

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 212**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/99 (2007.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2006 E 10172755 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2308566**

54 Título: **Uso de bifidobacterias pro bióticas administradas por vía oral para obtener beneficios de belleza en seres humanos**

30 Prioridad:

08.04.2005 US 669620 P

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

02.11.2017

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US y
ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TREJO, AMY, VIOLET y
O'MAHONY, LIAM, DIAMUID**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones :

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

ES 2 640 212 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

Uso de *bifidobacterias* probióticas administradas por vía oral para obtener beneficios de belleza en seres humanos

5 **Campo**

La presente invención se refiere al uso de *bifidobacterias* probióticas para regular el estado del tejido queratinoso humano y conseguir beneficios cosméticos de belleza.

10 **Antecedentes**

Los mecanismos de defensa para proteger el tracto gastrointestinal (GI) de los mamíferos de la colonización de bacterias son muy complejos. El tracto GI de la mayoría de mamíferos está colonizado tanto por microflora natural como por microorganismos patógenos invasivos. En un estado saludable, esta microflora competitiva se encuentra en un estado de equilibrio. El bienestar de los seres humanos está estrechamente relacionado con su dieta y salud del GI, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal en los seres humanos puede traducirse en personas más sanas.

El número y composición de la microflora intestinal tiende a ser estable, aunque la edad y la dieta pueden modificarlos. Se cree que la acidez gástrica, la bilis, la peristalsis intestinal y la inmunidad local son factores importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos. Con frecuencia, los trastornos del GI de los seres humanos están relacionados con la proliferación bacteriana y la producción de enterotoxinas por bacterias patógenas. Estos factores desestabilizan el equilibrio de la microflora intestinal y pueden fomentar la inflamación y las respuestas inmunitarias aberrantes. En consecuencia, la modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede derivar en o prevenir muchos trastornos del GI.

Recientemente, se han empezado a realizar investigaciones que destacan algunas cepas de bacterias valiosas que pueden obtenerse por aislamiento del tracto gastrointestinal de mamíferos, tales como de seres humanos, y su posible uso como agentes probióticos. Los probióticos se consideran que son preparaciones de bacterias, viables o muertas, sus constituyentes, tales como proteínas o hidratos de carbono, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que favorecen la salud de los mamíferos al preservar la microflora natural del tracto GI, y reforzar los controles normales en respuestas inmunitarias aberrantes.

Hay quienes consideran que las bacterias probióticas son más eficaces cuando se derivan de la especie, o de especies estrechamente relacionadas, que se pretenden tratar. Aunque se han dilucidado varias cepas de bacterias probióticas, los métodos de uso de estas cepas y su eficacia terapéutica se han limitado sobre todo a la modulación de trastornos gastrointestinales en seres humanos. Todavía no se han llevado a cabo muchas investigaciones en cuanto al potencial que tienen estos microorganismos para influir de forma beneficiosa en sistemas fisiológicos que no sean el tracto gastrointestinal.

El documento WO-A-03/070260 describe una composición que puede administrarse por vía oral para la fotoprotección de la piel, que comprende una bacteria láctica probiótica o un sobrenadante de cultivo de la misma, y una levadura, incluidos en un vehículo aceptable por vía oral.

El documento WO-A-03/070203 describe una composición que puede administrarse por vía oral para la fotoprotección de la piel, que comprende una bacteria láctica probiótica o un sobrenadante de cultivo de la misma, y un carotenoide o derivado, incluidos en un vehículo aceptable por vía oral.

El documento EP-A-1 609 463 se publicó después de la fecha de protección del presente documento, y describe el uso de uno o más microorganismos probióticos y/o sus fracciones y/o sus metabolitos en asociación con uno o más cationes minerales divalentes, distintos de sulfato, para crear composiciones para administración oral y tratar y/o prevenir la piel seca, o composiciones para ser aplicadas con el mismo fin, las composiciones en sí y un método de tratamiento utilizando las mismas.

