

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 348**

21 Número de solicitud: 201830281

51 Int. Cl.:

A61K 8/99 (2007.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

22.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.09.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

11.12.2019

Fecha de concesión:

15.04.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEZQUITA REGUEIRO, Susana;
ELIZARI GALAR, Maialen y
GONZÁLEZ ZORZANO, Eduardo**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

54 Título: **LISADO DE BIFIDOBACTERIUM PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE LOS DAÑOS CUTÁNEOS PRODUCIDOS POR LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO GENERADAS POR LA RADIACIÓN VISIBLE DE ALTA ENERGÍA**

57 Resumen:

Lisado de Bifidobacterium para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por las especies reactivas de oxígeno generadas por la radiación visible de alta energía.

La solicitud se refiere a un lisado de al menos un microorganismo del género Bifidobacterium en cantidad efectiva para su uso en la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por efecto de la radiación visible de alta energía, así como a sus combinaciones con otros activos y composiciones que los comprenden para dicho uso.

ES 2 725 348 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

5 Lisado de *Bifidobacterium* para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por las especies reactivas de oxígeno generadas por la radiación visible de alta energía.

10 La invención se refiere al campo de los cosméticos y / o productos dermatológicos, más particularmente aquellos destinados a la protección de la piel contra la radiación solar y la reparación de sus efectos nocivos. En particular, la invención se refiere al uso de un activo derivado biotecnológicamente para la prevención y el tratamiento de la piel contra el daño celular provocado por la radiación, en particular la radiación visible de alta energía, así como a composiciones cosméticas que lo comprenden.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Es bien sabido que la radiación solar daña la piel humana, por ejemplo causando quemaduras y el envejecimiento prematuro de la piel (es decir, fotoenvejecimiento).

20 Los protectores solares son los principales protectores contra la radiación solar. Pueden reflejar, absorber o dispersar la luz del sol, protegiendo la piel de los efectos nocivos del sol. En general, un protector solar efectivo debe evitar las quemaduras pero también minimizar el daño a la piel debido a la acumulación de la radiación recibida. Existen principalmente tres tipos de filtros empleados en la protección de la radiación solar: filtros físicos, químicos y biológicos. Los filtros físicos son polvos inorgánicos o inertes de pequeñas partículas alrededor de 180-190 nm de diámetro, compuestos por TiO₂, ZnO, óxido ferroso, MgO, mica o talco. Actúan reflejando las radiaciones solares independientemente de su longitud de onda. Los filtros químicos son sustancias químicas sintéticas que actúan absorbiendo la radiación solar. Funcionan como cromóforos que absorben la energía transportada por un fotón
25 incidente, luego vuelven a su estado inicial y liberan energía en exceso como calor (insignificante), radiación fluorescente o transformación química en un fotoproducto de isómero potencialmente reactivo. Los filtros biológicos son sustancias con actividad antioxidante que, cuando se aplican tópicamente, reducen el estrés oxidativo inducido por la radiación UV. Mejoran la protección de los protectores solares tradicionales

35

protegiendo del daño celular que podría ser la causa del fotoenvejecimiento y el cáncer de piel. Son vitaminas (A, C o E), flavonoides (quelante de Fe) y ciertos oligoelementos (actividad de la enzima).

5 Los protectores solares clásicos protegen contra la radiación ultravioleta (UV), en particular, UVB y UVA. La radiación UV (200-400 nm) supone aproximadamente el 6% del espectro de la radiación solar y provoca la destrucción de las fibras de colágeno, así como la producción anormal de fibras elásticas. También promueve alteraciones en la microvascularización dérmica. Dependiendo de la intensidad del rayo, la piel puede sufrir degeneración en su estructura y anormalidades en su proceso de pigmentación normal.

15 La luz UVB causa daño al ADN pero también inhibe la reparación del ADN. Como consecuencia del daño del ADN, se produce una regulación de la IL-10 que, a su vez, conduce a la inhibición de la formación de IL-12. IL-12 es uno de los principales actores involucrados en la orquestación de respuestas inmunes. Mantener el equilibrio IL10 / IL12 es un requisito previo para contrarrestar el fotoenvejecimiento y el daño crónico de la radiación. En particular, la exposición intensiva de la piel a radiación UV conduce a modificaciones de bases de ADN, en particular, a una dimerización de timidina por cicloadición entre dos elementos de timidina adyacentes. Este cambio en la estructura del ácido nucleico puede conducir a la muerte de la célula o al daño celular heredable. El mecanismo natural de reparación del ADN de las células, que se basa en una secuencia de reacción controlada enzimáticamente para cortar los dímeros de timidina fuera de la cadena de ADN y reemplazarlos por monómeros de timidina, posee solo una capacidad limitada y se puede ver superado por el efecto nocivo de la radiación.

20 La solicitud de patente europea EP43128 describe el uso de un lisado de microorganismos tal como un lisado de *Bifidobacterium longum*, para promover la reparación de ADN en células de piel dañadas por exposición a radiación ultravioleta. Se demostró que inhibe la liberación de IL-10 inmunosupresor, que simultáneamente evita la inhibición de IL-12, y permite aumentar la capacidad de reparación del ADN de las células de la piel por el propio cuerpo.

35

Sin embargo, el daño sufrido por la piel no se limita a los daños causados en el ADN. La radiación resulta nociva para la piel por otros mecanismos adicionales, entre los que destaca el estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno.

5

Aproximadamente, el 6% del espectro solar es radiación UV (200-400 nm), el 52% es visible luz (400 - 760 nm) y el 42% restante es radiación infrarroja (760 nm – 10 nm).

10

Se ha descrito que la radiación infrarroja cercana, o infrarrojo A (IRA) posee capacidad de penetrar en capas profundas de la piel. Mientras que la radiación infrarroja de longitudes de onda más largas (IRB e IRC) no penetra profundamente en la piel, más del 65% de la longitud de onda más corta (IRA) alcanza la dermis, atacando directamente a las mitocondrias celulares, responsables del suministro de energía de la célula, de manera que produce un aumento de radicales libres, especialmente especies reactivas de oxígeno (ROS). Cuando los radicales libres se acumulan en la célula, como consecuencia de la respuesta de estrés oxidativo mitocondrial inducida por IRA, entre otras cosas se produce un aumento en la expresión de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y una síntesis reducida de colágeno y elastina.

15

20

Hasta hace poco se pensaba que la luz visible no provocaba daños en las células de la piel. Sin embargo, se ha demostrado que la luz azul o la luz visible de alta energía (HEV), la cual se refiere a longitudes de onda entre 390 y 500 nm, puede penetrar en capas profundas de los tejidos de la piel. Esta penetración profunda produce un ataque directo a las mitocondrias celulares, generando ROS, que producen efectos biológicos nocivos en las células de la piel. Algunos estudios han demostrado que la luz visible puede inducir la disfunción celular y muerte tanto in vitro como in vivo, por acumulación de especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo, el anión superóxido y el singlete de oxígeno, daños que ocurren cuando la luz azul excita los fotosensibilizadores celulares. Así pues, aunque los mecanismos no se comprenden completamente, parece que la radiación visible también está involucrada en el fotoenvejecimiento de la piel, así como en procesos de hiperpigmentación y degradación de la matriz extracelular. Además, la incidencia de este tipo de radiación se debe no sólo a la luz del sol, sino que también se emite desde fuentes de luz artificiales, como dispositivos LED azul.

