

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 628**

51 Int. Cl.:

A61K 36/55 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/97 (2007.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/FR2014/050994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14729387 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2988765**

54 Título: **Método de obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino**

30 Prioridad:

24.04.2013 FR 1353718

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

11.03.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE (20.0%)
Villa Douce, 9 Boulevard de la Paix
51100 Reims, FR;
CENTRE VALORISATION GLUCIDES PROD NAT (20.0%);
UNIVERSITE DE ROUEN (20.0%);
VANDEPUTTE OLEOCHEMICALS (20.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (20.0%)

72 Inventor/es:

MAQUART, FRANÇOIS;
BELLON, GEORGES;
MARCHAL, CLAIRE;
DUCATEL, HÉLÈNE;
DUPUIS, OLIVIER;
PICTON, LUC;
LECERF, DIDIER y
FORBICE, RENAULD

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 747 628 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

Método de obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino

[0001] La presente invención se refiere a los oligosacáridos, en concreto, derivados de los vegetales y, más en concreto, a la utilización de estos oligosacáridos en el campo cosmético o dermatológico.

5 **[0002]** La invención se refiere más en concreto a una utilización cosmética o dermatológica de los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino y un método de obtención de estos oligosacáridos, por ejemplo, después de la hidrólisis y el fraccionamiento de una solución de mucílago.

10 **[0003]** En particular, los oligosacáridos neutros procedentes de las semillas de lino pueden utilizarse, en particular, para favorecer la reparación tisular cutánea y también para prevenir los efectos del envejecimiento cutáneo.

[0004] La reparación cutánea está constituida por un conjunto de procesos implementados con el fin de reparar un daño o una lesión sufrida por la piel y de reconstituir un tejido próximo al tejido dañado original.

[0005] El envejecimiento cutáneo es responsable de la modificación de las estructuras anatómicas e histológicas y de la alteración del funcionamiento de las células.

15 **[0006]** El envejecimiento cutáneo resulta de diferentes factores, en particular, una alteración celular debida, por ejemplo, al estrés oxidativo, pero también a factores externos, tales como la contaminación, la consumición de tabaco o de alcohol, una exposición excesiva a la luz solar, etc.

[0007] El envejecimiento cutáneo se traduce en la aparición de arrugas y de manchas de pigmentación, en general de color marrón, y por una disminución de la tonicidad de la piel.

20 **[0008]** El estado de la técnica propone determinadas estrategias destinadas a luchar contra las manifestaciones visibles del envejecimiento cutáneo. A este respecto, se pueden citar, en particular, las siguientes técnicas:

- el tratamiento con láser para corregir los defectos tales como las manchas oscuras y las arrugas finas.
- las inyecciones de toxina botulínica, de ácido hialurónico o incluso de colágeno;
- el *peeling*, que consiste en una retirada de una capa considerable de la epidermis;
- 25 - el *lifting*;
- etc.

[0009] Sin embargo, las técnicas existentes en la actualidad presentan ciertos efectos secundarios indeseables y no permiten siempre obtener resultados satisfactorios.

30 **[0010]** En consecuencia, desde hace algunos años, los laboratorios han implementados otras estrategias con el objetivo de luchar de forma más eficaz y de forma más natural contra los efectos del envejecimiento cutáneo y para intentar ralentizar este proceso. Asimismo, conviene encontrar soluciones para favorecer la reparación tisular cutánea en caso de lesiones.

35 **[0011]** En particular, en los últimos años se han desarrollado las investigaciones sobre la utilización de oligosacáridos en las composiciones con fin cosmético para disminuir los signos del envejecimiento cutáneo. De hecho, las moléculas a base de azúcares son de particular interés, en concreto, debido a sus propiedades hidratantes.

40 **[0012]** De esta manera, algunas solicitudes de patente se refieren a composiciones cosméticas que constan de oligosacáridos; en particular, la solicitud de patente WO 99/24009 describe, en concreto, la utilización de los oligosacáridos que contienen xilosa para aumentar la síntesis de determinados compuestos, los proteoglicanos y los glicosaminoglicanos. Sin embargo, en este documento, la xilosa utilizada es un producto comercial y no un producto natural derivado de la planta.

[0013] El documento de patente US 2007/0293433 se refiere a una composición antiedad que consta de una pluralidad de oligosacáridos obtenida por hidrólisis enzimática de la pectina, que consiste también en un producto comercial.

45 **[0014]** También se conoce, a partir de la solicitud de patente US2004/0097464, una composición que comprende una mezcla de oligosacáridos, en particular, fucosa, obteniéndose esta por una hidrólisis realizada por un microorganismo. La mezcla de oligosacáridos descrita en el presente documento requiere la implementación de un método complicado y que consta de un gran número de etapas, de las cuales algunas requieren la acción de

microorganismos patógenos que deben eliminarse necesariamente de la mezcla destinada a una aplicación cosmética.

5 **[0015]** Además, las composiciones descritas en los documentos mencionados anteriormente no presentan una acción lo suficientemente eficaz, en particular, en la estimulación de la reparación cutánea, para la que existen pocas soluciones en el estado de la técnica.

[0016] También se conoce la utilización de los principios activos derivados de las plantas, en particular, del lino (*Linum usitatissimum*), planta perteneciente a la familia de las Linaceae, para una utilización con el fin de luchar contra las manifestaciones de la edad.

10 **[0017]** También se conoce, a partir de la solicitud de patente internacional WO2008/043944 la utilización de principios activos procedentes del lino para la preparación de una composición cosmética para luchar contra el envejecimiento cutáneo, así como un método para obtenerlos.

[0018] Sin embargo, el principio activo, obtenido mediante el método descrito en esta solicitud de patente, consta de diversos componentes, y en su mayoría proteínas de masa molar inferior a 5000 Da en gran concentración, azúcares monómeros, ácidos urónicos, carbohidratos, etc.

15 **[0019]** En consecuencia, esta variedad de componentes no permite una acción focalizada y específica, en concreto, esta disparidad de componentes no permite favorecer de manera eficaz la reparación cutánea en caso de daños sufridos por la piel.