El documento EP-A-1 642 570 se publicó después de la fecha de protección del presente documento, y describe el uso de una combinación de i) *Lactobacillus paracasei* y *L. casei*, o sus fracciones o metabolitos, y ii) *Bifidobacterium longum* o *B. lactis*, o sus fracciones o metabolitos para preparar una composición dermatológica para el tratamiento y/o prevención de la piel sensible y reactiva, opcionalmente cuando está asociada a la piel seca.

60 **Breve descripción**

Según la presente invención, se proporciona el uso de un probiótico de conformidad con las reivindicaciones.

65

Descripción detallada

Todos los pesos, medidas y concentraciones en la presente memoria se miden a 25 °C en la totalidad de la composición, salvo que se indique lo contrario. Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes de composiciones referidas en la presente memoria son porcentajes en peso y todas las relaciones son relaciones en peso.

En la siguiente descripción, la abreviatura UFC (“unidades formadoras de colonias”) designa el número de células bacterianas reveladas por recuentos microbiológicos en placas de agar, como se conoce comúnmente en la técnica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “probiótico” es lo suficientemente amplio para incluir uno o más probióticos, uno o más sobrenadantes de cultivo de los mismos y/o mezclas de los mismos.

Números de depósito bacteriano

La siguiente tabla expone el número de cepas y el número de depósito/registro de las *bifidobacterias* probióticas. Las cepas bacterianas se han depositado en la NCIMB (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria) en Aberdeen, Escocia, Reino Unido. NCIMB 41003 se presenta de conformidad con la invención.

Referencia de la cepa	Número de depósito NCIMB
AH208	NCIMB 41050
AH209	NCIMB 41051
AH210	NCIMB 41052
AH211	NCIMB 41053
AH212	NCIMB 41099
AH214	NCIMB 41100
AH35624	NCIMB 41003

Bifidobacterias probióticas

Las *bifidobacterias* probióticas utilizadas en la práctica de la presente invención es NCIMB 41003.

El documento WO 00/42168 describe una *bifidobacterias* probióticas aisladas del tracto GI humano. Esta bacteria se deposita en la NCIMB bajo el número de depósito 41003.

Se ha descubierto que las cepas de *bifidobacterias* que pueden obtenerse del tracto GI pueden adherirse al tracto GI tras la ingesta de células bacterianas viables, y también son significativamente inmunomoduladoras cuando se ingieren en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las *bifidobacterias* que pueden obtenerse del tracto GI se asocian estrechamente con los tejidos mucosos del intestino. Sin pretender imponer de nuevo ninguna teoría, se cree que esto hace que las *bifidobacterias* probióticas generen respuestas alternativas del huésped, que den como resultado su acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas que pueden obtenerse por aislamiento del tracto GI pueden modular el sistema inmunitario del huésped a través de su interacción directa con el epitelio mucoso y con las células inmunitarias del huésped. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo de acción tradicional asociado a las bacterias probióticas, es decir, la prevención de adherencia patógena al intestino mediante oclusión y competición en busca de nutrientes, hace que las *bifidobacterias* sean muy eficaces como organismos probióticos.

Las *bifidobacterias* útiles en la presente invención, que pueden obtenerse por aislamiento del tracto GI humano, tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra diversas especies/cepas bacterianas patógenas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicadora de una posible actividad probiótica *in vivo* en seres humanos.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias *Bifidobacteria* puede ser el resultado de diversas acciones diferentes de las bacterias *Bifidobacteria*. Se ha sugerido previamente en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto GI tras su ingesta oral evitando la adherencia de organismos patógenos en la mucosa intestinal mediante oclusión. Esto requiere la ingesta oral de células bacterianas “vivas” o viables para que se pueda establecer una colonia de bacterias en el intestino. Sin embargo, se cree que las *bifidobacterias* útiles en la presente invención, que pueden obtenerse mediante aislamiento del tracto GI humano, aunque ejercen un determinado efecto probiótico debido a la oclusión si se proporcionan de una forma viable, pueden proporcionar un efecto probiótico sustancial en forma viable o no viable debido a la producción, durante la fermentación *in vitro*, de una sustancia o sustancias que, o bien inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos, o los destruyen, y/o alteran la capacidad inmunitaria del humano huésped. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias de la presente invención pueden