25

30

35

Por lo tanto, además de filtros solares para bloquear los efectos de la radiación UV o moléculas que ayudan a reparar el ADN dañado debido a la radiación UV, se necesitan nuevas estrategias para bloquear los daños causados por otras radiaciones nocivas del espectro solar o que provengan de fuentes de luz artificial a la que están expuestos los seres humanos y los animales.

Algunas publicaciones describen la prevención de los daños causados por la IRA mediante el uso de combinaciones de antioxidantes (EP2233127) o mediante el uso de un lisado de *Bifidobacterium longum* (ES2629910). Sin embargo, no se han encontrado productos efectivos para prevenir el fotoenvejecimiento de la piel inducida por la luz visible de alta energía.

Así pues, existe la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para evitar el fotoenvejecimiento de la piel de manera más completa, en particular, para prevenir o retrasar, los signos cutáneos del fotoenvejecimiento directamente inducidos por la luz visible de alta energía. En este mismo ámbito, y más allá del aspecto preventivo, es muy deseable desarrollar estrategias para reparar los daños producidos en la piel por la radiación visible de alta energía.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, un lisado de microorganismos del género *Bifidobacterium*, y en particular *Bifidobacterium longum*, protege de los daños causados en la piel por la exposición a la luz visible de alta energía. Este efecto se debe a que el lisado es capaz de reducir considerablemente la generación de ROS por efecto de la incidencia de la luz visible de alta energía. Esto se traduce en una protección eficiente de los signos visibles del daño causado en las células de la piel cuando se aplica antes de la exposición a esta radiación, es decir, previene contra el fotoenvejecimiento directamente causado por la luz visible de alta energía.

Inesperadamente también se ha encontrado que el lisado de *Bifidobacterium longum* ensayado no sólo protege de la radiación visible de alta energía, sino que también

ejerce un efecto reparador de los daños producidos por exposición a la misma. Este efecto se debe a que el lisado reduce la cantidad de especies reactivas de oxígeno que se han generado por la exposición de la piel a la radiación.

5 Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, en cantidad efectiva para su uso en la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía. Más particularmente, el daño en las
10 células de la piel es el fotoenvejecimiento inducido o producido por radiación visible de alta energía.

Este aspecto se puede reformular como el uso de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*,
15 en cantidad efectiva para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía. La invención también se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por
20 efecto de la radiación visible de alta energía en sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*. En particular, el daño en las células cutáneas es el producido por una exposición prolongada a radiación visible de alta energía.

25 El lisado específico de *Bifidobacterium longum* al que hace referencia la presente invención se vende bajo el nombre Repair Complex CLR por la empresa K. Richter GmbH. El Complejo de Reparación se refiere a un lisado registrado bajo el nombre INCI: *Bifidat ferment Lysate*, bajo el nombre EINECS: *Bifidobacterium longum*, bajo los
30 números EINECS: 306-168-4 y bajo el número CAS: 96507-89-0. Es un extracto de Bifidobacterias, que contiene productos de metabolitos, fracciones de citoplasma, constituyentes de la pared celular, así como complejos de polisacáridos. Se vende conservado en parabeno (Repair Complex) o libre de parabenos (Repair Complex PF, RCPF).

35

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 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. 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 US4464362, y EP43128. El 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 US4464362, y EP43128. Cuando se alcanza la fase estacionaria, 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, centrifugación y resuspensión en una solución tampón o en solución NaCl fisiológica estéril. El lisado se puede obtener por medios físicos, por ejemplo, disgregación ultrasónica o mediante prensa francesa, con el fin de liberar sus fracciones citoplasmáticas, los fragmentos de la pared celular y los productos resultantes del metabolismo. También se pueden utilizar enzimas, por ejemplo, lisozima, para la disgregación de la membrana celular. A continuación, todos los componentes en su distribución natural se estabilizan en una solución acuosa débilmente ácida. 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.

35

El lisado se puede usar de diversas formas, en forma de una solución o en forma de polvo, y podría estar liofilizado.

5 El microorganismo que pertenece al 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. La especie preferente es *Bifidobacterium longum*, que resulta ser particularmente adecuada para los fines de la invención.

10

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 *Bifidobacterium 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, no se aísla ninguna fracción en particular, asegurando de este modo la presencia de todos los constituyentes en su distribución natural en el producto Repair Complex CLR PF. Para los fines de la presente invención se pueden usar ambos productos asequibles, el comercializado en forma CLR conservado en parabenos o el comercializado exento de parabenos.

15

20

Según la invención el lisado de *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, es para su uso en la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía. Más particularmente, el daño en las células de la piel es el fotoenvejecimiento.

25

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),

30

35

amarilleado, arrugas profundas, sequedad, telangiectasia, lesiones premalignas, laxitud, atrofia, aspecto de cuero, elastosis (un efecto basto, amarillo, empedrado de la piel), o púrpura actínica (amoratamiento fácil relacionado con fragilidad de la pared vascular en la dermis).

5

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

10

Un una realización particular el lisado es para la prevención de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía y dicha prevención comprende reducir la generación de ROS como consecuencia de la exposición a la radiación. Para los fines de la presente divulgación, el término "prevenir" significa reducir el riesgo de manifestación de un fenómeno. Para obtener este efecto preventivo, el lisado se aplica, preferentemente de forma tópica sobre la piel, antes de exponer la piel a la radiación visible de alta energía. Así pues, una realización particular se refiere al lisado de la invención para la prevención de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía, en particular reduciendo la generación de ROS, donde la prevención comprende la administración tópica de una cantidad efectiva del lisado antes de la exposición a la radiación.

15

20

25

El efecto preventivo del lisado según la invención se muestra en los ejemplos 1 y 2 (figuras 1-4), donde se muestra que la suplementación con Repair Complex en fibroblastos y queratinocitos humanos durante 24 horas antes de someter las células a radiación visible de alta energía redujo significativamente la generación de ROS en dichas células cutáneas en comparación con el control no tratado.

30

En otra realización, el lisado es para el tratamiento de los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación visible de alta energía. 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 consecuencia de esta disfunción. En este caso, el tratamiento comprende reducir la cantidad de ROS generadas por la radiación visible de alta

35

energía. En otras realizaciones de la invención el lisado es, además de para el uso en el tratamiento de los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación visible de alta energía, también para su uso en el tratamiento de los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación Infrarroja A, en particular el tratamiento también comprende reducir la cantidad de ROS generadas por la radiación Infrarroja A.

Para obtener este efecto de tratamiento, o reparador, el lisado se aplica preferentemente tópicamente después de la exposición a la radiación, es decir, cuando los ROS ya han sido generados por efecto de la radiación. Por tanto, en una realización, el tratamiento comprende la administración tópica de una cantidad efectiva del lisado después de la exposición a la radiación.

Este efecto de tratamiento (o efecto reparador) se evidencia en el ejemplo 3, figuras 5-7. Estos ejemplos muestran datos experimentales obtenidos a partir de explantes de piel humana, en los que la aplicación del Repair Complex al 1% después de que los explantes hubieran sido irradiados durante 50 min produjo una reducción significativa de los niveles de ROS en comparación con los explantes irradiados sin tratar. Se observó también en los explantes tratados una sustancial mejoría en la capacidad metabólica de las células cutáneas y una reducción de la citotoxicidad celular.