20 **[0020]** En el contexto de la presente invención, los solicitantes han descubierto que determinados oligosacáridos particulares, procedentes de la semilla de lino, permiten una estimulación eficaz de los fenómenos llevados a cabo en particular en los procesos de reparación tisular cutánea y han desarrollado un método para la extracción de estos oligosacáridos.

[0021] Más en concreto, se trata de los oligosacáridos neutros que presentan una masa molar elevada, obteniéndose estos últimos como consecuencia de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 5 000 y 15 000 Da y, por otra parte, entre 15 000 y 50 000 Da.

25 **[0022]** De esta manera, la presente invención se refiere a un método de obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino, presentando dichos oligosacáridos masas molares elevadas, constanding dicho método de las siguientes etapas:

- 30 - se lleva a cabo una hidrólisis con pH ácido de una solución de mucílago de lino, obteniéndose esta última por extracción de semillas de lino en un solvente, realizándose dicha hidrólisis con un pH de 2, a una temperatura del orden de 80°C, durante un periodo de 24h;
- se neutraliza dicha solución añadiendo una base en una cantidad adecuada;
- se realiza una primera ultrafiltración de la solución a través de una membrana de porosidad 50 000 Da, para obtener un primer retenido y un primer permeado;
- 35 - se realiza una segunda ultrafiltración de dicho primer permeado a través de una membrana de porosidad 15 000 Da, para obtener un segundo retenido y un segundo permeado;
- se realiza una tercera ultrafiltración de dicho segundo permeado a través de una membrana de porosidad 5 000 Da, para obtener un tercer retenido y un tercer permeado;
- 40 - se mezcla el segundo retenido y el tercer retenido para obtener dicha mezcla de oligosacáridos, constanding dicho segundo retenido de oligosacáridos con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido entre 15 000 et 50 000 Da, y constanding dicho tercer retenido de los oligosacáridos con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 5 000 y 15 000 Da.

[0023] Según otras características particulares del método:

- la extracción de las semillas de lino se realiza preferiblemente en un solvente acuoso;
- 45 - preferiblemente, se neutraliza dicha solución de mucílago añadiendo, en una cantidad adecuada, una base fuerte seleccionada de entre el grupo que comprende al menos hidróxido de bario e hidróxido de sodio.

50 **[0024]** La presente invención se refiere también a una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino obtenido por la implementación del método según la invención, constanding dicha mezcla de oligosacáridos con masas molares resultantes de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 15 000 y 50 000 Da y, por otra parte, entre 5 000 y 15 000 Da.

[0025] De forma particularmente interesante, dicha mezcla consta de oligosacáridos cuya cadena comprende al menos fucosa y/o arabinosa y/o galactosa y/o glucosa y/o xilosa.

[0026] Ventajosamente, dicha mezcla consta de un índice bajo de oligosacáridos cuya cadena comprende ramnosa y un índice bajo de ácidos urónicos.

5 **[0027]** La mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino puede utilizarse ventajosamente con fines cosméticos para luchar contra los efectos del envejecimiento cutáneo.

[0028] Preferiblemente, la invención se refiere a la utilización de dicha mezcla para estimular:

- la proliferación de los fibroblastos;
- el quimiotaxismo de los fibroblastos;
- 10 - la migración celular de los fibroblastos;
- la síntesis de colágeno de tipo III y/o de tipo IV por los fibroblastos;

La utilización de la mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino permite también ventajosamente estimular la síntesis de lumican e inhibir la síntesis de decorina por los fibroblastos.

[0029] Dicha mezcla también puede utilizarse para inducir la diferenciación de los queratinocitos.

15 **[0030]** La presente invención se refiere también a una composición dermatológica o cosmética que comprende una mezcla de oligosacáridos neutros según la invención y al menos un vehículo cosmética o dermatológicamente aceptable.

[0031] De forma ventajosa, en la composición, la concentración de oligosacáridos neutros está comprendida entre 0,1 y 5 mg/mL.

20 **[0032]** Según un modo de realización particular, la mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la invención también puede utilizarse como medicamento, en particular para favorecer la cicatrización de los tejidos, en concreto, en las úlceras crónicas o después de una intervención quirúrgica.

[0033] La mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino también puede utilizarse para favorecer la reparación tisular cutánea, en particular, para favorecer la cicatrización de una herida.

25 **[0034]** Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la siguiente descripción detallada de los modos de realización no limitativos de la invención, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- la figura 1 consiste en una tabla que resume las características de las muestras E1 a E7 obtenidas a partir de un mucílago de semillas de lino; las fracciones E4 y E6, que presentan un interés particular, aparecen rodeadas en la tabla;

30 - las figuras 2A, B y C que ilustran, mediante histogramas en los que se evalúa el número de células vivas por colorimetría, la ausencia de citotoxicidad de los oligosacáridos neutros de semillas de lino en los fibroblastos en presencia de diferentes concentraciones de oligosacáridos;

- la figura 3 representa el efecto de los oligosacáridos neutros de semillas de lino en la proliferación de los fibroblastos después de diferentes tiempos de incubación (24 h, 48 h y 72 h);

35 - la figura 4 ilustra mediante histogramas el número de células que migraron en función de su exposición o no a oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino;

- la figura 5 ilustra también la migración de los fibroblastos en función de concentraciones diferentes de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino;

40 - la figura 6 es una representación gráfica de la trayectoria de los fibroblastos en presencia o en ausencia de fracciones de oligosacáridos;

- las figuras 7A y 7B representan gráficamente, en forma de histogramas, la síntesis de colágeno de tipo III en presencia de oligosacáridos durante un periodo de 24 h (figura 7A) o 48 h (figura 7B);

- la figura 8 corresponde a una fotografía de membranas de transferencia *western* que revela la expresión del colágeno de tipo IV en los fibroblastos en presencia o ausencia de oligosacáridos de semillas de lino.

45 - la figura 9 corresponde a una fotografía de geles de agarosa que revela la expresión de los genes de los proteoglicanos decorina y lumican en los fibroblastos en presencia o ausencia de oligosacáridos de semillas de lino; el gen GAPDH se utiliza como control.