ofrecerse como cultivos viables o no viables o como productos de fermentación purificados y seguir proporcionando un efecto beneficioso al huésped.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria* pueden mantener la viabilidad después de su tránsito a través del tracto GI. Esto es deseable para que los cultivos vivos de las bacterias se tomen por vía oral, y para que se produzca la colonización en los intestinos y las tripas tras su tránsito a través del esófago y el estómago. La colonización de los intestinos y las tripas por parte de las *bifidobacterias* probióticas de la presente invención, es deseable para que, a largo plazo, el huésped obtenga beneficios probióticos. La dosificación oral de células no viables o aislados purificados de las mismas, produce beneficios temporales, pero puesto que las bacterias no son viables, estas no pueden crecer y proporcionar un efecto probiótico continuo *in situ*. Como resultado, esto puede requerir que se dosifique al huésped regularmente para mantener los beneficios para la salud. Al contrario, las células viables que son capaces de sobrevivir al tránsito gástrico en forma viable y, posteriormente, formar colonias adhiriéndose a, y proliferando en, la mucosa del intestino, son capaces de proporcionar efectos probióticos continuos *in situ*.

Por lo tanto, es preferible que las *bifidobacterias* de la presente invención mantengan la viabilidad después de su suspensión en un medio que tenga un pH de 2,5 durante 1 hora. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "mantener la viabilidad" significa que al menos el 25 % de las bacterias suspendidas inicialmente en el medio de prueba son viables utilizando el método de recuento de colonias en placa, conocido por los expertos en la materia. Preferiblemente, el término "mantener la viabilidad" significa que al menos el 50 % de las bacterias suspendidas inicialmente son viables. Es deseable que las *bifidobacterias* de la presente invención conserven su viabilidad después de ser expuestas a un pH bajo, ya que esto simula la exposición a los jugos gástricos del estómago y del intestino superior *in vivo* después de su ingesta oral en humanos.

Además, es preferible que las bacterias de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33 % cuando se encuentren en presencia de al menos 0,5 % de sales biliares porcinas. Más preferiblemente, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento de al menos 33 % cuando se encuentran en presencia de al menos 1 % de sales biliares porcinas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las bacterias de la presente invención, capaces de mantener la viabilidad en presencia de al menos 0,5 % de sales biliares porcinas, pueden sobrevivir a las condiciones presentes en el intestino. Se piensa que esto es el resultado de la adición de bilis porcina al medio de cultivo, simulando las condiciones del intestino.

Todavía más, es preferible que las bacterias *Bifidobacteria* útiles en la presente invención tengan una adhesión significativa a las células epiteliales del intestino *in vitro*. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "adhesión significativa" significa que al menos el 4 % del número total de las bacterias incubadas junto con las células epiteliales *in vitro*, se adhieren a las células epiteliales. Más preferiblemente, al menos el 6 % de las células bacterianas incubadas conjuntamente se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la adherencia de las células epiteliales del intestino *in vitro* es indicativa de la capacidad de las bacterias para colonizar el tracto GI de un ser humano *in vivo*.

La secuencia polinucleotídica intergénica 16s-23s es conocida por los expertos en la técnica como la secuencia de ADN en el genoma bacteriano que se puede utilizar para identificar las diferentes especies y cepas de bacterias. Esta secuencia polinucleotídica intergénica se puede determinar mediante el método que se detalla a continuación.