En general, la invención se refiere preferentemente a los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación que comprenden el fotoenvejecimiento. Dicho de otra manera, la invención se refiere preferentemente al fotoenvejecimiento inducido por las ROS generadas por efecto de la exposición a la radiación visible de elevada energía. En realizaciones particulares los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación además comprenden el fotoenvejecimiento producido por la radiación Infrarroja A.

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 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.

5 Todos los porcentajes mencionados en el presente documento son porcentajes en peso (peso/peso) a menos que se indique otra cosa.

10 El lisado para su uso según la invención se puede combinar con filtros físicos, químicos, organominerales, y/o biológicos con el fin de proporcionar un efecto fotoprotector de amplio espectro que evite los daños de la radiación visible de alta energía, permitiendo la exposición a la luz solar o a dispositivos que emitan este tipo de radiación con menos riesgo. Alternativamente, el lisado se puede combinar con otros agentes que ayuden a reparar el daño causado por la radiación o a aliviar sus síntomas, tales como agentes hidratantes, calmantes, anti-radicales, antioxidantes. En ocasiones puede ser conveniente combinar el lisado con una mezcla de filtros, 15 agentes reparadores y agentes calmantes.

20 Un segundo aspecto de la invención proporciona un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, en cantidad efectiva para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía, en combinación con al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos.

25 Este aspecto se puede reformular como uso de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, en cantidad efectiva para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía, en 30 combinación con al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos. La invención también describe un método para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía en sujeto que

35

lo necesite que comprende administrar una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, en combinación con al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos.

Mediante la aplicación de estas combinaciones 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 visible de elevada energía. También las combinaciones contrarrestan de manera más efectiva los daños causados por este tipo de radiación, mejorando el efecto reparador. Todo ello imparte a estas combinaciones un alto valor práctico desde el punto de vista cosmético.

Por tanto, la invención también proporciona en un tercer aspecto una composición, preferentemente una composición cosmética tópica, que comprende una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, preferentemente *Bifidobacterium longum*, y al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica en la piel de una persona, para su uso según se define en el primer aspecto de la invención.

Este aspecto se puede expresar también como una composición, preferentemente una composición cosmética tópica, tal y como se define arriba, para la preparación de un medicamento para el uso definido según el primer aspecto de la invención. La descripción también proporciona un método para la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía en sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición, preferentemente composición cosmética tópica, tal y como se define arriba.

La presencia en la composición de la invención de estos filtros contra la radiación solar es particularmente adecuada cuando la composición es para uso en la prevención de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno

generadas por efecto de la radiación visible de alta energía y dicha prevención comprende reducir la generación de ROS como consecuencia de la exposición a la radiación visible de elevada energía, la radiación UV y la radiación infrarroja A. De esta manera se consigue un fotoprotector de amplio espectro. Preferentemente los daños cutáneos referidos son los relacionados con el fotoenvejecimiento.

Las cantidades del listado en las composiciones o combinaciones de la invención son los descritos más arriba.

En general, el filtro se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en físico, químico, organomineral, biológico, y las combinaciones de los mismos, por ejemplo en una cantidad de un 0,1-50% en peso de la composición total, en particular en una cantidad de un 5-50%, o de un 10-50%, o de un 15-50%, o de un 10-35%, o de un 15-35%, o de un 29-35% en peso de la composición total, 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.

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), óxido de zinc, hierro, cinc, circonio o cerio.

Si estuvieran presentes, la cantidad de los filtros orgánicos e inorgánicos puede variar de aproximadamente un 0,1 % a un 50 %. Generalmente, los filtros orgánicos e inorgánicos en la composición cosmética están en una cantidad de 5-50% en peso de la composición total, en particular en una cantidad de un 10-50%, o de 15-50%, o de 29-50%, o de 10-35%, o de 15-35%, en peso de la composición total, preferentemente de 29-35 % en peso de la composición total.

En particular, filtros adecuados para su uso en la presente invención son filtros de UVA o UVB.

La expresión "protector de UVA" significa un compuesto químico que bloquea la radiación UV en la longitud de onda de aproximadamente 320-440 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: drometrizol trisiloxano); ácido 2-hidroxi-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-butyl)-1,1,3,3-fenol (nombre INCI: metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol); sal monosódica del ácido 2,2'-bis-(1,4-fenileno)1H-benzimidazol-4,6-disulfónico (nombre INCI: fenil dibenzimidazol tetrasulfonato disódico); (1,3,5)-triazin-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidroxi]-fenil}-6-(4-metoxifenilo) (nombre INCI: bisetilhexiloxifenol metoxifenil triazina); o éster de hexilo del ácido 2-(4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil)-benzoico (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.

Como filtros de UVA se pueden utilizar 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.

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 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: 4metilbencilidenalcanfor) 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-(((1,1-dimetiletil)amino)carbonil)fenil)amino) 1,3,5-triazin-2,4-di)diimino)bis-,bis(2-etilhexilo) (nombre INCI: dietilhexil butamido triazona); drometrizol 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 5 %, en peso de la composición total.

Protectores de UVB preferentes son: 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.

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.

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 1-100, en particular 2-80, o 2-45, o 5-30, o 10-70, o 15-70, o 15-35. El SPF indica el aumento de tiempo en que la piel puede estar expuesta al sol sin

35

padecer efectos adversos: enrojecimiento, eritema y quemaduras. El cálculo de los valores de SPF se conoce bien en la técnica.

5 Si estuviera presente, un protector físico preferente de acuerdo con la invención es dióxido de titanio micronizado o tamaño nano y/u óxido de zinc micronizado o tamaño nano.

10 Si estuvieran presentes, los filtros organominerales preferentes incluyen metilen-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (tinosorb® m) o bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (tinosorb® s).

15 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).

20 En una realización particular, las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden el lisado de *Bifidobacterium longum* en combinación con al menos un filtro químico y al menos un filtro organomineral. En otra realización particular, dicha composición comprende además al menos un filtro físico. Preferentemente, los filtros químicos y organominerales se seleccionan entre los mencionados anteriormente.

25 En otra realización particular, las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden el lisado de *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.

30 En una realización preferida, la composición comprende el lisado de *Bifidobacterium longum* en combinación con metoxicinamato de etilhexilo, octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano, dietilhexil butamido triazona, y bisetilhexiloxifenol metoxifenil triazina.

35 Las composiciones usadas para los fines de la invención comprenden además excipientes o vehículos apropiados para la aplicación tópica a la piel de una persona.

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.

La invención también contempla que las composiciones de la invención comprendan, en adición o alternativamente al filtro solar, un compuesto activo adicional, por ejemplo, un agente reparador, hidratante, antiradical, antioxidante, calmante, antiinflamatorio, antibiótico o combinaciones de los mismos. La presencia de estos agentes adicionales en la composición puede ser beneficiosa en cualquier caso, pero es particularmente adecuada cuando la composición es para uso en el tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía y dicha prevención comprende reducir la cantidad de ROS generados como consecuencia de la exposición a la radiación visible de elevada energía, y también de la radiación UV y la radiación infrarroja A.