[0035] La presente invención se refiere a un método para la obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino, en particular, de la variedad *Linum usitatissimum*. Dicha mezcla se obtiene ventajosamente por hidrólisis controlada y posteriormente fraccionamiento a partir de una solución de mucílago de semillas de lino, obteniéndose esta última por extracción de dichas semillas de lino en un solvente.

5 **[0036]** En la siguiente descripción, por «oligosacárido» se entiende cualquier oligómero o polímero osídico resultante de la hidrólisis ácida en caliente del mucílago y cuya masa molar permite el paso a través de la ultrafiltración a 50 000 Da.

[0037] Por «oligosacárido neutro» se entiende un oligosacárido que no tiene ni carga ni residuos N-acetilo.

10 **[0038]** Por «mucílago» se entiende una sustancia vegetal constituida por polímeros osídicos, en particular polisacáridos, que envuelve principalmente las semillas de lino.

[0039] Por «solución de mucílago» se entiende la solución obtenida después de remojar las semillas de lino en un solvente, en concreto acuoso, por ejemplo agua, y constituida en gran parte por polímeros osídicos.

15 **[0040]** Ventajosamente, el método según la invención permite la obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino que consta de oligosacáridos con masas molares resultantes de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 15 000 y 50 000 Da y, por otra parte, entre 5 000 y 15 000 Da.

[0041] La invención también se refiere a una mezcla de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino obtenida mediante la implementación del método.

20 **[0042]** La presente invención se refiere también a una composición, que presenta, en particular, un uso cosmético o dermatológico y que consta de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino obtenida mediante el presente método. Además de estos oligosacáridos, dicha composición consta también ventajosamente de al menos un vehículo cosmética o dermatológicamente aceptable.

[0043] La composición según la invención puede presentarse indiferentemente en forma de una crema, de un gel, de una loción, de un sérum, de una espuma o, incluso, de una pomada.

25 **[0044]** Dicha composición está destinada, más en concreto, a aplicarse sobre la piel o, incluso, en las faneras.

[0045] La piel es un órgano complejo que recubre el cuerpo por completo. Asegura varias funciones necesarias para la supervivencia del organismo, en particular, la protección contra cualquier agresión externa ya sea física, química o incluso biológica.

30 **[0046]** La piel está constituida por tres capas principales: la parte superficial, la epidermis, seguida de una capa más espesa, la dermis, y de la capa más profunda, la hipodermis, en las que las células interactúan entre sí para garantizar las funciones de la piel.

[0047] La epidermis es la capa en contacto directo con el entorno exterior. Protege el organismo impidiendo la entrada de agentes patógenos y manteniendo el agua y los nutrientes en el interior. Presenta un grosor medio de 100 µm, pero puede variar considerablemente según la región del cuerpo y el nivel de queratinización.

35 **[0048]** La célula principal de la epidermis es el queratinocito. Posee numerosas funciones, en particular en las respuestas cutáneas inflamatorias e inmunitarias, constituyendo de esta manera una barrera protectora.

[0049] La epidermis está separada de la dermis por una membrana denominada membrana basal, cuyo componente principal es el colágeno de tipo IV.

40 **[0050]** La dermis es la capa que proporciona flexibilidad y resistencia a la piel. Su grosor varía considerablemente según la localización anatómica.

[0051] La dermis está compuesta principalmente por tejidos conjuntivos que la hacen compresible y elástica. Constituye un soporte para los diferentes anexos cutáneos, tales como los vasos sanguíneos, el pelo, las terminaciones nerviosas y las glándulas sebáceas y sudoríparas.

45 **[0052]** Estos anexos están rodeados de fibras mayoritariamente constituidas por colágeno de tipo I y III, las cuales garantizan elasticidad y flexibilidad a la dermis.

[0053] El colágeno es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Se trata de una proteína que se sintetiza, en particular, en los procesos de reparación tisular. Sin embargo, la síntesis de colágeno se vuelve cada vez menos importante en función de la edad.

50 **[0054]** Los fibroblastos son las células mayoritarias de la dermis; sintetizan todos los tipos de fibras, en particular las fibras de colágeno, así como otros componentes de la membrana basal.

[0055] Los fibroblastos dérmicos son un componente esencial de la piel: producen y organizan la matriz extracelular de la dermis y se comunican con otros tipos celulares, desempeñando un papel crucial en la regulación de la fisiología de la piel.

5 **[0056]** Con el tiempo, la piel puede sufrir numerosas agresiones, tanto internas como externas. Cuando la piel sufre un daño o una lesión, se implementan un conjunto de procesos para reparar el daño y restaurar un tejido lo más cerca posible del tejido original.

[0057] En particular, el envejecimiento es un factor principal de las alteraciones cutáneas. Modifica las estructuras anatómicas e histológicas y altera el funcionamiento de las células. La piel sufre de esta manera profundos cambios.

10 **[0058]** El envejecimiento cutáneo se deriva de la conjunción de diferentes factores, complejos y estrechamente relacionados.

15 **[0059]** En particular, el envejecimiento cutáneo es el resultado de numerosas alteraciones celulares, tal como una disminución de los telómeros, un estrés oxidativo, una degradación de los sistemas de reparación del ADN, a las que se añaden factores externos tales como la exposición al sol, la contaminación, las agresiones climáticas, pero también la consumición de alcohol o de tabaco o, incluso, la alimentación.

[0060] El envejecimiento de la epidermis se manifiesta principalmente por la disminución de su grosor. Esta atrofia es la consecuencia, por una parte, de la acumulación de queratinocitos senescentes y, por otra parte, de la pérdida progresiva de las invaginaciones características de la epidermis.

20 **[0061]** Los queratinocitos basales muestran una disparidad de tamaño y de forma, sugiriendo alteraciones morfológicas, así como una disminución de su capacidad de proliferación. Además, la capacidad de regeneración de la epidermis, como consecuencia de un traumatismo, disminuye con la edad.

25 **[0062]** Asimismo, las propiedades de adherencia de la epidermis disminuyen debido a una disminución de la expresión de la integrina beta-1 implicada en la adhesión de los queratinocitos basales a la lámina basal subyacente. El colágeno IV de la lámina basal, que sirve para la cohesión de la unión dermoepidérmica y para la adhesión de los queratinocitos, también disminuye durante el envejecimiento.

