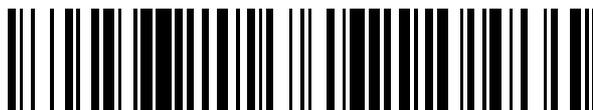


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 646**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/55** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/FR2013/052555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13815019 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2911680**

54 Título: **Utilización de un extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas de lino, como agente activo antimicrobiano**

30 Prioridad:

**26.10.2012 FR 1260235**

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

**31.05.2018**

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENT INC. (100.0%)  
1011 Centre Road, Suite 315  
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**BOTTO, JEAN-MARIE;  
DOMLOGE, NOUHA y  
PORTOLAN, FRÉDÉRIQUE**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 670 646 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**

Utilización de un extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas de lino, como agente activo antimicrobiano

5 **[0001]** La presente invención se sitúa en el campo cosmético y farmacéutico y, específicamente, en el campo de la dermatología. La presente invención se refiere a un extracto de lino para su utilización para la protección de la piel y de las faneras de los ataques microbianos.

10 **[0002]** La invención se refiere, además, a un extracto de lino para su utilización para aumentar el índice de expresión de péptidos antimicrobianos.

**[0003]** El término “faneras” de acuerdo con la invención, engloba todos los apéndices de queratina presentes en la superficie del cuerpo, en concreto, el vello, las pestañas, las cejas, las uñas y el cabello.

15 **[0004]** La función principal de la epidermis es garantizar una barrera protectora entre el organismo y el entorno exterior. En la epidermis, hay dos tipos de barreras en riesgo: una barrera física formada por la piel que se logra gracias a la sólida cohesión intercelular (desmosomas, uniones estrechas) y la resistencia a la abrasión de las células queratinizadas, y una barrera química formada por las secreciones de la piel (sebo, sudor) que permite luchar contra los alérgenos y los irritantes y posee una función antibacteriana gracias al pH ácido de la capa córnea y a la presencia de enzimas hidrolíticas y de péptidos antimicrobianos. Las células del sistema inmunitario forman una tercera barrera defensiva capaz de eliminar los microorganismos que hubieran logrado pasar a través de la epidermis.

25 **[0005]** La piel, en contacto directo con el entorno exterior, se expone a numerosos microorganismos que invaden las capas superficiales de la epidermis y las partes anexas (los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas). La piel mantiene un ecosistema estable, favorable para determinados microorganismos cuyas necesidades de crecimiento son compatibles con las condiciones locales. En la piel humana, pueden encontrarse más de mil especies de bacterias y su cifra total se calcula en  $10^{12}$  bacterias. La flora microbiana cutánea de un sujeto sano es una flora microbiana comensal que comprende la flora cutánea residente y la flora cutánea transitoria.

30 **[0006]** La flora cutánea residente es dominada por las especies Gram positivas, especialmente las bacterias del género *Staphylococcus* (por ejemplo, *S. epidermidis*), *Corynebacterium* (por ejemplo, *C. minutissimum*) y *Propionibacterium*, (por ejemplo, *P. acnes*). Otras bacterias de la flora residente son, por ejemplo, diversos micrococcos o el género *Brevibacterium*.

35 **[0007]** La flora cutánea transitoria es más polimorfa y puede constar de gérmenes potencialmente patógenos, procedentes del tubo digestivo o de la nasofaringe o incluso del medio ambiente. Comprende los enterococos, el *Staphylococcus aureus* y bacterias gram negativas (especialmente acinetobacterias, enterobacterias, Pesudomonas) y hongos (por ejemplo, *C. Albicans*).

40 **[0008]** Las bacterias de la flora microbiana transitoria permanecen, por lo general, un periodo breve en la piel, donde el entorno les es poco favorable. Sin embargo, pueden comportarse como patógenos oportunistas y provocar infecciones en los individuos que presentan sistemas de defensa debilitados, por ejemplo, en el caso de las enfermedades sistémicas (pacientes inmunodeprimidos, diabéticos) o en el caso de una alteración de la función barrera de la piel (psoriasis o dermatitis atópica).

45 **[0009]** Cualquier herida en la piel conduce a un debilitamiento de sus medios de defensa naturales. Por lo tanto, la piel es sensible a ataques de microorganismos patógenos. Además, las floras microbianas cutáneas residentes o transitorias pueden, por lo tanto, comportarse como patógenos oportunistas, invadir la herida y, si las condiciones son favorables, provocar un proceso infeccioso local y/o sistémico.

50 **[0010]** La flora microbiana comensal cutánea interviene en el mantenimiento del ecosistema y de la salud de la piel participando en la función barrera química de la piel. En efecto, los gérmenes residentes de la piel cumplen una función importante en la resistencia a la colonización de la piel por parte de microorganismos patógenos, puesto que compiten por el espacio y los alimentos con las bacterias patógenas, y liberan sustancias antibacterianas (inhibidoras, creación de condiciones de pH desfavorables o modificación de receptores) que hacen que el crecimiento de las bacterias patógenas sea más lento y estimulan de manera continua el sistema inmunitario, lo que permite la regulación de la flora bacteriana de la piel y de las faneras.

55 **[0011]** Además, los queratinocitos y los sebocitos intervienen, asimismo, en el equilibrio de la flora cutánea residente y protegen a la piel de los microorganismos patógenos con la expresión, entre otros, de los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés). Los AMP son una familia de polipéptidos de menos de 100 aminoácidos que presentan un espectro de actividad contra los microorganismos patógenos amplio, que

comprende las bacterias, los hongos, los virus envueltos y los protozoarios. Los mecanismos de acción de los AMP comprenden una actividad antimicrobiana directa y la iniciación de una respuesta huésped que implica la liberación de citoquinas, la inflamación, la angiogénesis y la reepitelización. El mecanismo de la actividad antimicrobiana directa de los AMP consiste en su fijación en la membrana de los microorganismos diana en forma de poros multiméricos, lo que conduce a la lisis de los microorganismos diana.

**[0012]** En los humanos, hay dos grupos de AMP que la piel expresa principalmente: las defensinas (DEFB) y catelicidina epiteliales, que son mediadores catiónicos del sistema inmunitario innato no específico.

**[0013]** La catelicidina humana hCAP18 es un propéptido inactivo. Su fragmento C-terminal LL37 presenta una actividad antimicrobiana con un espectro de acción amplio y modula la respuesta inmunitaria. En la epidermis, las calicreínas, enzimas primordiales implicadas en el proceso de descamación, son responsables de la maduración de la catelicidina en LL-37 de forma postranscripcional.