Por tanto, la invención también contempla una composición, preferentemente una composición cosmética tópica, que comprende una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, preferentemente *Bifidobacterium longum*, y al menos un compuesto activo adicional, seleccionado de un agente reparador, hidratante, antiradical, antioxidante, calmante, antiinflamatorio, y combinaciones de los mismos, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica en la piel de una persona, para su uso según se define en el primer aspecto de la invención, donde el compuesto adicional se encuentra en una cantidad de 0.1-50% en peso con respecto al peso de la composición total. Preferentemente estas composiciones son para uso en el tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por efecto de la radiación visible de alta energía y/o la radiación Infrarroja A.

35

En este sentido, ejemplos no limitantes de los compuestos activos adicionales son: Alantoína, Bisabolol, pantenol, vitaminas (p.e niacinamida, vitamina C y sus derivados), extractos vegetales (caléndula, Regaliz, Mimosa, té verde, Centella Asiática, Rosa mosqueta, extractos de algas y microalgas), enzimas, péptidos
5 (hexapeptido-3, Tripeptido-38, hexapeptido-9), ácido hialurónico, ectoína, urea, colesterol, hidrolizados de proteínas de la leche, soja, trigo, seda, oligosacáridos como beta glucanos y alfa glucanos, aceites vegetales (p.e Borraja, Manzanilla, Jojoba), aceites esenciales (p.e manzanilla), ácidos grasos poliinsaturados (p.e. omega 3, omega 6, omega 9), silanoles (derivados de silicio orgánico y derivados), ceramidas.

10

Las cantidades apropiadas de lisado en la composición, así como los excipientes o vehículos apropiados para la aplicación tópica son como se ha descrito en realizaciones anteriores.

15

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 o emulsión agua en silicona o agua en aceitesiliconico o en
20 forma pulvurulenta. 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.

25

Finalmente la presente solicitud también describe un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, en cantidad efectiva para inhibir la producción de MMP-1 inducida por radiación visible de alta energía. Esto también se puede expresar como el uso de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, para la preparación de un medicamento para inhibir la producción de MMP-1
30 inducida por radiación visible de alta energía. También se puede expresar como un método para inhibir la producción de MMP-1 inducida por radiación visible de alta energía, que comprende administrar una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium*, en particular de *Bifidobacterium longum*, junto con vehículos o excipientes cosméticamente aceptables, a un sujeto que lo

35

necesita.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus
variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o
pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la
5 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la
invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y
no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente
invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y
10 preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 Generación de ROS en queratinocitos humanos (HaCaT) para el control sin
15 irradiación (C) y muestras irradiadas 60 minutos con HEV (C+HEV), en relación al
control sin irradiación. **** Representa la significancia estadística con el valor de p
<0.0001.

FIG. 2 Generación de ROS en queratinocitos humanos (HaCaT) para el control sin
20 irradiación (C), muestras irradiadas 60 minutos con HEV (C+HEV) y muestras
irradiadas 60 minutos con HEV después de ser suplementadas con Repair Complex al
2,5% (A) y 5% (B). Muestras normalizadas con respecto el grupo Control + HEV. **
Representa significación estadística con p-valor < 0.01. *** Representa la significancia
estadística con el valor de p <0.001. **** Representa la significancia estadística con
25 valor p <0.0001.

FIG. 3 Generación de ROS en fibroblastos humanos (NHDF) para el control sin
irradiación (C) y muestras irradiadas 60 minutos con HEV (C+HEV), en relación al
control sin irradiación. **** Representa la significancia estadística con el valor de p
30 <0.0001.

FIG. 4 Generación de ROS en fibroblastos humanos (NHDF) para el control sin
irradiación (C), muestras irradiadas 60 minutos con HEV (C+HEV) y muestras
irradiadas 60 minutos con HEV después de ser suplementadas con Repair Complex al
35

1,5% (D) y 2,5% (F). Muestras normalizadas con respecto el grupo Control + HEV. ** Representa significación estadística con p-valor < 0.01. *** Representa la significancia estadística con el valor de p <0.001. **** Representa la significancia estadística con valor p <0.0001.

5

FIG. 5 Porcentaje de enzima LDH comparado con el grupo Control Sano (C, considerado como 100%). A, explantes de piel irradiados durante 24 h. B, explantes irradiados durante 24 horas y tratados con Repair Complex al 1%.

10

FIG. 6 Porcentaje de resazurin con respecto al grupo Control Sano (C, considerado como 100%). A, explantes de piel irradiados durante 24 h. B, explantes irradiados durante 24 horas y tratados con Repair Complex al 1%.

15

FIG. 7 Porcentaje de las células positivas para ROS. C, control sano. A, explantes de piel irradiados durante 24 h. B, explantes irradiados durante 24 horas y tratados con Repair Complex al 1%.

EJEMPLOS

20

En los ejemplos se utilizó el producto Repair Complex CLR PF (libre de parabenos), si bien se hace notar que la presencia o ausencia de parabenos no afecta los resultados en cuestión. Los ejemplos se referirán a este producto simplemente como Repair complex.

25

Ejemplo 1. Determinación de la capacidad de protección contra la luz visible de alta energía del Repair Complex en queratinocitos humanos (HaCaT) in vitro

30

OBJETIVO: Análisis de los efectos del complejo de reparación para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por luz visible de alta energía (HEV) en los queratinocitos humanos (HaCaT), a través de la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

REACTIVOS: Agua destilada (Braun), DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), FBS (fetal bovine serum) quelado, penicilina, estreptomicina, solución fosfato salina

35

tamponada (Sigma), solución azul tripán (Bio-Rad), tripsina (Sigma), etanol (Sigma Aldrich), kit de detección de ROS (Sigma Aldrich). La línea celular de queratinocitos inmortalizada HaCaT se obtuvo según es habitual en el campo (Wilson, "Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes", *Methods Mol Biol.* 2014;1195:33-41).

5

METODOLOGÍA: las células queratinocíticas HaCaT se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones (2,5% y 5%) de Repair Complex durante 24 horas. Después del tratamiento, las células se expusieron a luz visible de alta energía (HEV) para inducir la generación de ROS. Las células fueron expuestas a HEV durante 60 minutos (1-2 J / cm) y los efectos fueron evaluados. La concentración de ROS se midió por espectrofluorimetría. El Repair Complex se utilizó a concentraciones de 2,5% y 5%.

Las células vivas se contaron en una cámara de Bürker bajo el microscopio. Las células HaCaT se cultivaron durante una noche a una densidad de 10.000 células / pocillo en una placa negra de 96 pocillos, en medio de crecimiento. 24 horas después, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por un nuevo medio de cultivo suplementado con Repair Complex al 2,5% y 5%. Después de 24 horas de período de incubación, el medio de cultivo de todos los pocillos se reemplazó por PBS y mezcla maestra ROS en todos los pocillos cultivados, incluyendo 2-3 pocillos de control sin células para obtener el control en blanco. Las células fueron expuestas a VHE durante 60 minutos (potencia teórica de la lámpara = 66.990 mW / m², dosis total recibida) alrededor de 1-2 J / cm² a una longitud de onda entre 420 - 500 nm, pico a 420 nm). Los controles no irradiados se incubaron a 26°C durante este tiempo en la oscuridad. Una hora después del periodo de irradiación, los niveles de ROS se midieron en todas las muestras. Las ROS generadas y acumuladas en el interior de las células reaccionaron con un sensor fluorogénico localizado en el citoplasma, lo que resultó en una cantidad de un producto fluorométrico proporcional a la cantidad de ROS generadas en la célula. La fluorescencia se midió a $\lambda_{ex} = 490$ / $\lambda_{em} = 525$. Se hicieron tres réplicas biológicas con ocho repeticiones técnicas para cada concentración de 2,5% y 5%.