[0063] Finalmente, el envejecimiento conlleva una disminución del número de melanocitos y de células de Langerhans, afectando a la capacidad de protección epidérmica contra las agresiones.

30 **[0064]** Durante el envejecimiento cutáneo, la dermis también es el centro de una profunda desorganización con una matriz extracelular que parece densa y poco vascularizada. Su atrofia se debe principalmente a una reducción del número y del tamaño de los fibroblastos, pero sobre todo de su capacidad de síntesis.

35 **[0065]** En particular, las fibrillas de colágeno adquieren un aspecto granuloso y las fibras se vuelven más compactas. Se disocian y tienden a orientarse en paralelo a la superficie de la dermis. Las alteraciones de las fibras de colágeno, así como del material elástico, el cambio del contenido de proteoglicanos y la aparición de fibroblastos en estado quiescente sin contacto directo con los haces de colágeno representan las principales características de una dermis envejecida.

[0066] Todas estas alteraciones histológicas y bioquímicas tienen consecuencias funcionales cruciales en las propiedades de la piel, dando lugar a respuestas menos adaptadas a las diferentes agresiones externas.

40 **[0067]** La reparación tisular es un ejemplo de respuesta natural cuando un tejido es dañado por una agresión externa. Este proceso se realiza sistemáticamente y tiene lugar en tres fases: inflamación, proliferación y maduración.

[0068] Los primeros sucesos durante una reparación tisular se caracterizan por una fase inflamatoria, una respuesta vascular y celular. Entre estos, se observa la llegada de numerosas células inflamatorias, endoteliales y vasculares. Esto se realiza mediante la producción de factores que presentan propiedades quimioatrayentes.

45 **[0069]** Durante la fase de proliferación, la formación de un tejido granuloso es el acontecimiento clave. Las células inflamatorias, los fibroblastos, las moléculas de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos) forman el tejido de granulación. Este se forma de 3 a 5 días después de la agresión y se produce después de la fase inflamatoria.

50 **[0070]** Cuando se lesiona el epitelio, las células epidérmicas de las inmediaciones de la herida se multiplican y migran para recubrir el tejido sano. Cuando se completa el proceso, las células epidérmicas recuperan sus formas y sus funciones iniciales. Durante esta fase, se produce una fibroplasia: los fibroblastos desempeñan un papel muy importante en esta etapa. Son responsables de la producción de colágeno (y, más en concreto, del colágeno de tipo III), de elastina, de fibronectina y de glicosaminoglicano. Además, los fibroblastos migran y proliferan.

[0071] La tercera fase es la fase de maduración y de renovación donde se termina la reparación dérmica y epidérmica.

[0072] Durante esta fase, se produce una maduración de las fibras y una apoptosis celular que provoca la formación de un tejido próximo al tejido inicial. La renovación se realiza, en concreto, con respecto al colágeno. Las proteínas denominadas metaloproteasas (MMP) permiten controlar la cantidad de colágeno depositado de forma anárquica en las fases precoces del proceso, mientras que la síntesis de colágeno persiste para reconstituir fibras regulares y bien ordenadas. Los inhibidores de estas MMP regulan la actividad de estas enzimas. Por tanto, se crea un equilibrio entre la formación del colágeno nuevo y la destrucción del colágeno antiguo. El colágeno III depositado inicialmente disminuye en gran medida para dar paso al colágeno I.

[0073] Con la edad, durante el envejecimiento cutáneo, la reparación tisular se vuelve menos eficaz: en particular, los fibroblastos proliferan y migran menos, la síntesis de colágeno disminuye.

[0074] Los solicitantes han desarrollado un método que permite la obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino (en particular, *Linum usitatissimum*), permitiendo dicha mezcla obtenida mediante el método según la invención, por su composición particular en oligosacáridos, una mejora sustancial de la eficacia de los procesos llevados a cabo durante la reparación tisular, a la vez que favorece una ralentización de la aparición de los signos visibles del envejecimiento cutáneo.

[0075] Los experimentos e investigaciones llevados a cabo demuestran que la mezcla de oligosacáridos con masas molares procedentes de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 5 000 y 15 000 Da, y por otra parte, entre 15 000 y 50 000 Da, y obtenida mediante el método según la invención, es particularmente interesante para mejorar la reparación cutánea.

[0076] Ventajosamente, esta mezcla que comprende preferiblemente una pluralidad de oligosacáridos se obtiene, mediante la implementación del método según la invención, a partir de una solución de mucílago de semillas de lino y presenta propiedades notables, que permiten en particular una acción positiva en las células que intervienen en los mecanismos de la reparación tisular, como los fibroblastos y los queratinocitos.

[0077] Según un modo de realización preferido, la mezcla de oligosacáridos neutros, procedentes de semillas de lino mediante la implementación del método según la invención, puede utilizarse para favorecer la cicatrización de una herida, tanto en hombres como en animales.

[0078] De esta manera, de forma ventajosa, esta mezcla puede integrarse en un dispositivo médico de tipo parche o apósito, estando destinado este último a aplicarse en cualquier herida para permitir que esta cicatrice más rápido.

[0079] De forma particularmente interesante, la mezcla de oligosacáridos obtenida mediante el presente método también puede utilizarse como medicamento, tanto en el campo de la medicina humana como en el de la medicina veterinaria.

[0080] En particular, dicha mezcla de oligosacáridos puede favorecer ventajosamente una cicatrización de los tejidos, en particular en las úlceras crónicas o como consecuencia de una intervención quirúrgica, en particular por su acción beneficiosa en los fibroblastos de los tejidos conjuntivos.

[0081] Las propiedades de la mezcla de oligosacáridos neutros procedentes de las semillas de lino, obtenida mediante el método según la invención, se desarrollarán y se ilustrarán en los siguientes ejemplos, en relación con las diferentes figuras adjuntas.