Se recogen colonias de bifidobacterias de una placa de agar y se resuspenden en tampón IX PCR, se calientan a 96 °C durante 5 minutos, se congelan a -70 °C durante 5-10 minutos, se descongelan y se añade una muestra parcial a un tubo Eppendorf de PCR. Se realiza una PCR utilizando los cebadores espaciadores intergénicos (IGS), IGS L:5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. Las condiciones de los ciclos son 96 °C durante 1 min (1 ciclo), 94 °C durante 30s, 53 °C durante 30s, 72 °C durante 30s (28 ciclos). La reacción de la PCR contiene 5 µl de ADN, un tampón de PCR (Bioline, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Roche, Reino Unido), cebadores IGS L y R 0,4 µM (150 ng/50 µl) (MWG Biotech, Alemania) y Taq polimerasa de Bioline (0,6 unidades). Las reacciones de la PCR se llevan a cabo en un termociclador Hybaid. Los productos de la PCR (8 µl) se ejecutan junto con a un marcador de peso molecular (µX174 Hae III, Promega) en un gel de agarosa teñido con EtBr (bromuro de etidio) al 2 % en TAE, para determinar su perfil IGS. Utilizando los mismos cebadores anteriores, se secuencian el ADN del espaciador intergénico (IGS) de las cepas de las bifidobacterias utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas de las cepas pueden compararse con las de la base de datos en línea de secuencias "BLAST", que puede consultarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para conocer su homología con otras secuencias 16s-23s bacterianas depositadas.

Métodos de utilización

Según la presente invención, se proporciona el uso de bifidobacterias probióticas, según la reivindicación 1. Dichos métodos incluyen la regulación del aspecto cosmético de la piel humana (p. ej., el cuero cabelludo).

En un aspecto, el método comprende el uso de dichas bifidobacterias probióticas con el fin de regular el aspecto cosmético del tejido queratinoso humano, tal y como se define en las reivindicaciones. En un aspecto particular, el método comprende administrar a un ser humano por vía oral dichas bifidobacterias probióticas con el fin de regular el aspecto cosmético de dicho tejido queratinoso humano, tal y como se define en las reivindicaciones, en donde dicho ser humano busca regular el aspecto cosmético de dicho tejido queratinoso humano.

Preferiblemente, las bifidobacterias probióticas se administran por vía oral en una cantidad eficaz, lo que significa en una cantidad suficiente para regular el aspecto cosmético del tejido queratinoso humano. En una realización particular, las bifidobacterias probióticas se administran diariamente por vía oral, preferiblemente diariamente durante al menos, o aproximadamente, tres meses, y más preferiblemente durante al menos, o aproximadamente, un año.

Las bifidobacterias probióticas de la presente invención es útil para regular el estado de la piel (p. ej., el cuero cabelludo). Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos “regular” o “regulación” significan que se mantiene o mejora el aspecto cosmético, e incluyen la regulación de las propiedades visuales, tácticas y cinestésicas del tejido queratinoso, tal y como se define en las reivindicaciones.

La regulación incluye reducir la descamación de la piel y/o del cuero cabelludo.

Los términos “signos de envejecimiento del tejido queratinoso” o “signos de envejecimiento” incluyen procesos que incluyen poros de tamaño grande (p. ej., asociados a estructuras anexiales, tales como los conductos de las glándulas sudoríparas, las glándulas sebáceas o los folículos capilares).

La invención proporciona el uso definido en las reivindicaciones.

El método de uso de las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención implica de forma típica que el humano las ingiera por vía oral. La ingesta oral puede producirse como parte de la ingesta alimentaria habitual, o como un complemento de la misma. La ingesta oral se produce de forma típica al menos una vez al mes, preferiblemente al menos una vez a la semana, más preferiblemente al menos una vez al día. Las *bifidobacterias* pueden administrarse al ser humano en una cantidad eficaz, preferiblemente en una cantidad inocua y eficaz, para regular el estado del tejido queratinoso humano. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “cantidad inocua y eficaz”, en relación con las *bifidobacterias*, significa que la cantidad de bacterias es suficiente para proporcionar el efecto o beneficio deseado a un ser humano que necesite el tratamiento, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios tales como toxicidad, irritación, o reacciones alérgicas, de forma acorde con una relación razonable de beneficios/riesgos, cuando se utiliza de la manera de la presente invención. La “cantidad inocua y eficaz” específica variará dependiendo de factores tales como la afección particular a tratar, el estado físico del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concomitante (si lo hubiera), la forma de dosificación específica utilizada, el vehículo utilizado, la solubilidad de la forma de dosificación y la posología concreta.