**[0014]** Las defensinas son pequeños péptidos catiónicos de menos de 50 aminoácidos expresados en forma de prepropéptidos precursores. La familia de las defensinas puede dividirse en dos grupos: las  $\alpha$ -defensinas (que se encuentran en los neutrófilos y las células de Paneth del intestino delgado) y las  $\beta$ -defensinas expresadas en la superficie de las células epiteliales. Seis  $\beta$ -defensinas nombradas DEFB1 a 6 se han identificado en los tejidos humanos, de entre las cuales, las DEFB 1, 2 y 3 se expresan en la piel. Las DEFB 1, 2 y 3 se expresan de manera constitutiva por parte de los queratinocitos de las capas superiores de la piel sana y participan en la barrera química de la piel e inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos y su invasión de la superficie de la piel.

**[0015]** En este contexto, las propiedades de los AMP se vuelven particularmente interesantes para reforzar la función protectora de la piel contra los ataques microbianos y para favorecer el equilibrio de la microflora residente de la piel.

**[0016]** Un determinado número de sustancias introducidas en productos cosméticos o farmacéuticos con aplicación tópica ha visto la luz. En los documentos de patente US 2009/0005300 y US 2010/0215591 se describen AMP naturales o sintéticos, así como su utilización como antimicrobianos en composiciones farmacéuticas o cosméticas. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevos ingredientes que permiten proteger la salud y la integridad de las funciones de la piel. Además, sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevos ingredientes para mejorar el aspecto estético de la piel, especialmente para las personas que tienen pieles sensibles e irritables.

**[0017]** La presente invención tiene como objetivo ofrecer un agente activo que presenta la ventaja de ser de origen natural y que permite proteger la flora microbiana comensal de la piel. Los inventores han demostrado una actividad antimicrobiana de un extracto de lino, descrito en la presente invención. Especialmente, se ha demostrado que este extracto de lino, cuando se aplica en la piel, presenta una gran actividad protectora contra la flora bacteriana comensal de la piel y los ataques por parte de los agentes infecciosos que provocan reacciones de irritación de la piel.

**[0018]** Este nuevo principio activo, capaz de aumentar el índice de expresión de los AMP de la piel permite, de esta manera, dar paso a nuevas perspectivas cosméticas y terapéuticas.

**[0019]** De acuerdo con un primer aspecto, se describe un extracto de lino como agente activo antimicrobiano. La invención y las ventajas que se derivan de la misma se comprenderán mejor con la lectura de la descripción.

**[0020]** La invención se dirige a los mamíferos en general y, más en concreto, a los seres humanos.

**[0021]** El término "antimicrobiano" o "protección de los ataques microbianos" hace referencia a la muerte de los microorganismos, a la inhibición de su crecimiento o a la prevención de su crecimiento. "La inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos" significa la reducción del crecimiento de los microorganismos patógenos, por ejemplo, en términos de reducción del número de colonias y/o del tamaño de las colonias de microorganismos patógenos, mientras que el término "prevención del crecimiento de los microorganismos" indica la interrupción del crecimiento de los microorganismos.

**[0022]** Por "microorganismos" o "microbios" se entiende cualquier organismo comprendido en los campos filogenéticos de las arqueas o de las bacterias, así como los hongos unicelulares y filamentosos (por ejemplo, las levaduras), las algas unicelulares o filamentosas, los parásitos unicelulares y pluricelulares y los virus.

**[0023]** De acuerdo con determinadas características particulares definidas en las reivindicaciones, la invención se refiere a un extracto de lino para su utilización para la protección de la piel y de las faneras de los ataques microbianos.

**[0024]** La utilización del extracto de lino o de una composición que lo comprenda en pieles que presentan la función

barrera química alterada o un debilitamiento del sistema inmunitario local, permitirá a la piel y a las faneras estar protegidas y resistir mejor a los ataques por parte de microorganismos patógenos u oportunistas.

5 **[0025]** De acuerdo con determinadas características particulares, se describe un extracto de lino para su utilización para aumentar el índice de expresión de péptidos antimicrobianos.

10 **[0026]** Preferiblemente, se describe un extracto de lino para aumentar el índice de expresión celular de defensas y/o de catelicidina. De acuerdo con determinadas características particulares, se describe un extracto de lino para su utilización para estimular las defensas inmunitarias de la piel. De acuerdo con determinadas características particulares, la invención se refiere a un extracto de lino para su utilización para el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* de la piel y de las faneras.

15 **[0027]** La invención también se refiere a un extracto de lino para su utilización para el tratamiento de las dermatitis atópicas y/o el acné rosácea de la piel.

**[0028]** El acné rosácea es una afección de la piel cuya causa es de origen bacteriano, eventualmente asociada con un terreno que vuelve vulnerables los sistemas de protección de la piel. La dermatitis atópica es también una afección de la piel, en la que la expresión de la catelicidina disminuye anormalmente.

20 **[0029]** De forma ventajosa, el extracto de lino para su utilización de acuerdo con la invención permite estimular la producción de AMP de tipo catelicidina por parte de las células de la piel, sin provocar reacciones tóxicas o alérgicas de la piel.

25 **[0030]** De acuerdo con un segundo aspecto, se describe la utilización de un extracto de lino para reforzar la función barrera química de la piel y de las faneras. Por "reforzar la función barrera química", se entiende que la aplicación en pieles sanas y/o pieles sensibles de un extracto de lino o de una composición cosmética que lo comprenda permite aumentar el índice de expresión celular de los AMP. El extracto de lino presenta una acción localizada en la epidermis y permite calmar las irritaciones de la piel de tipo rojez o el malestar de las pieles sensibles.

30 **[0031]** De acuerdo con determinadas características particulares, se describe la utilización de un extracto de lino para proteger la flora microbiana comensal y/o para limitar el desequilibrio de la flora microbiana comensal de la piel y de las faneras. De forma ventajosa, la utilización cosmética del extracto de lino de acuerdo con la invención permite mantener una función barrera química correcta de la piel y estimular localmente en la epidermis la expresión de AMP, lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio y las condiciones favorables del ecosistema de la microflora comensal de la piel.

35 **[0032]** El extracto de lino utilizado de acuerdo con la invención se define en las reivindicaciones. El extracto de lino procede de la hidrólisis de las proteínas de lino.

40 **[0033]** Preferiblemente, el extracto de lino contiene al menos entre 0,1 y 5 g/l de compuestos de naturaleza peptídica de extracto seco en peso, entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso y comprende fundamentalmente compuestos peptídicos de peso molecular inferior a 5 kDa, preferiblemente de peso molecular inferior a 2,5 kDa.

45 **[0034]** El término «péptido» indica un encadenamiento de dos o varios aminoácidos ligados entre sí por medio de enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados; el término "polipéptido" indica un péptido de tamaño más grande; el término "compuestos peptídicos" indica los fragmentos de proteínas, los péptidos y los aminoácidos libres presentes en la mezcla.