La media de control en blanco se restó de todos los datos de muestra y, después de eso, todos los datos se normalizaron al control irradiado y se representaron como

35

media \pm SEM. Los datos se analizaron comparando estadísticamente el control tratado frente al irradiado, y las muestras irradiadas versus las no irradiadas. Para el análisis se aplicó el test t de Student. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$, 95% de confianza. Los datos se representan en dos formas de normalización. En el primer proceso de normalización, se utilizó el "control no tratado" como el "control" de referencia y estos datos definen la eficacia del tratamiento de irradiación en la generación de ROS. En el segundo caso, el "control irradiado" se usó como control de referencia para determinar la eficacia del Repair Complex para evitar la generación de ROS. La fórmula utilizada para analizar los datos brutos y para obtener los datos utilizados en los gráficos fue " X / M ", donde X es el valor bruto de la absorbancia y M es la media del control correspondiente para cada réplica biológica.

RESULTADOS: Los resultados mostraron que la radiación HEV (luz azul) durante 60 minutos indujo significativamente la generación de ROS en las células HaCaT a niveles en 69.7 ± 6.9 veces superiores al control no irradiado (Figura 1). Cuando las células HaCaT se trataron con Repair Complex durante 24 horas al 2,5% y 5%, los resultados indicaron que los niveles de ROS generados por HEV fueron menores en $39,7 \pm 11,5 \%$ y $47,0 \pm 11,4\%$, respectivamente, en comparación con Control + HEV (Figura 2).

CONCLUSIÓN: La suplementación con Repair Complex al 2.5% y 5% en queratinocitos humanos (HaCaT) durante 24 horas antes de someter las células a radiación HEV redujo significativamente la generación de ROS en un $39.7 \pm 11.5\%$ y $47.0 \pm 11.4\%$, en comparación con el control no tratado. Esto indica que el Repair Complex ejerce un potente efecto protector sobre los daños inducidos en los queratinocitos por la generación de ROS por efecto de la radiación HEV.

Ejemplo 2. Determinación de la capacidad de protección contra la luz visible de alta energía del Repair Complex en fibroblastos humanos (NHDF) in vitro

OBJETIVO: Análisis de los efectos del complejo de reparación para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por luz visible de alta energía (HEV) en los fibroblastos humanos (NHDF), a través de la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

REACTIVOS y METODOLOGÍA: los reactivos empleados y la metodología fueron como se describe en el ejemplo 1, salvo que se utilizaron células de fibroblastos (línea celular de fibroblastos primarios NHDF (PromoCell) y la suplementación con Repair Complex se hizo en concentraciones de 1,5 y 2,5 %.

5

RESULTADOS: Los resultados mostraron que la radiación HEV (luz azul) durante 60 minutos indujo significativamente la generación de ROS en las células NHDF a niveles en $38,9 \pm 3,6$ veces superiores al control no irradiado (Figura 3). Cuando las células NHDF se trataron con Repair Complex durante 24 horas al 1,5% y 2,5%, los resultados indicaron que los niveles de ROS generados por HEV fueron menores en $10,6 \pm 3,8$ % y $14,0 \pm 3,7$, respectivamente, en comparación con Control + HEV (Figura 4).

10

CONCLUSIÓN: La suplementación con Repair Complex al 1,5% y 2,5% en fibroblastos humanos (NHDF) durante 24 horas antes de someter las células a radiación HEV redujo significativamente la generación de ROS en un $10,6 \pm 3,8$ % y un $14,0 \pm 3,7$, respectivamente, en comparación con el control no tratado. Esto indica que el Repair Complex ejerce un potente efecto protector sobre los daños inducidos en los fibroblastos por la generación de ROS por efecto de la radiación HEV.

15

20

Ejemplo 3. Efecto reparador del Repair Complex sobre los daños causados por la radiación en explantes de piel.

OBJETIVO: Evaluar la capacidad reparadora del Repair Complex sobre los efectos dañinos en la piel causados tras la exposición a la radiación solar. Los parámetros analizados en este estudio se realizaron en cultivos organotípicos de explantes de piel humana.

25

Los explantes de piel humana presentan grandes ventajas con respecto a los cultivos celulares in vitro, ya que la arquitectura característica del tejido ex vivo se mantiene al menos durante 14 días, manteniendo su estructura tridimensional y los diferentes tipos celulares diferenciados. Son por ello una buena réplica del tejido de origen. Los explantes no pierden la heterogeneidad celular, la organización espacial, ni los

30

35

componentes sistémicos de regulación como sucede en los cultivos celulares in vitro.

Para valorar la capacidad reparadora del Repair Complex para los daños producidos por efecto de la radiación solar de elevada energía y de infrarrojo A, el estudio se llevó a cabo en explantes de piel humana irradiadas (Simulador Solar), donde se indujo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido cabe señalar que los daños cutáneos producidos por las ROS generadas por efecto de la exposición a la luz solar están directamente relacionados con la luz visible de alta energía y con el infrarrojo A, pero no con la radiación UV. Esto se evidencia en, P. Schroeder et al., "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling", *Free Radic. Biol. Med.* 2007, vol. 43, pp. 128-135, donde se explica que la generación de ROS por las mitocondrias no está afectada por la radiación UVA o UVB. Varios estudios indican que los inductores principales de la generación de ROS y su acumulación en las células son la radiación visible de elevada energía y el aumento de la temperatura intracelular causado por la radiación infrarroja A.

REACTIVOS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D-5546), Penicillin/streptomycin (Gibco 15140-122), Hank's Salts (Sigma H-2387), PBS (10x) (Roche 11 666 789001), discos de 10 mm de diámetro, Resazurin (Sigma R7017), CytoTox 96 (Promega G1780), DFFDA (Invitrogen C-13293), Phospho-Histone H2A.X pSer140 Antibody (3F2) (ThermoFisher MA1-2022), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (ThermoFisher A-11001), Collagenasa Tipo I (Invitrogen 17018-029) y explantes abdominales de piel humana.

Los explantes fueron obtenidos como sigue: se obtuvieron pedazos de piel del abdomen con el consentimiento informado de mujeres sanas de entre 40 y 55 años sometidas a cirugía plástica. Hasta 2 h después de la cirugía, la piel se cortó en piezas de 0,8 cm² y se colocaron muestras con la dermis hacia abajo y la epidermis hacia arriba en placas de cultivo que contenían medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con antibióticos (penicilina / estreptomicina al 1%). Características de las muestras de piel: Hembra, Caucásica, Abdomen, 40-55 años, Fenotipo II o III.

Las muestras de piel se mantuvieron en medio de cultivo a 37 ° C bajo 5% de CO₂. El medio celular fue reemplazado cada dos días hábiles. Del mismo modo, los ensayos de resazurina y lactato deshidrogenasa se realizaron cada dos días hábiles para

35

determinar la condición aceptable de los explantes de la piel durante el estudio.