Ejemplo 1: Método de preparación de las fracciones de oligosacáridos

[0082] En el método según la invención, se obtiene una solución de mucílago por extracción de semillas de lino joven en un solvente y preferiblemente en caliente, por ejemplo, a una temperatura del orden de 80 °C. Dichas semillas de lino proceden, en concreto, de *Linum usitatissimum* y la relación entre dichas semillas y el solvente, ventajosamente agua, es preferiblemente del orden de 1/10.

[0083] A esta etapa de extracción le sigue ventajosamente una separación centrífuga, y se recupera y se precipita un extracto líquido en medio etanólico, implementando una relación del orden de 1/4 entre dicho extracto y el etanol.

[0084] Ventajosamente, el extracto se vuelve a poner a continuación en solución al 2 % para la etapa de hidrólisis. Esta solución se hidroliza con un pH 2, preferiblemente añadiendo ácido sulfúrico H₂SO₄. La reacción de hidrólisis se realiza a una temperatura del orden de 80 °C, durante un periodo de 24 h.

[0085] Después de la etapa de hidrólisis, se neutraliza la solución, por ejemplo añadiendo una cantidad adecuada de una base fuerte seleccionada de entre el grupo que comprende, en particular, hidróxido de bario Ba(OH)₂ e hidróxido de sodio NaOH.

[0086] Sin embargo, también se puede utilizar cualquier otra base que permita una neutralización de la solución de mucílago.

[0087] La solución se somete entonces a una serie de diversas ultrafiltraciones para purificarse.

5 **[0088]** La primera ultrafiltración de la solución se realiza a través de una membrana preferiblemente mineral con un límite de porosidad de 50 000 Da (Carbosep, diámetro de 6 mm, trilobulada, superficie de 6,8 m²). Después de esta primera ultrafiltración, realizada preferiblemente con un factor de concentración de volumen entre 5 y 7, se obtiene un primer retenido, que consta de los compuestos y las moléculas con masas molares que no exceden el punto de corte de 50 000 Da, y un primer permeado, en el que se encuentran los compuestos de masas molares que exceden el límite de porosidad.

10 **[0089]** Este primer permeado se somete entonces a una segunda etapa de ultrafiltración (preferiblemente en membrana mineral 15 000 Da, InsideCéram, diámetro 20 mm/13 canales, superficie de 0,8 m²), realizada ventajosamente con un factor de concentración en volumen entre 4 y 8, y se obtiene un segundo retenido y un segundo permeado.

15 **[0090]** El segundo permeado, obtenido como consecuencia de la segunda etapa de ultrafiltración en membrana 15 000 Da, se somete entonces a otra etapa de ultrafiltración (preferiblemente en membrana mineral 5 000 Da, InsideCéram, 20 mm/13 canales, superficie de 0,8 m²) realizada por ejemplo con un factor de concentración en volumen comprendido entre 4 y 8. Se obtiene entonces un tercer retenido y un tercer permeado.

20 **[0091]** Al finalizar las ultrafiltraciones, se obtienen 7 muestras o fracciones: el hidrolizado de partida (E1), el primer retenido 50 000 Da (E2), el primer permeado 50 000 Da (E3), el segundo retenido 15 000 Da (E4), el segundo permeado 15 000 Da (E5), el tercer retenido 5 000 Da (E6) y el tercer permeado 5 000 Da (E7).

[0092] Más en concreto, las muestras de interés son las muestras referenciadas E4 (segundo retenido) y E6 (tercer retenido), que comprenden respectivamente oligosacáridos con masas molares elevadas resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 15 000 y 50 000 Da para E4 y, por otra parte, entre 5 000 y 15 000 Da para E6.

25 **[0093]** Estas muestras se dejan en forma líquida o liofilizadas.

[0094] La mezcla del segundo y el tercer retenido permite obtener la mezcla de oligosacáridos de interés.

Ejemplo 2: Caracterización de las fracciones de oligosacáridos

30 **[0095]** Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC: *Size Exclusion Chromatography*) junto con la dispersión de la luz (MALS : *Multi Angle Light Scattering*) y de un refractómetro diferencial (DRI: *Differential Refractive Index*). La línea de análisis se compone de un desgasificador (DGU-20A3 Shimadzu, Japón), de una bomba de HPLC (LC10Ai Shimadzu, Japón) con un rendimiento de 0,5 mL/min, de un inyector automático (SIL-20A Shimadzu, Japón), de dos columnas Shodex montadas en serie (OHpack SB802,5 y SB804), de un detector de dispersión de la luz multiángulos: MALS (Dawn EOS, Wyatt Technology Corp., EE. UU.), provisto de una celda K5 de 50 µL y de 18 diodos de medición y de un refractómetro diferencial (RID 10A Shimadzu, Japón). Las fracciones se caracterizan con ayuda del programa informático Astra 6 (Wyatt Technology), utilizando el método Zimm orden 1. El incremento de índice de refracción (dn/dc) utilizado es de 0,15 mL/g, valor medio clásico para un oligosacárido o un polisacárido.

35

40 **[0096]** Se llevan a cabo las soluciones con concentraciones de 2, 5, 10 o 20 g/L de oligosacáridos, según las fracciones, o por solubilización en una solución de NaCl 0,15 mol/L de la mezcla de oligosacáridos liofilizada, o por dilución de la mezcla en forma líquida teniendo en cuenta el extracto seco de la solución inicial. Se toma un volumen de 30 mL de estas soluciones y se filtra al vacío durante 10 minutos con ayuda de una membrana de celulosa regenerada de porosidad 0,45 µm de marca Millipore para eliminar cualquier compuesto insoluble sobredispersado y para obtener una buena línea de base.

45 **[0097]** La integración de los picos refractométricos y de dispersión de la luz da, para el segundo retenido (E4), procedente del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 15 000 y 50 000 Da, una masa molar media en número de 17 000 g/mol y una masa molar media en peso de 31 000 g/mol (incertidumbres de medición +/- 2 000 g/mol).

50 **[0098]** Para el tercer retenido (E6), procedente de los puntos de corte 5 000 y 15 000 g/mol, las masas molares medias en número y en peso son respectivamente de 4 000 y 5 000 g/mol con una incertidumbre de medición de +/- 1 000 g/mol.