50 **[0035]** El término "hidrolizado o procedente de la hidrólisis" indica cualquier sustancia o mezcla de sustancias, o preparación aislada, obtenida después de la hidrólisis de materia vegetal.

**[0036]** Para llevar a cabo la extracción, se puede utilizar la planta entera o una parte específica de la planta (hoja, grano, etc.).

55 **[0037]** Más particularmente de acuerdo con la invención, se utiliza una de las numerosas plantas de la familia de las lináceas, del género *Linum* (lino). El género *Linum* abarca casi 200 especies que crecen en todo el hemisferio norte. Se trata de plantas herbáceas con tallos fibrosos, con hojas sueltas y flores con 5 pétalos. Preferiblemente de acuerdo con la invención, se utiliza la especie cultivada *Linum usitatissimum* L. El extracto de lino (*Linum*) de acuerdo con la invención es preferiblemente un extracto peptídico procedente de la hidrólisis de las proteínas extraídas de los granos de lino y preferiblemente el grano separado de su cáscara mediante una etapa de descascarillado.

60 **[0038]** Se puede utilizar cualquier método de extracción o de purificación conocido por el experto en la materia con el fin de preparar el extracto de lino de acuerdo con la invención.

**[0039]** Preferiblemente, el extracto de lino se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

- una etapa de extracción de las proteínas de origen vegetal,
- una etapa de hidrólisis controlada que libera compuestos peptídicos biológicamente activos.

**[0040]** Numerosas proteínas que se encuentran en las plantas son susceptibles de contener compuestos peptídicos biológicamente activos en el seno de sus estructuras. La hidrólisis controlada permite extraer estos compuestos peptídicos. Es posible, aunque no necesario para llevar a cabo la presente invención, extraer primero las proteínas en cuestión y después hidrolizarlas, o realizar la hidrólisis primero sobre un extracto en bruto y después purificar los compuestos peptídicos.

**[0041]** A continuación, se describe un modo particular de aplicar el procedimiento de obtención del extracto de lino de acuerdo con la invención.

**[0042]** En una primera etapa, se tritura la planta con la ayuda de un triturador de plantas. Al polvo así obtenido se le pueden extraer posteriormente los lípidos con la ayuda de un disolvente orgánico tradicional (como, por ejemplo, un alcohol, el hexano o acetona).

**[0043]** En una segunda etapa, se realiza la extracción de las proteínas de la planta siguiendo un procedimiento tradicional. El resultado de la trituración de la planta se pone en suspensión en una solución alcalina que contiene un producto absorbente de tipo polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble (0,01 - 20 %); de hecho, se ha observado que las operaciones de hidrólisis y de purificaciones posteriores se han visto facilitadas por este medio. La concentración de sustancias de tipo fenólicas, que interactúan con las proteínas, resulta muy reducida.

**[0044]** La fracción soluble se recoge después de las etapas de centrifugado y de filtración, constituyendo esta solución bruta una primera forma del extracto que comprende las proteínas, los glúcidos y, eventualmente, lípidos.

**[0045]** De acuerdo con un modo particular de aplicación del procedimiento, las proteínas pueden, después, precipitarse variando la fuerza iónica acidificando el medio, lo que permite eliminar los componentes solubles. A continuación, se lava el precipitado con la ayuda de un disolvente orgánico como, por ejemplo, el etanol o el butanol y, posteriormente, se evapora el disolvente mediante secado al vacío. El precipitado rico en proteínas se introduce nuevamente en solución en el agua o en otro disolvente y constituye, por lo tanto, una forma más purificada del hidrolizado.

**[0046]** La etapa de extracción de las proteínas de la planta puede, de la misma manera, llevarse a cabo en un medio neutro o ácido, siempre en presencia de polivinilpolipirrolidona. Después de una etapa de filtración, puede llevarse a cabo una etapa de precipitación en un modo particular de aplicación, con la ayuda de un agente tradicional de precipitación, tal como las sales (cloruro de sodio, sulfato de amonio) o un disolvente orgánico (alcohol, acetona). El precipitado obtenido puede separarse de los agentes de precipitación mediante diálisis después de volver a ponerse en solución en agua u otro disolvente.

**[0047]** La fracción soluble, que comprende las proteínas, glúcidos y, a veces lípidos, se recoge tras las etapas de centrifugado y filtración. Esta solución bruta se hidroliza a continuación en condiciones controladas para generar compuestos peptídicos, polipéptidos y péptidos solubles. La hidrólisis se define como una reacción química que implica la escisión de una molécula por medio de agua, pudiéndose realizar esta reacción en un medio neutro, ácido o básico. De acuerdo con la presente invención, la hidrólisis se lleva a cabo por vía química y/o de manera ventajosa gracias a enzimas proteolíticas.

**[0048]** De acuerdo con determinadas características particulares, la hidrólisis se lleva a cabo mediante una proteasa o una mezcla de proteasas y/o una celulasa o una mezcla de celulosas.

**[0049]** De acuerdo con algunas características preferidas, se utiliza una mezcla de enzimas que comprende:

- endoproteasas de origen vegetal (por ejemplo, papaína, bromelaína, ficina, etc.) y/o procedentes de microorganismos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Alcalase*® etc.),
- y/o una celulasa o una mezcla de celulosas (por ejemplo, Celluclast® CL).

**[0050]** De forma ventajosa, las celulosas permiten una mejor hidrólisis de la pared celular del lino, lo que aumenta la accesibilidad a las proteínas y facilita la filtración. De hecho, las celulosas permiten la hidrólisis de las paredes celulares en oligosacáridos de pequeño tamaño. La acción conjunta de las celulosas y de las proteasas produce la obtención de polipéptidos de bajo peso molecular, inferior a 5 kDa y, más particularmente, una fracción

importante inferior a 2,5 kDa. Una vez se hayan llevado a cabo estas diferentes hidrólisis, es necesaria una etapa de desactivación térmica para inactivar estas enzimas.

5 **[0051]** Por el mismo motivo que previamente, es decir, la eliminación de sustancias polifenólicas, se añade una cantidad de polivinilpolipirrolidona al medio reactivo en el transcurso de esta etapa de hidrólisis controlada.

10 **[0052]** Después de la filtración, la solución obtenida constituye una primera forma ventajosa de extracto peptídico de lino de acuerdo con la invención. El extracto peptídico de lino todavía puede purificarse con el fin de seleccionar los pesos moleculares y la naturaleza de los péptidos generados. El fraccionamiento puede llevarse a cabo, de forma ventajosa, mediante ultrafiltración y/o mediante un método de tipo cromatográfico.

15 **[0053]** La utilización de extractos peptídicos, y en particular de extractos peptídicos de bajo peso molecular, presenta numerosas ventajas en cosmética. Además del hecho de generar compuestos peptídicos que no existían previamente en la mezcla de proteínas de partida, la hidrólisis y la purificación permiten obtener una mezcla de compuestos peptídicos más estable, una composición con mayor facilidad de reproducción y que no provoca reacciones alérgicas en cosmética.