El producto a estudio, Repair Complex CLR PF, se preparó el mismo día del ensayo al 1% en medio de cultivo.

5

METODOLOGÍA: Tanto explantes de piel humana sanos como los irradiados fueron utilizados como sistema experimental. Las pieles dañadas se obtuvieron por la exposición de piel sana a radiación solar, irradiación UV/vis (295 - 780 nm) emitida por el simulador SOL 500 (Dr. Hönle). Se aplicó una radiación de 10 J sobre los explantes. La intensidad utilizada en el estudio fue de 3.2-3.6 mW/cm², exponiendo los explantes a dicha intensidad solar durante 50 minutos. Los grupos a estudio fueron los siguientes:

10

1. Grupo Control Sano: 4 explantes de piel sin ser lesionados.

15

2. Grupo Irradiado: 4 explantes de piel sometidos a radiación solar durante 24 horas.

3. Grupo irradiado tratado: 4 explantes de piel sometidos a radiación solar durante 24 horas e incubados inmediatamente después de la irradiación con Repair Complex al 1% durante 24 h.

20

Se llevó a cabo un único experimento, donde cada grupo experimental presentó 4 réplicas. El Repair Complex a estudio fue testado a una concentración del 1%.

Los siguientes parámetros fueron evaluados: Citotoxicidad (lactato deshidrogenasa, LDH) y Alamar Blue (resazurin) y producción de ROS.

25

Ensayo de la Resazurina

El colorante de la resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) es ampliamente utilizado como indicador de viabilidad celular en ensayos de proliferación y citotoxicidad. El ensayo se basa en que las células viables y metabólicamente activas reducen la resazurina a resorufina (compuesto fluorescente), la cual se libera al medio de cultivo. Esta conversión es intracelular, facilitada por oxidorreductasas de origen mitocondrial, microsomal y citosólico.

30

El resazurin es un compuesto no tóxico y estable en el medio celular que al reducirse

35

se transforma en resorufina (fluorescente), compuesto soluble y permeable que es liberado al medio de cultivo. Por lo que permite continuas mediciones de la proliferación y metabolismo celular sin necesidad de la pérdida del sistema experimental.

5

Los explantes de piel de los grupos control, irradiado e irradiado tratado fueron incubados con 6 μ M de resazurina durante al menos 1 hora. Posteriormente, se tomaron 100 μ l de sobrenadante de cada muestra y fueron transferidos a una placa de 96 pocillos. La resorufina producida fue medida por fluorimetría a una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

10

Ensayo LDH

El test de citototoxicidad LDH es un ensayo colorimétrico donde se determina la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), el LDH es un enzima citosólico estable que es emitido al medio de cultivo cuando la membrana celular está dañada. Un incremento de la muerte celular o células con la membrana citoplasmática dañada durante el ensayo supondría un incremento del enzima LDH en el medio de cultivo.

15

100 μ l del medio de cultivo de cada muestra de los grupos ensayados fue transferida a una placa de 96 pocillos. La presencia de LDH en el medio de cultivo fue detectada mediante la siguiente reacción enzimática: El LDH oxida el lactato en piruvato el cual reacciona con la sal de tetrazolio WST-1 para formar formazan. El incremento de la cantidad de formazan se correlaciona directamente con el número de células lisadas (dañadas). El formazan es un compuesto coloreado soluble en agua y puede ser medido utilizando un lector de placas ELISA a 490-500 mn.

20

25

Disgregación del tejido dérmico

Se llevó a cabo la disgregación de los explantes de piel humana de los grupos ensayados para poder obtener una suspensión celular de cada explante. Brevemente, el tejido fue digerido con 3.5 mg/ml de colagenasa en DMEM durante 4 horas a 37°C y posteriormente filtrado. El filtrado celular fue enriquecido mediante la centrifugación (1700 rpm y 5 minutos) y el pellet resultante fue resuspendido en DMEM.

35

Determinación de ROS

Los niveles de ROS intracelular fueron determinados a través de la sonda fluorescente, 2',7'-difluorescein diacetato (DFFH-DA). Este método se basa en la hidrólisis intracelular del DFFH-DA por esterasas intracelulares transformándose en un derivado no fluorescente, DFFH. Tras entrar el compuesto DFFH-DA en la célula, las esterasas lo hidrolizan con el derivado no fluorescente carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein, el cual queda retenido dentro de la célula debido a su carga negativa. La oxidación de este compuesto por el ROS presente en la célula implica una conversión de este compuesto a carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, el cual es un compuesto fluorescente.

Las suspensiones celulares de piel fueron lavadas con 300 µl tampón fosfato (PBS), con una cantidad mínima aproximada de 100.000 células por muestra. Posteriormente, las células fueron marcadas con DFFH-DA a una concentración final de 10 µM e incubadas durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Tras la incubación, las células fueron lavadas con PBS y analizadas por citometría de flujo (Cytomics FC500-MCL).

RESULTADOS:

20

Ensayo LDH

Los resultados de este ensayo fueron calculados considerando el grupo Control Sano (explantes de piel que no fueron irradiados) como el 100% de LDH. Como ya se ha indicado anteriormente, un incremento en la cantidad de formazan en el medio de cultivo se correlaciona directamente con un incremento de las células lisadas (dañadas).

Tal y como se muestra en la figura 5, en el grupo experimental con irradiación se observó un incremento de la cantidad de LDH con respecto al grupo control. Las muestras tratadas con Repair Complex al 1% después de la irradiación presentaron un descenso del porcentaje de LDH muy acusado, acercándose estos valores al grupo control sano. Estos datos sugieren que el Repair Complex al 1% de concentración en

35

explantes de piel humana tiene un efecto reparador sobre el daño en la membrana plasmática (células dérmicas dañadas o muertas) generado por la irradiación en las condiciones de este ensayo.

5 Ensayo de Resazurina

Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo LDH, se llevó a cabo el test de la resazurina. El marcador resazurina es ampliamente utilizado como indicador de la viabilidad celular en numerosos ensayos citotóxicos. Pero igualmente es un indicador de la actividad metabólica de las células ya que este ensayo está basado en la habilidad de las células metabólicamente activas de reducir el resazurina en resofurina y dihidroresorufina por enzimas oxidoreductasas.

Los resultados se describen en la figura 6. Los resultados de este ensayo fueron calculados considerando el grupo Control Sano (explantes de piel que no fueron irradiados) como el 100% del compuesto fluorescente derivado de la Resazurina. En el grupo experimental con irradiación se observó un descenso de la cantidad de resazurina marcado con respecto al grupo control. Esto indica que la irradiación afectó a la capacidad del tejido de reducir el resazurina, y esta disminución de su capacidad reductora está directamente relacionada con un descenso de la actividad metabólica del tejido (células que conforman el explante de piel), y por lo tanto con aparición de daño en el tejido dérmico. Las muestras post-tratadas con Repair Complex al 1% presentaron unos valores de resazurina muy similares al grupo Control no irradiado.

Estos datos sugieren que el producto Repair Complex al 1% en explantes de piel humana tiene un efecto reparador sobre el daño producido por la irradiación, manteniendo la actividad metabólica (capacidad reductora de las mitocondrias).