Preferiblemente, las *bifidobacterias* se administran al ser humano a una dosis de 1,0E+04 a 1,0E+14 de UFC al día, más preferiblemente de 1,0E+06 a 1,0E+12 de UFC al día. La composición puede contener preferiblemente al menos 0,001 % de 1,0E+04 a 1,0E+12 de UFC/g de las *bifidobacterias* que pueden obtenerse por aislamiento del tracto GI humano. El ser humano puede recibir las bacterias *Bifidobacteria*, o bien de forma viable, o como células destruidas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de la fermentación de las *bifidobacterias* de la presente invención, o cualquier mezcla de los mismos.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria*, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se utilizan para preparar una composición destinada a regular el aspecto cosmético del tejido queratinoso humano. Tal y como se ha indicado anteriormente, la composición puede formar parte de la ingesta alimentaria habitual, o como un complemento. Cuando la composición comprende una parte de la ingesta alimentaria habitual, la composición puede estar en forma de comprimido, cápsula, alimento, golosina, yogur, polvo, bebida y similares. Tales composiciones pueden comprender componentes adicionales.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención también pueden comprender un prebiótico. El término “prebiótico” incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del humano y, por lo tanto, estimulan el crecimiento o desarrollo de las *bifidobacterias* en el tracto gastrointestinal del humano a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la inulina y sus productos de hidrólisis comúnmente conocidos como fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligo derivados del almidón. Los prebióticos pueden ser suministrados en cualquier forma que sea adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede ser suministrado en forma de material vegetal que contiene la fibra. Entre los materiales vegetales adecuados se incluyen espárragos, alcachofas, cebollas, trigo o achicoria, o residuos de estos materiales vegetales. De forma alternativa, la fibra prebiótica se puede suministrar como un extracto de inulina, por ejemplo los extractos de achicoria son adecuados. Los extractos de inulina adecuados se pueden obtener en Orafi SA de Tirlemont 3300, Bélgica, con el nombre comercial “Raftiline”. Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftiline (g) ST, que es un polvo blanco fino que contiene de

aproximadamente 90 % a aproximadamente 94 % en peso de inulina, hasta aproximadamente 4 % en peso de glucosa y fructosa, y de aproximadamente 4 % a 9 % en peso de sacarosa. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido, tal como el que se obtiene en Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica, con la marca comercial “Raftilose”. Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos o utilizando microorganismos.

Los alimentos pueden contener otros principios activos, tales como ácidos grasos de cadena larga y cinc. Entre los ácidos grasos de cadena larga adecuados se incluyen el ácido alfa linoleico, el ácido gamma linolénico, el ácido linoleico, el ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y de ácido docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semilla de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linolénico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de semilla de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también se pueden utilizar en los sustratos de recubrimiento a los que se ha hecho referencia anteriormente. El cinc puede proporcionarse en varias formas adecuadas, por ejemplo, como sulfato de cinc u óxido de cinc.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen y demuestran más detalladamente realizaciones dentro del alcance de la presente invención cuando se utiliza la cepa NCIMB 41003. Los ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no deben interpretarse como limitaciones de la presente invención. Donde proceda, los ingredientes se facilitan con el nombre CTFA.