20 **[0054]** De acuerdo con determinadas características particulares, el extracto de lino de acuerdo con la invención comprende fundamentalmente compuestos peptídicos de bajo peso molecular. Preferiblemente, el extracto peptídico de lino de acuerdo con la invención comprende fundamentalmente compuestos peptídicos de peso molecular inferior a 2,5 kDa.

25 **[0055]** A continuación, cualquiera de las formas más o menos purificadas del hidrolizado se solubiliza en agua o en cualquier mezcla que contiene agua y, entonces, se esteriliza mediante ultrafiltración.

30 **[0056]** El extracto de lino se analiza cualitativamente y cuantitativamente en relación con sus características fisicoquímicas y su contenido en compuestos peptídicos. Por compuestos peptídicos, se hace referencia a los fragmentos de proteínas, los péptidos y los aminoácidos libres presentes en la mezcla. Los péptidos, aminoácidos y fragmentos de proteínas se dosifican de acuerdo con técnicas tradicionales, conocidas por el experto en la materia.

35 **[0057]** Por lo tanto, de acuerdo con un modo de realización ventajoso de la invención, el extracto de lino presenta un pH comprendido entre 4 y 5, y preferiblemente, entre 4 y 4,5. De forma ventajosa, este pH ácido favorece la disolución de las proteínas en agua y estabiliza las proteínas. El extracto de lino de acuerdo con la invención presenta un peso en seco de entre 0,1 y 8 g/l y, preferiblemente, de entre 0,1 y 5 g/l, y comprende:

- entre 0,1 y 5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso,
- y entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso,

40 **[0058]** A continuación, se diluye el extracto en agua o en cualquier mezcla de disolvente que contiene agua y, después, se esteriliza mediante filtración esterilizadora (0,2 µm).

45 **[0059]** De acuerdo con determinadas características particulares, el extracto se diluye en uno o varios disolventes fisiológicamente adaptados, tales como agua, glicerol, etanol, propanodiol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes. Por "fisiológicamente adaptado", se entiende que el disolvente elegido es adecuado para entrar en contacto con la piel sin provocar reacciones de toxicidad o intolerancia.

50 **[0060]** Preferiblemente, después de la dilución del extracto de lino de acuerdo con comprende:

- entre 1,5 y 3,5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso,
- y entre 0,3 g/l de azúcares de extracto seco en peso,

55 **[0061]** El contenido de azúcares es, todavía más preferiblemente inferior a 0,3 g/l en el extracto de lino de acuerdo con la invención.

60 **[0062]** Después de esta etapa de dilución, el extracto puede encapsularse o incluirse en un vector cosmético o farmacéutico, tal como un liposoma o cualquier otra microcápsula utilizada en el campo de la cosmética o adsorberse en polímeros orgánicos en polvo, sustratos minerales como los talcos y bentonitas y, más generalmente, solubilizarse en cualquier vector fisiológicamente adaptado o fijarse sobre cualquier vector fisiológicamente adaptado.

**[0063]** El extracto de lino puede utilizarse en una composición cosmética o farmacéutica. La composición puede comprender una cantidad de extracto de lino necesario con el fin de obtener el resultado deseado, a saber: proteger

a la piel y a las faneras de los ataques microbianos, proteger a la flora bacteriana de la piel y de las faneras, estimular las defensas inmunitarias de la piel y estimular la expresión de los AMP.

5 **[0064]** De acuerdo con un modo de realización, la composición comprende un extracto de lino destinado a utilizarse en la protección de la flora microbiana comensal y/o la limitación del desequilibrio de la flora microbiana comensal de la piel y de las faneras. El extracto de lino presente en la composición de acuerdo con la invención contiene, más particularmente, al menos entre 0,1 y 5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso, entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso y comprende, fundamentalmente, compuestos peptídicos de peso molecular inferior a 5 kDa. La composición de acuerdo con la invención se aplica, preferiblemente, por vía tópica  
10 en pieles sanas y/o pieles sensibles como agente activo en un disolvente fisiológicamente adaptado.

**[0065]** De acuerdo con un modo de realización ventajoso de la invención, el extracto de lino está presente en la composición en una concentración comprendida entre un 0,0001 % y un 20 % aproximadamente y, preferiblemente, en una concentración comprendida entre un 0,05 % y un 5 % aproximadamente, todavía más  
15 preferiblemente en una concentración comprendida entre un 1 % y un 3 % aproximadamente en relación con el peso total de la composición final.

**[0066]** Las composiciones se pueden aplicar por cualquier vía adecuada, en particular, oral, parenteral o tópica externa, y sus formulaciones son adaptadas por parte del experto en la materia, en concreto para composiciones  
20 cosméticas o farmacéuticas.

**[0067]** De forma ventajosa, las composiciones están destinadas a una administración por vía tópica cutánea sobre al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo. La composición cosmética de acuerdo con la invención puede utilizarse como producto de cuidados y/o como producto de maquillaje de la piel. Estas composiciones deben, por  
25 lo tanto, contener un medio fisiológicamente adaptado de acuerdo con la invención, es decir, un medio adecuado para una utilización en contacto con la piel o las faneras de un ser humano, sin presentar riesgos de, por ejemplo, toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad o incluso de respuesta alérgica.

**[0068]** Preferiblemente, la composición está destinada a aplicarse por vía tópica sobre al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo y se presenta en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica o aceitosa, emulsión de aceite con agua o de agua con aceite o emulsión múltiple, solución, suspensión, microemulsión, gel acuoso o anhidro, suero o incluso dispersión de gotas, de coloide. Estas composiciones pueden también presentarse en forma de cremas, suspensiones o incluso en polvo, adaptadas para una aplicación sobre la piel, las mucosas, los  
30 labios y/o las faneras. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y presentar aspecto de crema, loción, leche, suero, pomada, crema, pasta, ungüento o espuma. También pueden presentarse en forma sólida, como una barra, un parche o aplicarse sobre la piel en forma de aerosol o de espray. Pueden utilizarse como producto de cuidados y/o como producto de maquillaje de la piel. Estas composiciones pueden también adaptarse a aplicaciones en el cuero cabelludo y/o el cabello y, en concreto, un champú, un acondicionador, una loción para marcar el pelo, una loción tratante, una crema o un gel fijador, una loción para el cabello, una mascarilla, etc. La  
35 composición cosmética de acuerdo con la invención se puede utilizar en particular en los tratamientos que implican una aplicación que va seguida o no de un aclarado, o también en forma de champú. Puede presentarse también en forma de tinte o de rímel para su aplicación al pincel o al peine, en particular en las pestañas, las cejas o el  
40 cabello.