[0099] Las incertidumbres de medición se deben a la escasa señal de dispersión de la luz debido a las escasas masas molares.

[0100] El resto de los resultados obtenidos se enumeran en la tabla de la figura 1.

- [0101]** En esta tabla, MS corresponde a la masa seca recuperada. El término «cenizas/MS» corresponde al contenido de cenizas en relación con la materia seca de la muestra.
- [0102]** El contenido de materia seca se determina por secado en horno en las siguientes condiciones 16 horas a un mínimo de 103 °C.
- 5 **[0103]** El contenido de cenizas se determina por tratamiento de la muestra en un horno de mufla en las siguientes condiciones; gradiente de temperatura (103 °C, 550 °C, 700 °C) durante 20 h.
- [0104]** El término «Prot» se refiere al porcentaje de proteínas dosificadas mediante el método de Kjeldahl.
- [0105]** La columna «Urónicos» permite ilustrar la cantidad de ácidos urónicos recuperados, dosificados por colorimetría.
- 10 **[0106]** El porcentaje de oligosacáridos de cada una de las muestras se puede determinar sustrayendo el porcentaje de azúcares libres del porcentaje de azúcares total.
- [0107]** Cabe destacar que el porcentaje de ácidos urónicos en las muestras analizadas es escaso, preferiblemente inferior a 12 % y, más preferiblemente aún, inferior a 5 %, y esto especialmente en las fracciones de interés E4 y E6.
- 15 **[0108]** Además, después del análisis de los perfiles de oligosacáridos en las diferentes muestras (resultados no mostrados), se demuestra que, en el segundo y el tercer retenido, que constan de la mezcla de oligosacáridos de interés, las cadenas de oligosacáridos presentan poca ramnosa.
- [0109]** De hecho, las cadenas osídicas ionizadas que constan de ramnosa y de ácidos urónicos se ven poco afectadas por la hidrólisis, hecho por el cual la mezcla de oligosacáridos presenta pocas de estas moléculas.
- 20 **[0110]** De esta manera, ventajosamente, la fracción neutra de los oligosacáridos, que constituye la fracción más activa, es la más afectada por la etapa de hidrólisis del método según la invención.
- [0111]** También se ha analizado el perfil de oligosacáridos en las muestras. Se ha encontrado que el porcentaje de oligosacáridos en cada una de las muestras está comprendido entre 40 % y 80 % en masa con relación al peso total de dicha muestra.
- 25 **[0112]** Asimismo, se ha demostrado que las cadenas de los oligosacáridos presentes en las muestras comprendían en particular las siguientes osas: fucosa, arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa.
- [0113]** Efectos de las fracciones de oligosacáridos en las células cutáneas.
- [0114]** Se han analizado las diferentes muestras E1 a E7 para evaluar sus efectos, en particular en las células que intervienen especialmente en los procesos de reparación cutánea.
- 30 **Ejemplo 3:** Ausencia de citotoxicidad de las fracciones obtenidas en los fibroblastos y en los queratinocitos
- [0115]** Se pusieron en cultivo *in vitro* fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos procedentes de pieles adultas (fragmentos de pieles obtenidos durante intervenciones quirúrgicas o cultivos celulares comerciales (Lonza®, Suisse)). Los experimentos se realizaron en células en cultivos primarios para acercarse lo máximo posible a las condiciones existentes *in vivo*.
- 35 **[0116]** Los estudios llevados a cabo en estos cultivos celulares han permitido demostrar que, hasta una concentración del orden de 5mg/mL de oligosacáridos, las muestras que constan de oligosacáridos procedentes de semillas de lino no son citotóxicos para las células de tipo fibroblastos dérmicos o queratinocitos epidérmicos.
- [0117]** Los resultados obtenidos se pueden ver en los histogramas de la figura 2 adjunta. Esta ilustra el número de células vivas, representado por la absorbancia a 450 nm en ordenadas, cuando las células están en presencia
- 40 de las diferentes fracciones de oligosacáridos.
- [0118]** Más en concreto, las fracciones analizadas son el hidrolizado E1 (figura 2A), el segundo retenido E4 (figura 2B, fracción que comprende los oligosacáridos cuyas masas molares están comprendidas entre los puntos de corte de ultrafiltración de 15 000 y 50 000 Da) y el retenido E6 (figura 2C, fracción que comprende los oligosacáridos cuyas masas molares están comprendidas entre los puntos de corte de ultrafiltración de 5 000 y
- 45 15 000 Da).
- [0119]** Estas fracciones se analizaron en diferentes concentraciones (0,5; 1,0; 2,0 y 5,0 mg/mL) en fibroblastos dérmicos humanos adultos cultivados *in vitro* y que alcanzaron la confluencia. El control corresponde a la citotoxicidad del medio de cultivo solo y el control citotóxico corresponde a células cultivadas en fenol (0,1 %).
- [0120]** Para evaluar la citotoxicidad de las diferentes muestras en las células se utiliza la prueba WST-1.

[0121] Los resultados muestran que las muestras analizadas no son citotóxicas para las células, y no conllevan daños, por una parte, en los fibroblastos y, por otra parte, en los queratinocitos (resultados no mostrados) hasta una concentración de oligosacáridos de 5 mg/mL.

5 **[0122]** Además, otros experimentos llevados a cabo han demostrado que no había efectos nocivos como consecuencia de la exposición de fibroblastos y queratinocitos a fracciones de oligosacáridos que presentaban una concentración de 1 mg/mL durante un periodo de 48 h (resultados no mostrados).

Ejemplo 4: Efecto de las fracciones de oligosacáridos en la proliferación de los fibroblastos

10 **[0123]** Se ha demostrado que, además de no tener efectos citotóxicos en las células, los oligosacáridos procedentes de semillas de lino y obtenidos según el método de la invención permiten una estimulación eficaz de la proliferación de los fibroblastos dérmicos.

[0124] El efecto positivo de los oligosacáridos neutros de semillas de lino en los fibroblastos se ilustra en la figura 3. Las células se expusieron a fracciones de oligosacáridos que presentaban una concentración de 1 mg/mL, y la proliferación de los fibroblastos se midió mediante la prueba WST-1 a diferentes tiempos de exposición (24 h, 48 h y 72 h).