30 Determinación de ROS

Las muestras de piel humana (control sano de piel sin irradiar, piel irradiada durante 24 h y piel irradiada y tratada con Repair Complex al 1%) fueron disgregadas con colagenasa. Posteriormente las suspensiones celulares generadas se incubaron con DFFH-DA y la presencia de ROS determinada mediante citometría de flujo. Los

35

5 resultados de ROS se describen en la figura 7. En la figura se observa que el porcentaje de células positivas para ROS en las suspensiones celulares de piel irradiada indicaron un incremento de este porcentaje con respecto al grupo Control Sano. Sin embargo, los valores de porcentaje ROS en las suspensiones celulares de las muestras de piel irradiadas y tratadas posteriormente con Repair Complex fueron muy similares a los valores observados en el grupo Control Sano. Esto indica que el compuesto a estudio al 1% tiene efecto reparador ante las especies reactivas de oxígeno producidas en explantes de piel irradiada, en las condiciones del estudio.

10 LISTA DE CITAS

Bibliografía de patentes

EP43128

EP2233127

15 ES2629910

Bibliografía no de patentes:

P. Schroeder et al., "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling", *Free Radic. Biol. Med.* 2007, vol. 43, pp. 128-135.

20 Wilson, "Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes", *Methods Mol Biol.* 2014;1195:33-41.

25

REIVINDICACIONES

1. Lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium* en cantidad efectiva para su uso en la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos producidos por el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por efecto de la radiación visible de alta energía.
- 5
2. Lisado para el uso según la reivindicación 1, donde la prevención comprende la administración tópica de una cantidad efectiva del lisado antes de la exposición a la radiación.
- 10
3. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el tratamiento comprende la administración tópica de una cantidad efectiva del lisado después de la exposición a la radiación.
- 15
4. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación comprenden el fotoenvejecimiento producido por la radiación visible de alta energía.
- 20
5. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el lisado es de al menos un microorganismo de la especie *Bifidobacterium longum*.
6. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la cantidad efectiva del lisado es de 0,1 a 10% en peso con respecto al peso total de una composición que lo comprende.
- 25
7. Lisado para el uso según la reivindicación 6, donde la cantidad efectiva del lisado es de 0,5 a 5% en peso con respecto al peso total de una composición que lo comprende.
- 30
8. Lisado para el uso según la reivindicación 7, donde la cantidad efectiva del lisado es de 1 a 2,5% en peso con respecto al peso total de una composición que lo comprende.

9. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que es para aplicación tópica.

5 10. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en combinación con al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos.

10 11. Lisado para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en combinación con al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos, donde el uso además comprende la prevención y/o tratamiento de los daños cutáneos inducidos o producidos por la radiación Infrarroja A y radiación Ultravioleta.

15 12. Composición cosmética tópica que comprende una cantidad efectiva de un lisado de al menos un microorganismo del género *Bifidobacterium* y una cantidad efectiva de al menos un filtro contra la radiación solar seleccionado del grupo que consiste en filtros físicos, químicos, organominerales, biológicos y combinaciones de los mismos, junto con excipientes o vehículos cosméticamente aceptables apropiados para la aplicación tópica en la piel de una persona, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

20

13. Composición cosmética tópica para el uso según la reivindicación 12, donde el filtro se encuentra en una cantidad de 10 a 50% en peso con respecto al peso de la composición total.

25 14. Composición cosmética tópica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde el lisado es de al menos un microorganismo de la especie *Bifidobacterium longum*.

30 15. Composición cosmética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde la cantidad efectiva del lisado es de 0,1 a 10% en peso con respecto al peso total de una composición cosmética que lo comprende.

16. Composición cosmética para el uso según la reivindicación 15, donde la cantidad efectiva del lisado es de 0,5 a 5% en peso con respecto al peso total de una composición cosmética que lo comprende.

- 5 17. Composición cosmética para el uso según la reivindicación 16, donde la cantidad efectiva del lisado es de 1 a 2,5% en peso con respecto al peso total de una composición cosmética que lo comprende.