**[0069]** Estas composiciones comprenden, además, cualquier aditivo utilizado, por lo general, en el campo de aplicación contemplado, así como los adyuvantes necesarios para su formulación, tales como codisolventes (etanol, glicerol, alcohol bencílico, humectante...), espesantes, diluyentes, emulsionantes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbedores de olor, aceites esenciales, oligoelementos, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes o aguas termales, etc. Se pueden, por ejemplo, citar polímeros hidrosolubles de tipo polímero natural, tales como los polisacáridos o polipéptidos, derivados celulósicos de tipo metilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, o incluso polímeros sintéticos, polaxámeros, carbómeros, siloxanos, PVA o PVP y, especialmente, los polímeros comercializados por la sociedad Ashland. En cualquier caso, el experto en la materia  
45 cuidará por que dichos adyuvantes, así como sus proporciones se seleccionen de modo que no resulten perjudiciales para las propiedades ventajosas deseadas de la composición de acuerdo con la invención. Estos adyuvantes pueden, por ejemplo, corresponder a entre un 0,01 % y un 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de un 5 % a un 80 % en peso y, preferiblemente, de un 5 % a un 30 % en peso con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición se seleccionarán de entre los utilizados  
50 tradicionalmente en el campo considerado. Por ejemplo, se pueden utilizar en una proporción que oscila entre un 0,3 % y un 10 % en peso, en relación con el peso total de la composición.

**[0070]** Se entiende que el principio activo de acuerdo con la invención se puede utilizar solo o bien en combinación con al menos otro principio activo, en una composición cosmética.

**[0071]** De forma ventajosa, las composiciones utilizables de acuerdo con la invención pueden comprender, además, diversos principios activos destinados a favorecer la acción del agente activo de acuerdo con la invención, sobre todo a la prevención y/o el tratamiento de los desórdenes ligados a la función barrera de la piel o al alivio de la piel.

**[0072]** Se pueden citar, de manera no limitativa, las clases de ingredientes siguientes: otros principios activos peptídicos, extractos vegetales, agentes cicatrizantes, antiedad, antiarrugas, calmantes, antirradicales, anti-UV, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o el metabolismo energético, agentes hidratantes, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, anestésicos, agentes que modulan la diferenciación, la pigmentación o la despigmentación cutánea, agentes que estimulan el crecimiento de las uñas o del cabello, etc. Preferiblemente, se utilizará un agente que presenta una actividad calmante o un agente que estimule la síntesis de macromoléculas dérmicas, o incluso un agente que estimule el metabolismo energético. Más en concreto, el principio activo se elige entre los principios activos peptídicos bioactivos, las vitaminas, los fitoesteroides, los flavonoides, la DHEA y/o uno de sus precursores o uno de sus derivados químicos o biológicos, un inhibidor de metaloproteína o un retinoide.

**[0073]** De acuerdo con un tercer aspecto, se describe un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a proteger la flora microbiana comensal y/o a limitar el desequilibrio de la flora microbiana comensal, caracterizado por que se aplica por vía tópica sobre la piel o las faneras que se han de tratar una composición que comprende un extracto de lino.

**[0074]** De la descripción anterior también se deducen modos de realización particulares de este procedimiento de tratamiento cosmético. Otras ventajas y características de la invención se comprenderán mejor con la lectura de los ejemplos proporcionados a título ilustrativo y no limitativo.

**[0075]** En la figura 1, se muestra en forma de histograma la detección inmunohistoquímica del índice de expresión de las proteínas antimicrobianas DEFB y LL-37 en la piel *ex vivo* tratada o no con el extracto de lino al 1 % durante 24 h.

#### **Ejemplo 1: Preparación de principio activo a partir de lino (*Linum usitatissimum* L.)**

**[0076]** En una primera etapa, se tritura 1 kg de granos de lino (*Linum usitatissimum* L.) pelados en una trituradora de cereales. La harina obtenida (1 kg) se junta con 10 litros de hexano. A continuación, se agita la mezcla 2 horas a temperatura ambiente con el fin de proceder a una extracción de los lípidos de la materia prima. Tras la filtración y el secado al vacío, el polvo así obtenido se pone en suspensión en 800 ml de una solución acuosa alcalina (dilución al 1/10) pH 10 que contiene un 1 % de polivinilpirrolidona (Polycar V ISP). Esta mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir que se solubilizan las fracciones solubles. Tras esta fase de extracción, el medio se clarifica mediante centrifugado y después se filtra en un filtro de placas. Dicho filtrado, que contiene las fracciones solubles del lino, se somete después a una precipitación de las proteínas haciendo variar la fuerza iónica del medio neutro o ácido, lo que permite eliminar los componentes glucídicos solubles, los lípidos y los ácidos nucleicos; el pH del medio se lleva a 3,5. Se elimina el sobrenadante y, a continuación, se lava el precipitado con la ayuda de etanol y, después, se evapora el disolvente mediante secado al vacío.

**[0077]** En esta fase, se obtienen alrededor de 50 gramos de polvo de color amarillo claro de extracto proteico bruto, que contiene:

- Proteínas: 78 %
- Glúcidos: 20 %
- Lípidos < 2 %

**[0078]** El precipitado rico en proteínas se introduce nuevamente en solución en 500 gramos de agua.

**[0079]** El extracto proteico en bruto se somete entonces a una serie de hidrólisis enzimáticas controladas y selectivas en presencia de un 0,5 % de PVPP (Polycar V) y de endopeptidasas de cisteína (2 g/l bromelaína y 2 g/l alcalasa). Después de 2 horas de reacción a 50 °C y la desactivación del cóctel enzimático durante 2 horas a 80 °C, se filtra el hidrolizado en placas de porosidad decreciente y, después, en cartucho esterilizador (0,2 µm).

**[0080]** A continuación, se obtiene un hidrolizado de color claro, con un extracto seco de entre 15 y 30 g/l, que se diluye a continuación de manera que la concentración de compuestos peptídicos determinada mediante el método de Lowry esté comprendida entre 0,1 y 5 g/l y, preferiblemente, entre 1,5 y 3,5 g/l. El análisis fisicoquímico del hidrolizado vegetal, que constituye el principio activo, muestra que su pH está comprendido entre 4 y 5 y, preferiblemente, entre 4 y 4,5. El extracto de lino de acuerdo con la invención presenta un extracto seco de entre 1 y 8 g/l, preferiblemente, entre 0,1 y 5 g/l y comprende entre 0,1 y 5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco

en peso y entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso, preferiblemente el extracto de lino de acuerdo con la invención se diluye para contener entre 1,5 y 3,5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso y entre 0,1 y 0,3 g/l de azúcares de extracto seco en peso.