15 **[0125]** Los resultados muestran que las fracciones de oligosacáridos analizadas inducen un aumento de la proliferación de los fibroblastos dérmicos. La estimulación de la proliferación es aún más marcada después de 48 h o 72 h de incubación de las células en presencia de los oligosacáridos procedentes de las semillas de lino.

20 **[0126]** También se han llevado a cabo estudios sobre la proliferación de los fibroblastos en función de la concentración de las fracciones de oligosacáridos. Los resultados (no mostrados) permiten observar que la estimulación de la proliferación se observa desde 0,5 mg/mL para las muestras E4 y E6.

Ejemplo 5: Efecto de los oligosacáridos neutros de semillas de lino en el quimiotaxismo

[0127] También se ha demostrado que los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino obtenidos mediante el método de la invención presentan una importante actividad quimiotáctica en los fibroblastos. Este efecto resulta particularmente ventajoso para la reparación tisular.

25 **[0128]** Para ello, se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos adultos *in vitro* en insertos Transwell® que comprendían una membrana, incubándose dichos fibroblastos durante 24 h en presencia o en ausencia (control) de diferentes muestras que comprendían oligosacáridos procedentes de semillas de lino a una concentración de 1 mg/mL.

30 **[0129]** Se evaluó el quimiotaxismo de los fibroblastos dérmicos mediante un recuento del número de células que atravesaban la membrana del inserto.

35 **[0130]** Los resultados, visibles en la figura 4, muestran claramente que los oligosacáridos neutros de lino, obtenidos mediante el método según la invención, inducen un aumento del quimiotaxismo de los fibroblastos dérmicos. Otros experimentos llevados a cabo permitieron demostrar que el efecto quimiotáctico es visible a una concentración muy baja de oligosacáridos (0,5 mg/mL), aumentando este efecto quimiotáctico con concentraciones más elevadas de oligosacáridos. Los resultados se ilustran en la figura 5.

Ejemplo 6: Efecto de los oligosacáridos de semillas de lino en la migración celular

[0131] Se midió la migración celular de los fibroblastos dérmicos a lo largo del tiempo en presencia y en ausencia de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino y obtenidos mediante el método según la invención. Se analizaron los fibroblastos de estos compuestos y se siguió su migración a lo largo del tiempo.

40 **[0132]** Los resultados se ilustran en la figura 6. Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos adultos *in vitro* en insertos Ibdí® que permitían implementar las condiciones de una herida artificial.

[0133] Se incubaron los fibroblastos en presencia de una concentración de oligosacáridos de 1 mg/mL y se siguió la migración de las células durante 48 h mediante un videomicroscopio. De esta manera, se reconstruyó la trayectoria de las células.

45 **[0134]** Resulta claramente visible que las fracciones de oligosacáridos, obtenidas por la implementación del método según la invención y que presentan oligosacáridos neutros con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 5000 y 15 000 Da y entre 15 000 y 50 000 Da, permiten una migración celular importante, lo que induce a un cierre mucho más rápido de una herida artificial *in vitro*.

50 Ejemplo 7: Efecto de los oligosacáridos de semillas de lino en la síntesis de colágeno de tipo III y de tipo IV

[0135] En el presente documento se ha demostrado que las fracciones que constan de oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino conllevan un aumento significativo de la síntesis de colágeno y, sobre todo, del colágeno de tipo III que es sintetizado en primer lugar durante la reparación tisular por los fibroblastos.

5 **[0136]** Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos adultos *in vitro* y se activaron durante 24 h (figura 7A) y 48 h (figura 7B) en presencia y en ausencia de fracciones de oligosacáridos procedentes de semillas de lino, presentando estas una concentración de 1 mg/mL. Se recuperaron los sobrenadantes de cultivo, y se determinó la cantidad de colágeno de tipo III mediante una dosificación con ayuda de un kit comercial ELISA.

[0137] Se pueden ver los resultados de la síntesis de colágeno de tipo III en la figura 7.

10 **[0138]** Esta figura ilustra que las muestras que constan, por una parte, de oligosacáridos neutros con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 5 000 y 15 000 Da y, por otra parte, entre 15 000 y 50 000 Da, obteniéndose dichas muestras mediante el método según la invención, permitiendo un aumento significativo de la síntesis de colágeno de tipo III por los fibroblastos.

[0139] Otros experimentos llevados a cabo también han permitido demostrar que los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino permiten un aumento de la síntesis de colágeno de tipo IV por los fibroblastos.

15 **[0140]** De forma más precisa, se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos *in vitro* hasta la confluencia, después se incubaron las células durante 24 h con diversas muestras, en particular, con las fracciones de oligosacáridos correspondientes al segundo y al tercer permeado y obtenidas mediante la implementación del método según la invención. La concentración de las fracciones es de 1 mg/mL.

20 **[0141]** A continuación, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y se analizó el colágeno IV en el sobrenadante y en la capa celular.

25 **[0142]** Los resultados, ilustrados en la figura 8, muestran que las fracciones de oligosacáridos, extraídos de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido entre 15 000 y 50 000 Da y, por otra parte, entre 5 000 y 15 000 Da, son aptos para activar la síntesis de colágeno IV. Este efecto resulta particularmente ventajoso, puesto que el colágeno IV constituye uno de los componentes esenciales de las membranas basales y la síntesis de este componente tiene tendencia a disminuir durante el envejecimiento.

Ejemplo 8: Efectos de los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino en la síntesis de los pequeños proteoglicanos

30 **[0143]** Los compuestos denominados proteoglicanos y, en particular, los SLRP (*Small Leucine-Rich Proteoglycans*), desempeñan un papel importante en la regulación de la actividad celular y en la organización de las propiedades funcionales de la piel.

[0144] En particular, la decorina y el lumican son proteoglicanos importantes. La decorina es abundante en las pieles adultas y desempeña un papel primordial en la regulación de la homeostasis. La cantidad de decorina en la piel aumenta con la edad. Por el contrario, la cantidad de lumican tiene tendencia a disminuir con la edad. El lumican desempeña un papel en la preservación de las propiedades funcionales de la piel.