Ej.	Material	Actividad de agua	Contenido de agua (%)	Peso (%)
1	<i>B. infantis</i> (5x10 ¹² UFC/g) liofilizada	0,04	6	50
	Celulosa microcristalina	0,04	<1,5	50
2	<i>B. infantis</i> (1x10 ¹⁰ UFC/g) liofilizada	0,04	6	25
	Almidón de patata	0,09	<6	75
3	<i>B. infantis</i> (1x10 ¹¹ UFC/g) liofilizada	0,04	6	40
	Hemicelulosa de <i>Psyllium</i>	0,05	<8	60
4	<i>L. salivarius</i> (5x10 ¹² UFC/g) liofilizada	0,04	5	80
	Celulosa microcristalina	0,04	1	20
5	<i>L. acidophilus</i> (3x10 ¹¹ UFC/g) liofilizada	0,04	5	60
	Maltodextrina	0,25	5	39,5
	Estearato de magnesio	0,41	<6	0,5
6	<i>B. infantis</i> (1x10 ¹¹ UFC/g) liofilizada	0,04	6	45
	Almidón de patata	0,09	<6	39,25
	Estearato de magnesio	0,41	<6	0,75
	Ácido ascórbico	-	-	15
7	<i>B. infantis</i> (2x10 ¹² UFC/g) liofilizada	0,04	6	15
	<i>L. salivarius</i> (2x10 ¹² UFC/g) liofilizada	0,04	5	15
	Celulosa microcristalina	0,04	<1,5	27
	Sílice pirógena	-	-	2
	Estearato de magnesio	0,41	<6	1
	Ácido ascórbico	-	-	20
	Citrato tricálcico	-	-	20
8	<i>B. infantis</i> (5x10 ¹¹ UFC/g) liofilizada	0,04	6	30
	<i>L. salivarius</i> (5x10 ¹¹ UFC/g) liofilizada	0,04	5	30
	Celulosa microcristalina	0,04	<1,5	23
	Sílice pirógena	-	-	1
	Estearato de magnesio	0,41	<6	1
	Ácido ascórbico	-	-	5

	Gluconato-lactato cálcico	-	-	10
--	---------------------------	---	---	----

Los ejemplos anteriores son composiciones de bacterias deshidratadas preparadas según el siguiente procedimiento. Todas las operaciones se llevan a cabo en un entorno de humedad controlada donde la HR se mantuvo entre el 30 % y el 36 %. La cantidad apropiada de bacterias liofilizadas (preconcentradas a la UFC/g deseada) se añade a la cavidad de mezcla de un mezclador Pharmatech junto con la cantidad apropiada de estabilizador, tal como celulosa microcristalina, almidón de patata o similares. Las bacterias y estabilizadores han sido seleccionados por su baja actividad acuosa y por su bajo contenido acuoso, así como por su tamaño de partículas y densidades similares para permitir una mezcla más eficaz. El espacio libre superior dentro de la cavidad de mezcla se lava abundantemente con gas nitrógeno seco, de modo que los gases del espacio libre superior original se hayan sustituido un total de 10 veces hasta que la HR dentro de la cavidad de mezcla se reduce por debajo del 20 %. Después, la cavidad de mezcla se sella con una tapa hermética al aire y los polvos se mezclan entre sí durante 20 minutos a una velocidad de rotación de 60 rpm. Una vez haya finalizado la mezcla, la estabilidad de la mezcla de polvos puede mantenerse garantizando que los polvos no se expongan a una HR alta (más del 36 % de HR) o a entornos ricos en agua. Los polvos mezclados en seco pueden envasarse en cápsulas de gelatina en un entorno de HR baja/nitrógeno y almacenarse en recipientes sellados o como polvos secos en bolsitas o recipientes. Las cápsulas y los polvos resultantes contenidos en su interior han mejorado su estabilidad a largo plazo, tanto a temperaturas bajas (4 °C), como a temperatura ambiente (25 °C).