5 **Ejemplo 2: Demostración del efecto activador del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre el índice de expresión de los ARN mensajeros de DEFB1 y de LL37 en los queratinocitos**

10 **[0081]** El objetivo de este estudio es determinar la influencia del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión del transcrito de DEFB1 y sobre la expresión del transcrito de LL-37. Para estimar el índice de expresión del ARN mensajero de DEFB1 y el índice de expresión del ARN mensajero de LL-37, se han llevado a cabo cuantificaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real.

15 Protocolo:

**[0082]** Se tratan células NHK (queratinocitos humanos primarios normales) con el extracto de lino al 1 % de acuerdo con el ejemplo 1, dos veces al día, durante 48 horas o no se tratan (control).

20 **[0083]** Con el fin de estimar el índice de expresión del ARN mensajero de DEFB1 y el de expresión del ARN mensajero de LL-37, se han de aislar los ARN totales de los queratinocitos en cultivo, tratados o no con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1. A continuación, se transforman los ARN totales en ADN complementarios mediante la acción de una enzima transcriptasa inversa. A continuación, se lleva a cabo una cuantificación de los ADN complementarios mediante PCR en tiempo real con la ayuda de un termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Esta cuantificación permite determinar el índice de expresión de los ARN mensajeros de DEFB1 y el índice de expresión de los ARN mensajeros de LL-37.

25 Resultados:

30 **[0084]** Se observa un aumento de un 31 % del índice de expresión del ARN mensajero de DEFB1 y un aumento de un 23 % del índice de expresión del ARN mensajero de LL-37 en las células después de 48 horas de tratamiento con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con las células no tratadas.

Conclusión:

35 **[0085]** El extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 aumenta el índice de expresión del ARN mensajero codificador de DEFB1 y el índice de expresión del ARN mensajero codificador de LL-37, en los queratinocitos humanos normales.

40 **Ejemplo 3: Demostración del efecto activador del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y sobre la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37 en los queratinocitos**

45 **[0086]** El objetivo de este estudio es determinar la influencia del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37. A tales efectos, se ha estimado el índice de expresión de la proteína DEFB1 y el índice de expresión de la proteína LL-37 mediante inmunocitoquímica sobre queratinocitos tratados durante 24 horas con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 al 1 % o sin tratamiento (control) e incluidos en parafina.

50 Protocolo:

**[0087]** Se cultivan células NHK (queratinocitos humanos primarios normales). A continuación, estas células se fijan con formol al 10 % y, después, se incluyen en parafina. A continuación, se corta el bloque celular en secciones de 4 µm de grosor con un microtomo y, a continuación, se transfieren a un portaobjeto.

55 **[0088]** Se desparafinan las secciones en xileno al 100 % y, más tarde, se vuelven a hidratar con baños de alcohol sucesivos: 2 baños de etanol (EtOH) al 100 % durante 2 minutos, 1 baño de EtOH al 95 % durante 2 minutos, 1 baño de EtOH al 90 % durante 2 minutos y 1 baño de H<sub>2</sub>O durante 5 minutos. Se sumergen los portaobjetos en un tampón de ácido cítrico a 0,01 M pH 6 y se calientan con ligera ebullición con el fin de facilitar el acceso del anticuerpo a la proteína de interés. Se incuban las secciones con un 5 % de ASB durante 30 minutos y, después, con el anticuerpo primario: anticuerpo policlonal de conejo anti-"DEFB" ab14425 (Abcam, Cambridge, RU), diluido al 1/500 en PBS o anticuerpo monoclonal de ratón anti-"LL-37" sc-166770 (Tebu Santa Cruz, California, EE. UU.) diluido al 1/75 en PBS durante 1 hora y media con agitación y a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS, se incuban las secciones con el anticuerpo secundario fluorescente (Anticuerpo Alexa Fluor 488 anticonejo A21206 (Invitrogen, Fisher) diluido al 1/1000 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se marcan con 0,3 µM de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes). Se aclaran las

secciones durante 5 minutos en PBS. La expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y de la proteína antimicrobiana LL-37 se detecta por medio de un microscopio de fluorescencia (objetivo 40x).

Resultados:

**[0089]** Los resultados muestran que hay un aumento de un 118 % de la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y un aumento de un 136 % de la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37 en queratinocitos tratados con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 al 1 % después de 24 horas, en comparación con queratinocitos no tratados.

Conclusión:

**[0090]** El extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 estimula la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37 en los queratinocitos.

**Ejemplo 4: Demostración del efecto activador del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y sobre la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37 en la piel ex vivo**

**[0091]** El objetivo de este estudio es determinar la influencia del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre la expresión de DEFB1 y sobre la expresión de LL-37. Para estimar el nivel de expresión de DEFB1 y de LL-37, se ha llevado a cabo un inmunomarcaje de DEFB1 y de LL-37 en secciones de piel *ex vivo*.

Protocolo:

**[0092]** Biopsias de piel humana se mantienen en cultivo *ex vivo* y después se tratan dos veces al día durante 24 horas mediante aplicación tópica de 20 µl de una solución al 1 % del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 o no se tratan.

**[0093]** A continuación, las biopsias de piel se fijan y después se incluyen en parafina tras pasar por un mecanismo Shandon Hypercenter XP (Shandon, RU). A continuación, las biopsias de piel incluidas en parafina se cortan en secciones de 4 µm de grosor con un microtomo y se transfieren a un portaobjeto. Se desparafinan las secciones en xileno al 100 % y, más tarde, se vuelven a hidratar con baños de alcohol sucesivos: 2 baños de etanol (EtOH) al 100 % durante 2 minutos, 1 baño de EtOH al 95 % durante 2 minutos, 1 baño de EtOH al 90 % durante 2 minutos y 1 baño de H<sub>2</sub>O durante 5 minutos. Se sumergen los portaobjetos en un tampón de ácido cítrico a 0,01 M pH 6 y se calientan con ligera ebullición con el fin de facilitar el acceso del anticuerpo a la proteína de interés. Se incuban las secciones con un 5 % de ASB durante 30 minutos y, después, con anticuerpo primario: anticuerpo policlonal de conejo anti-"DEFB1" ab14425 (Abcam, Cambridge, RU), diluido al 1/500 en PBS o anticuerpo monoclonal de ratón anti-"LL-37" sc-166770 (Tebu-Santa Cruz, California, EE. UU.) diluido al 1/100 en PBS durante 1 hora y media con agitación y a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS, se incuban las secciones con el anticuerpo secundario fluorescente (Anticuerpo Alexa Fluor 488 anticonejo A21206 (Invitrogen, Fisher) diluido al 1/1000 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se marcan con 0,3 µM de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes). Se aclaran los portaobjetos durante 5 minutos en PBS. La expresión de la proteína DEFB1 y de la proteína LL-37 se detecta por medio de un microscopio de fluorescencia (objetivo 40x).