10

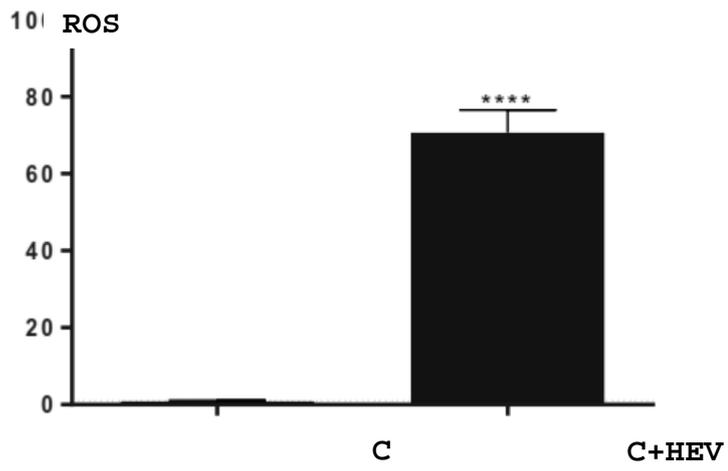


Figura 1

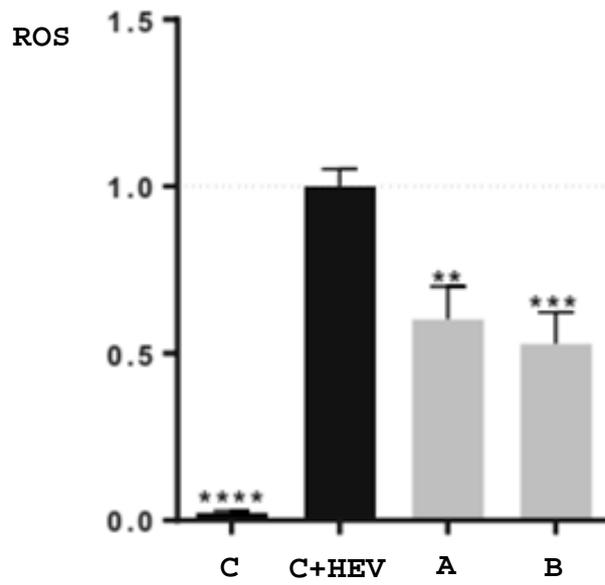


Figura 2

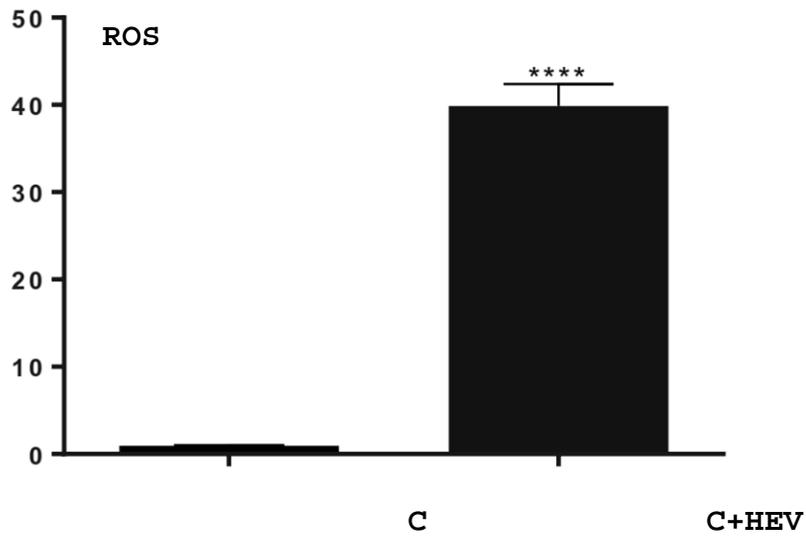


Figura 3

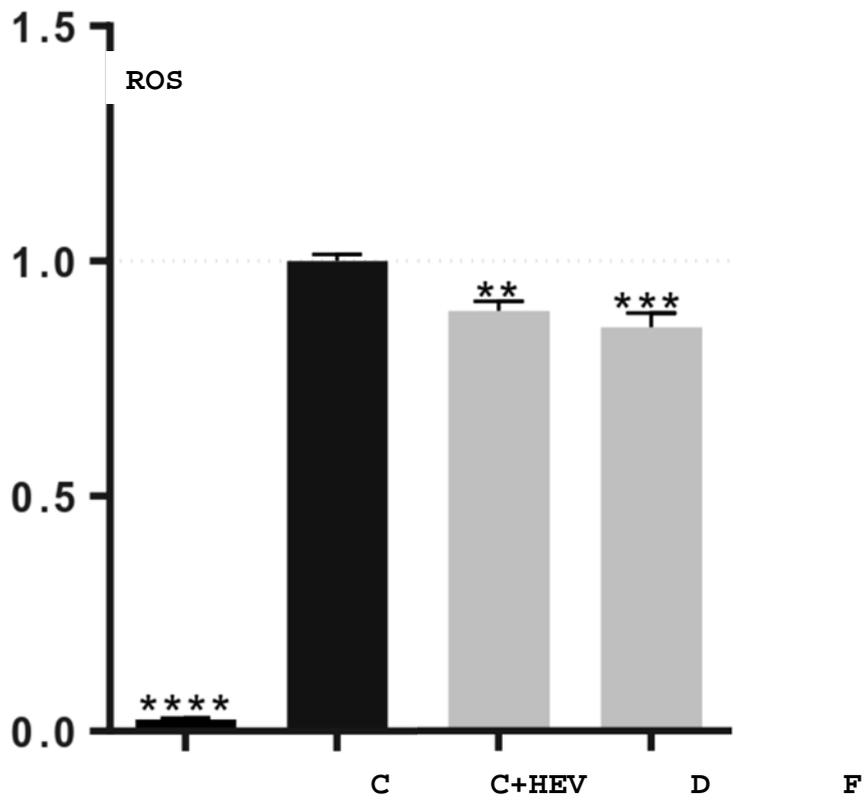


Figura 4

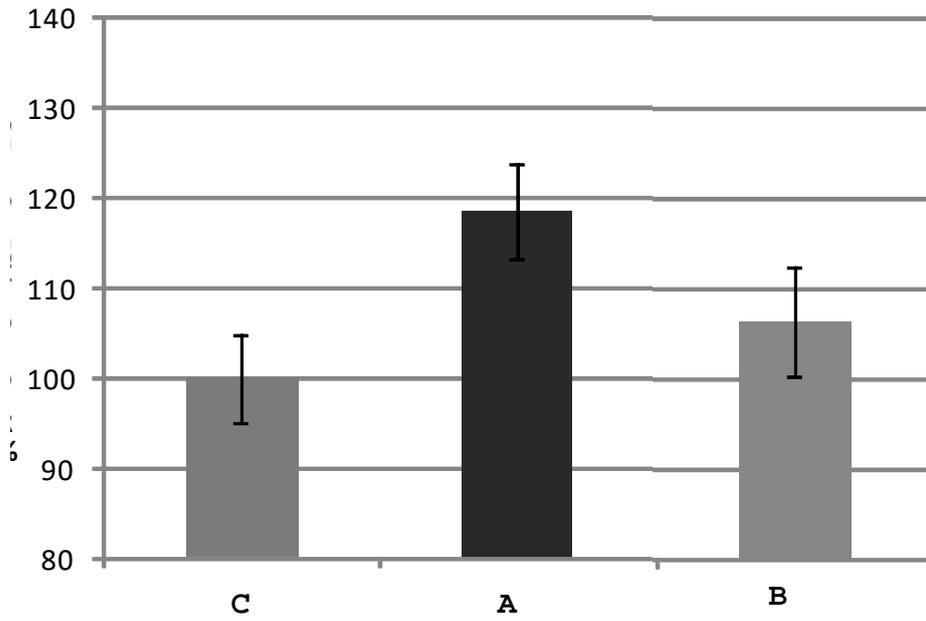


Figura 5

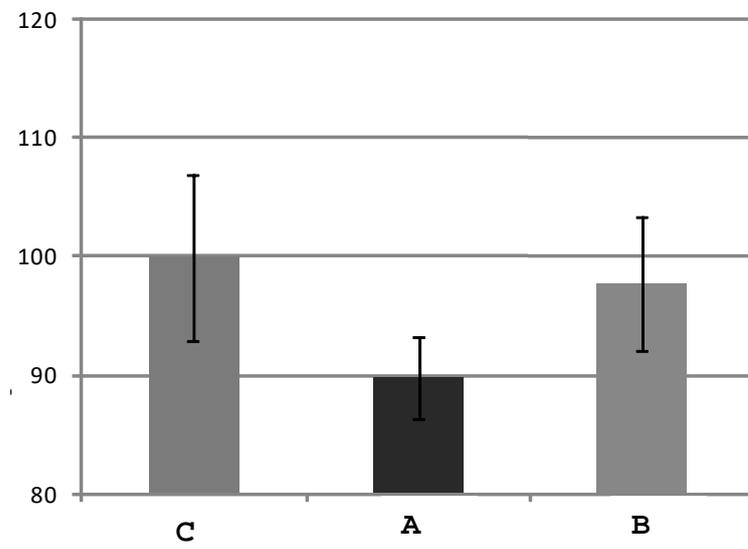


Figura 6

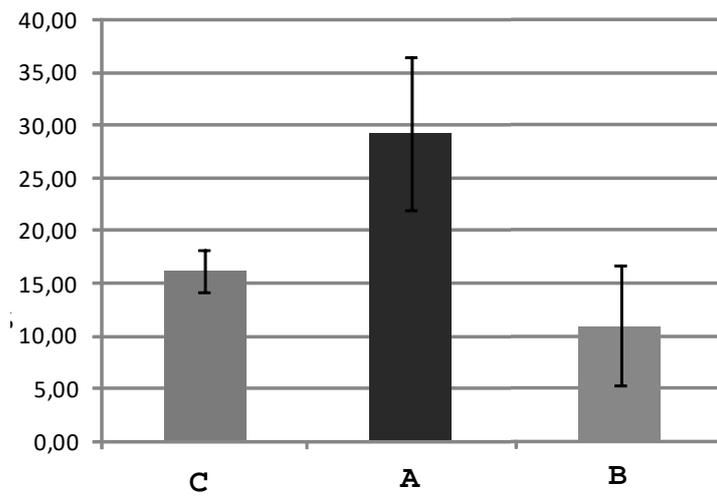


Figura 7