En otra realización, las composiciones de bacterias deshidratadas de los Ejemplos 1 a 8 pueden envasarse en dosis unitarias, tales como cápsulas o bolsitas, en un entorno de humedad relativa (HR) baja/nitrógeno (<36 %). Los Ejemplos 9 a 11 demuestran ejemplos no limitativos de composiciones de dosis unitarias envasadas en cápsulas y dentro de cápsulas. Las cápsulas están destinadas a ingerirse enteras como una dosis única. Los Ejemplos 12 a 14 son ejemplos no limitativos de composiciones de dosis unitarias envasadas en bolsitas, que proporcionan un número mayor de bacterias por dosis si se compara con las cápsulas.

Ejemplo	Formato de envase	Composición de bacterias deshidratadas	UFC por dosis
9	Cápsula de gelatina	100 mg del ejemplo 1	2,5 x 10 ¹¹
10	Cápsula de HPMC	180 mg del ejemplo 2	4,5 x 10 ⁸
11	Cápsula de gelatina	250 mg del ejemplo 5	1 x 10 ¹²
12	Bolsita	2 g del ejemplo 7	1,2 x 10 ¹²
13	Bolsita	5 g del ejemplo 8	1,5 x 10 ¹²
14	Bolsita	1 g del ejemplo 4	4 x 10 ¹²

Los Ejemplos 15 a 17 son ejemplos de composiciones de complementos de yogur que comprenden la bifidobacteria probiótica *Bifidobacterium globosum*.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 15	Ej. 16	Ej. 17
Leche	38	42	48
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico NCIMB 41052 (1 x 10 ¹⁰ UFC/g)	4	5	6

Los Ejemplos 18 a 20 son ejemplos de métodos de composiciones de comercialización que comprenden *bifidobacterias* probióticas.

Ejemplo n.º	Composición para su venta	Información
18	Las cápsulas de gelatina del Ejemplo 9 están envasadas en un frasco y se ofrecen para su venta a posibles consumidores en un muestrario de la sección de cosméticos de una farmacia	El impreso adjunto al frasco indica que el consumo de las cápsulas puede ayudar a hacer que el cabello luzca más brillante y vigoroso
19	Las bolsitas del Ejemplo 14 se ofrecen para su venta a posibles consumidores en un muestrario de la sección de cosméticos de un herbolario	Un anuncio de televisión indica que la administración oral de las bolsitas puede ayudar a reducir los signos visibles del envejecimiento de la piel y puede ayudar a que las uñas sean menos quebradizas

20	Los complementos de yogur del Ejemplo 17 están envasados en recipientes y se ofrecen para su venta a posibles consumidores en un muestrario de la sección de complementos dietéticos de un supermercado	Un anuncio impreso en una revista indica que el consumo del complemento de yogur puede ayudar a reducir la descamación del cuero cabelludo
-----------	---	--

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de *bifidobacterias* probióticas administradas por vía oral que tienen el número de registro NCIMB 41003 para la regulación cosmética de los signos de envejecimiento como consecuencia de poros de tamaño grande; y/o para la reducción cosmética de la descamación de la piel y/o del cuero cabelludo.
- 10 2. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uso implica el consumo oral por parte del humano y en donde las *bifidobacterias* se administran al humano a una dosis de 1,0E+04 a 1,0E+14 UFC al día.
- 10 3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la administración de 10^6 a 10^{12} de UFC viables al día.
- 15 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el humano puede recibir las bacterias *Bifidobacteria* en cualquier forma viable, o como células destruidas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de la fermentación de las *bifidobacterias* o cualquier mezcla de los mismos.
- 20 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las *bifidobacterias* probióticas se administra diariamente por vía oral, preferiblemente diariamente durante al menos, o aproximadamente, tres meses, y más preferiblemente durante al menos, o aproximadamente, un año.
- 25 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las bacterias *Bifidobacteria*, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se utilizan para preparar una composición destinada a regular el aspecto cosmético del tejido queratinoso humano.
- 25 7. El uso según la reivindicación 6, en donde la composición comprende un prebiótico, en donde “prebiótico” significa sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del humano y estimulan el crecimiento o desarrollo de las *bifidobacterias* en el tracto gastrointestinal del humano a expensas de las bacterias patógenas.