Resultados:

**[0094]** La totalidad de los resultados se muestra en la figura 1.

**[0095]** La evaluación de la fluorescencia obtenida en las secciones mediante inmunohistoquímica muestra que las biopsias de piel tratadas con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 presentan un índice superior muy significativo estadísticamente (+240 %) de la expresión de DEFB1 y (+140 %) de la expresión de LL-37 en comparación con las biopsias de piel no tratadas.

Conclusión:

**[0096]** Un efecto positivo en la expresión de la proteína antimicrobiana DEFB1 y en la expresión de la proteína antimicrobiana LL-37 se obtiene después del tratamiento con extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en biopsias de piel humana.

**Ejemplo 5: Demostración del efecto del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre el número y la actividad secretora de los cuerpos lamelares en la piel ex vivo**

**[0097]** El objetivo de este estudio es determinar la influencia del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 sobre

el número de cuerpos lamelares, lugar de conservación de las proteínas antimicrobianas, presentes en la interfaz de las capas granulosas y córneas. Para observar los cuerpos lamelares, se han obtenido imágenes de microscopía electrónica procedentes de sección de piel *ex vivo*.

5 Protocolo:

[0098] Biopsias de piel humana se mantienen en cultivo *ex vivo* y después se tratan una vez al día durante 24 horas mediante aplicación tópica de 20 µl de una solución al 1 % del extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 o no se tratan.

10

[0099] A continuación, las biopsias de piel se fijan con la ayuda del tampón de fijación de Karnovsky (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, RU) durante 1 hora a temperatura ambiente y, después, toda la noche a 4 °C. Después de aclararlas con un tampón de cacodilato de sodio a 0,1 M (Sigma, Steinheim, Alemania), las biopsias se fijan posteriormente en tetróxido de osmio OsO<sub>4</sub> al 1 % durante 1 hora y, después, se aclaran y se deshidratan en baños de alcohol sucesivos. Las muestras se infiltran y se incluyen en una mezcla Epon-Epoxi con poca viscosidad.

15

[0100] Las secciones se llevan a cabo con la ayuda de un microtomo provisto de cuchillo de diamante. A continuación, se tiñen las secciones con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación se lleva a cabo gracias a un microscopio electrónico con transmisión de 60 KeV.

20

Resultados:

[0101] La observación de las imágenes de microscopía electrónica muestra que las biopsias de piel tratadas con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 presentan un número más notable de cuerpos lamelares en la interfaz de las capas granulosas y córneas en comparación con las biopsias de piel no tratadas.

25

Conclusión:

[0102] Un efecto positivo en el número de cuerpos lamelares, lugar de conservación de los péptidos antimicrobianos, se observa como consecuencia del tratamiento con extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en biopsias de piel humana.

30

35 **Ejemplo 6: Demostración del efecto antimicrobiano inducido por el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en los queratinocitos en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus***

[0103] El objetivo de este estudio es determinar el efecto de una síntesis aumentada de proteínas antimicrobianas producida por los queratinocitos como consecuencia de una estimulación mediante el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*. A tal fin, se ha llevado a cabo un ensayo de difusión radial.

40

Protocolo:

[0104] Se tratan células NHK (queratinocitos humanos primarios normales) con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1, dos veces al día, durante 24 horas o no se tratan (control). Con el fin de llevar a cabo un control negativo, se utiliza medio de cultivo de NHK que no ha tenido ningún contacto con las células. El sobrenadante de las células se recupera a continuación y se utilizan 150 µl con el fin de embeber un disco de 6 mm de diámetro. A continuación, se sitúan los discos en un cultivo de *S. aureus* cultivado en la masa (4 discos por condiciones y por placa de Petri). Tras 48 horas, se observa una zona de difusión radial. Se toman fotografías de zonas de inhibición con la cámara QImaging Micropublisher 3.3 RTV y se calculan sus diámetros por medio del programa informático Q-capture Pro7™.

45

50

Resultados:

[0105] Los resultados muestran que hay un aumento de un 19% del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano como consecuencia de la aplicación de sobrenadante procedente de cultivo de queratinocitos tratados con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 al 1 % tras 24 horas, en comparación con queratinocitos no tratados.

55

60 Conclusión:

[0106] El extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 permite una inhibición del crecimiento bacteriano.

60

65 **Ejemplo 7: Demostración del efecto antimicrobiano inducido por el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en los queratinocitos en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus***

**[0107]** El objetivo de este estudio es determinar el efecto de una síntesis aumentada de proteínas antimicrobianas producida por los queratinocitos como consecuencia de una estimulación mediante el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*. A tal fin, se ha llevado a cabo un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Protocolo:

**[0108]** Se tratan células NHK (queratinocitos humanos primarios normales) con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1, dos veces al día, durante 48 horas o no se tratan (control). Con el fin de llevar a cabo un control negativo, se utiliza medio de cultivo de NHK que no ha tenido ningún contacto con las células. El sobrenadante de las células se recupera a continuación y se utilizan 200 µl, que se contaminan mediante una solución de *S. aureus*. Esta mezcla sobrenadante/*S. aureus* se incuba durante 3 horas a 37 °C y, más tarde, se extiende en placas de agar-agar TSA. Después de 48 horas, se desarrollan colonias de *S. aureus* y son visibles a simple vista. Se toman fotografías de las placas con la cámara QImaging Micropublisher 3.3 RTV.

Resultados:

**[0109]** Los resultados muestran que hay un descenso de un 79 % de número de colonias *S. aureus* desarrolladas en la condición en la que el sobrenadante procedía de cultivo de queratinocitos tratados con el extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 al 1 % después de 24 horas, en comparación con queratinocitos no tratados.

Conclusión:

**[0110]** El extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1 permite una disminución del número de colonias bacterianas.

**Ejemplos: Preparación de composiciones**

Crema protectora calmante de día:

**[0111]**

<b>Nombres comerciales</b>	<b>Nombres INCI</b>	<b>% másico</b>
<b>Fase A</b>		
Emulium Delta	Cetyl alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-75 Stearate (and) Ceteth-20 (and) Steareth-20	4,00
Lanette O	Cetearyl Alcohol	1,50
D C 200 Fluid/100cs	Dimethicone	1,00
DUB 810C	Coco Caprylate/Caprato	1,00
DPPG	Propylene Glycol Dipelargonate	3,00
DUB DPHCC	Dipentaerythryl Hexacaprylate/Hexacaprate	1,50
Cegesoft PS6	Vegetable Oil	1,00
Vitamina E	Tocopherol	0,30
<b>Fase B</b>		
Agua desmineralizada	Aqua	c.s.p. 100
Glicerina	Glycerin	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,15
Keltrol BT	Xanthan Gum	0,30
Alantoína	Allantoin	0,5
<b>Fase C</b>		
Hidróxido de sodio (sol. al 10 %)	Sodium Hydroxide	0,30
<b>Fase D</b>		
Agua desmineralizada	Aqua	5,00
Stay-C 50	Sodium Ascorbyl Phosphate	0,50
<b>Fase E</b>		
Butilenglicol	Butylene Glycol	2,00
ROKONSAL MEP	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben	1
Dekaben CP	Chlorphenesin	0,20

## ES 2 670 646 T3

Fase F		
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,00
Extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1		1,5

**[0112]** Preparar la fase A y calentar a 75 °C. Preparar la fase B dispersando el carbopol y después la goma xantana con agitación. Dejar que repose hasta conseguir una homogeneidad perfecta. Calentar B a 75 °C.

