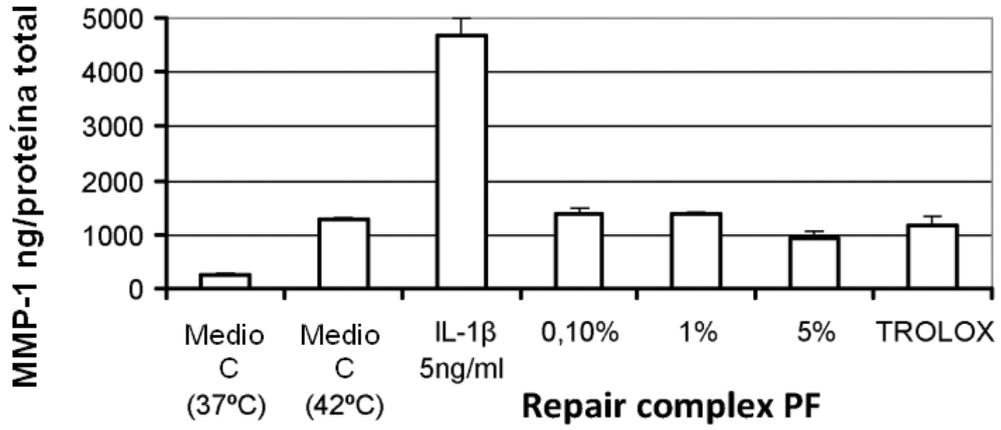
**FIG. 5A**

**2 h a 42 °C**



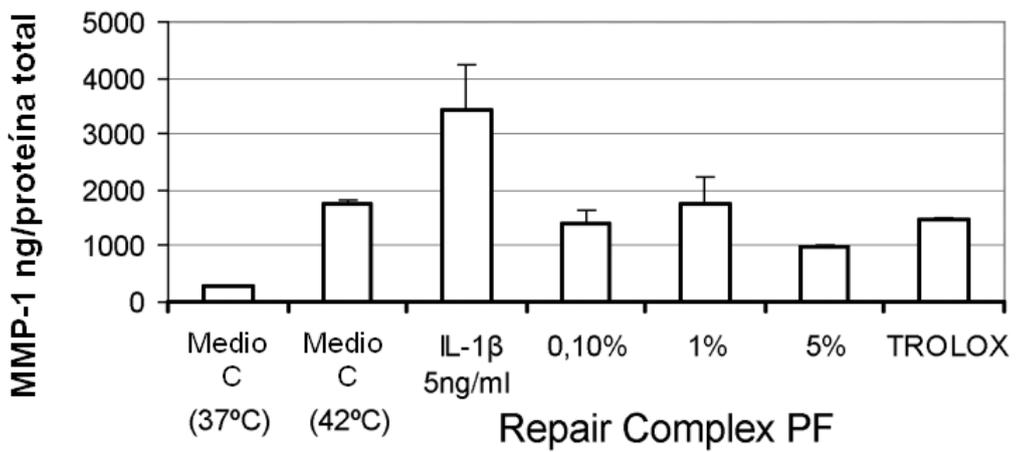
**FIG. 5B**

**3 h a 42 °C**



**FIG. 5C**

**4h a 42 °C**



**FIG. 5D**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 43128 A [0007] [0019] [0041] [0117]
- 10 • EP 2233127 A [0013] [0117]
- WO 9801107 A [0014]
- WO 2009053564 A [0019]
- FR 2920306 [0019]
- US 20090060962 A [0019] [0117]
- 15 • US 20090068610 A [0019] [0117]
- FR 2937534 [0020]
- US 4464362 A [0041] [0117]
- WO 20090535642 A [0117]

**20 Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- **ZASTROW L. et al.** The Missing Link - Light-Induced (280-1,600nm) Free Radical Formation in Human Skin. *Skin Pharmacol and Physiol*, 2009, vol. 22, 31-44 [0010] [0117]
- **DARVIN M.E. et al.** Radical Production by Infrared A Irradiation in Human Tissue. *Skin Pharmacol and Physiol*, 2010, vol. 23, 40-46 [0010] [0117]
- 25 • **P. SCHROEDER et al.** Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, vol. 43, 128-135 [0011] [0117]
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, 96507-89-0 [0017]
- *European Directive 76/768/EEC consolidated version Annex VII*, 24 April 2008, 121-126 [0053]
- *Council of the European Communities*, 24 April 2008, 121-126 [0117]