- 5 **[0113]** A 75 °C, emulsionar A en B con agitación rotor-estátor. Neutralizar con la fase C con agitación rápida. Después de enfriamiento a 40 °C, añadir la fase D límpida; después la fase E (precalentada a 40 °C y homogeneizada hasta conseguir una limpidez perfecta. Se continúa el enfriamiento con agitación ligera hasta 25 °C y se vuelve a añadir la fase F.

10 2- Leche corporal:

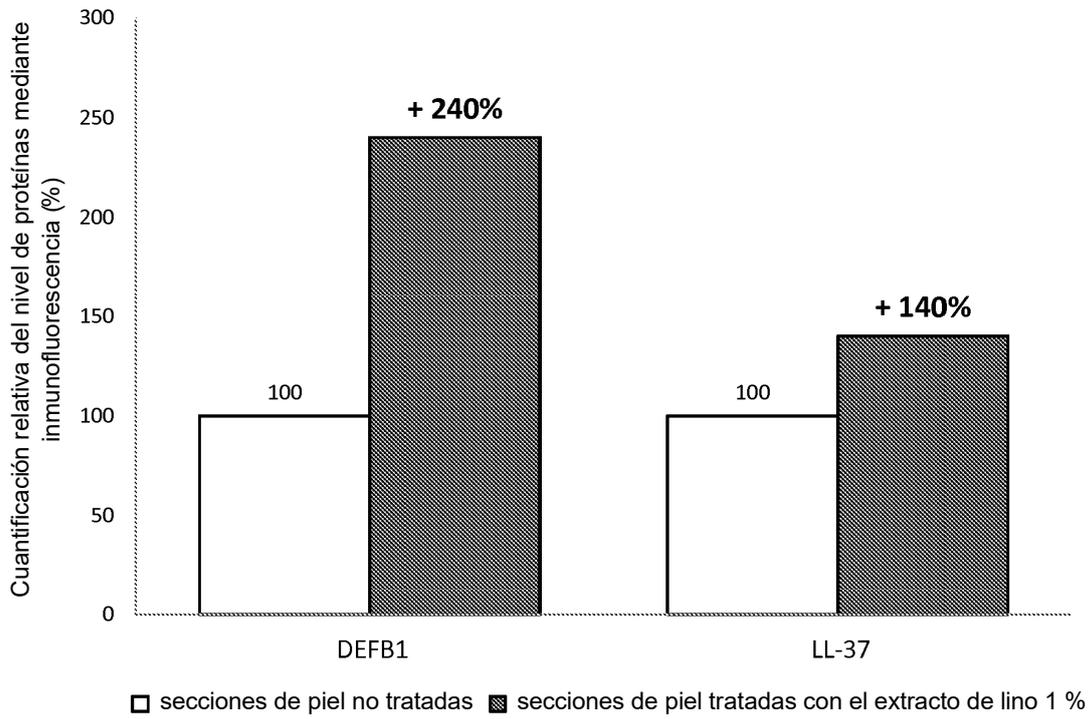
**[0114]**

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Montanov L	C14-22 Alcohols (and) C12-20 Alkyl Glucoside	3,00
Waglinol 2559	Cetearyl Isononanoate	4,00
Tegosoft TN	C12-15 Alkyl Benzoate	3,00
Aceite de huesos de albaricoque	Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil	2,00
Aceite de aguacate	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,00
Abil 350	Dimethicone	1,00
FASE B		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	c.s.p. 100
Alantoína	Allantoin	0,5
FASE C		
Simulgel EG	Sodium Acrylate/Acryloyldimethyl Taurate Copolymer (and) Isohexadecane (and) Polysorbate 80 Copolymer (and) Polysorbate 80	0,4
FASE D		
ROKONSAL MEP	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben	1
Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
Germall 115	Imidazolidinyl Urea	0,20
FASE E		
Extracto de lino de acuerdo con el ejemplo 1		1

- 20 **[0115]** Los constituyentes de la fase A y de la fase B se calientan por separado a entre 70 °C y 75 °C. La fase A se emulsiona en la fase B con agitación. Se añade la fase C a 45 °C con un aumento de la agitación. A continuación, se añaden las fases D y E, cuando la temperatura se sitúa por debajo de 40 °C. Se prosigue con el enfriamiento hasta los 25 °C con fuerte agitación.

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas del lino destinado a utilizarse como agente activo antimicrobiano en el tratamiento de las irritaciones de la piel y de las faneras provocadas por ataques microbianos.
2. Extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas del lino destinado a utilizarse en el tratamiento de la dermatitis atópica.
- 10
3. Extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas del lino destinado a utilizarse en la protección de la piel y de las faneras contra ataques microbianos.
- 15
4. Extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas del lino destinado a utilizarse en el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* de la piel y de las faneras.
- 20
5. Extracto de lino destinado a utilizarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el extracto de lino contiene al menos entre 0,1 y 5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso, entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso y comprende fundamentalmente compuestos peptídicos de peso molecular inferior a 5 kDa.
- 25
6. Extracto de lino procedente de la hidrólisis de las proteínas del lino destinado a utilizarse en la protección de la flora microbiana comensal y/o la limitación del desequilibrio de la flora microbiana comensal de la piel y de las faneras.
- 30
7. Extracto de lino destinado a utilizarse de acuerdo con una de las reivindicaciones 6, **caracterizado por que** el extracto de lino contiene al menos entre 0,1 y 5 g/l de compuestos peptídicos de extracto seco en peso, entre 0,1 y 2 g/l de azúcares de extracto seco en peso y comprende, fundamentalmente, compuestos peptídicos de peso molecular inferior a 5 kDa.
8. Composición que comprende un extracto de lino destinado a utilizarse de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 7, **caracterizado por que** dicha composición se aplica por vía tópica en pieles sanas y/o pieles sensibles como agente activo en un disolvente fisiológicamente adaptado.



**Figura 1** Detección inmunohistoquímica del índice de expresión de las proteínas antimicrobianas DEFB1 y LL-37 en la piel *ex vivo* tratada o no con el extracto de lino al 1 % durante 24 h