35 **[0145]** Se llevaron a cabo experimentos para determinar el impacto de los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino, y obtenidos mediante el presente método, en la síntesis de estos pequeños proteoglicanos.

[0146] Se cultivaron los fibroblastos durante 24 h en presencia de oligosacáridos neutros procedentes del lino a una concentración de 1 mg/mL.

40 **[0147]** Después, se extrajeron los ARN de los fibroblastos y se procedió a realizar una serie de RT-PCR para evaluar la expresión de los genes que codificaban la síntesis de la decorina y del lumican. La expresión del gen de GAPDH sirve de control positivo.

[0148] Los resultados se ilustran en la figura 9 adjunta. Muestran que los oligosacáridos neutros procedentes del lino permiten inducir una disminución de la síntesis de decorina por los fibroblastos dérmicos, mientras que, por el contrario, la expresión del lumican aumenta.

45 **[0149]** En consecuencia, poner en contacto una piel envejecida con oligosacáridos neutros, obtenidos mediante el presente método y con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 5 000 y 15 000 Da o entre 15 000 y 50 000 Da, permite acercarse al fenotipo de una piel más joven.

Ejemplo 9: Efectos de los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino en los queratinocitos

50 **[0150]** Se ha observado, por microscopio óptico, que las fracciones que constan de los oligosacáridos neutros procedentes de semillas de lino presentan un efecto positivo en los queratinocitos epidérmicos.

[0151] En particular, los oligosacáridos neutros inducen una diferenciación de los queratinocitos, estando esta caracterizada más particularmente por un cambio de morfología.

5 **[0152]** Las observaciones con el microscopio se confirmaron mediante experimentos de inmunocitoquímica, en los que se utilizaron diferentes marcadores de diferenciación, como involucrina, marcador de la capa granulosa, o incluso filagrina y loricrina, marcadores de la capa córnea de la epidermis (resultados no mostrados). La aparición de estos marcadores en los queratinocitos es estimulada en gran medida por los oligosacáridos neutros obtenidos mediante el método según la invención.

[0153] La estimulación de la diferenciación de los queratinocitos es beneficiosa para la piel, puesto que aumenta su protección contra las agresiones externas.

10 **[0154]** Por supuesto, la invención no está limitada a los ejemplos ilustrados y descritos anteriormente, los cuales pueden presentar variantes y modificaciones sin alejarse, no obstante, del alcance de la invención.

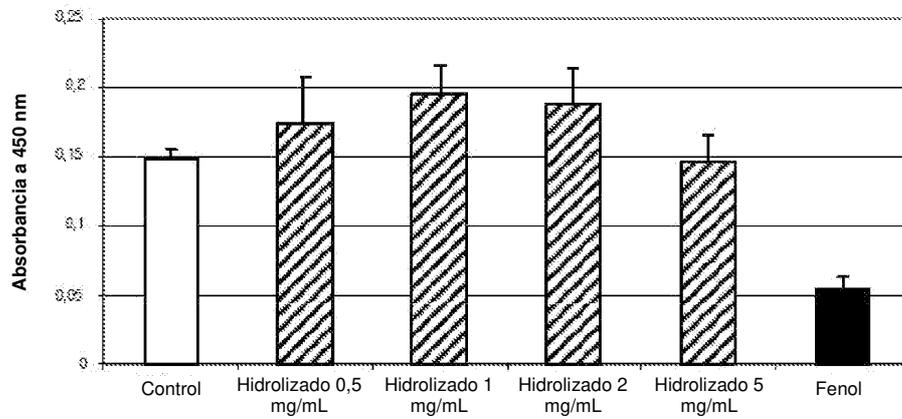
REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino, presentando dichos oligosacáridos masas molares elevadas, estando dicho método **caracterizado por que** consta de las siguientes etapas:
- 5 - se lleva a cabo una hidrólisis con pH ácido de una solución de mucílago de lino, obteniéndose esta última por extracción de semillas de lino en un solvente, realizándose dicha hidrólisis con un pH de 2, a una temperatura del orden de 80°C, durante un periodo de 24h;
- se neutraliza dicha solución añadiendo una base en una cantidad adecuada;
- 10 - se realiza una primera ultrafiltración de la solución a través de una membrana de porosidad 50 000 Da, para obtener un primer retenido y un primer permeado;
- se realiza una segunda ultrafiltración de dicho primer permeado a través de una membrana de porosidad 15 000 Da, para obtener un segundo retenido y un segundo permeado;
- se realiza una tercera ultrafiltración de dicho segundo permeado a través de una membrana de porosidad 5 000 Da, para obtener un tercer retenido y un tercer permeado;
- 15 - se mezcla el segundo retenido y el tercer retenido para obtener dicha mezcla de oligosacáridos, constando dicho segundo retenido de oligosacáridos con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido entre 15 000 et 50 000 Da, y constando dicho tercer retenido de los oligosacáridos con masas molares resultantes del fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte entre 5 000 y 15 000 Da.
- 20 **2. Método según la reivindicación anterior caracterizado por que** la extracción de semillas de lino se realiza en un solvente acuoso.
- 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que** se neutraliza dicha solución de mucílago añadiendo, en una cantidad adecuada, una base fuerte seleccionada de entre el grupo que comprende al menos hidróxido de bario e hidróxido de sodio.
- 25 **4. Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino obtenida por la implementación del método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que** dicha mezcla consta de oligosacáridos con masas molares resultantes de un fraccionamiento por ultrafiltración a un punto de corte comprendido, por una parte, entre 15 000 y 50 000 Da y, por otra parte, entre 5 000 y 15 000 Da.
- 30 **5. Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 4, caracterizada por que** consta de oligosacáridos cuya cadena comprende al menos fucosa y/o arabinosa y/o galactosa y/o glucosa y/o xilosa.
- 6. Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según las reivindicaciones 4 o 5, caracterizada por que** dicha mezcla consta de un índice bajo de oligosacáridos cuya cadena comprende ramnosa y un índice bajo de ácidos urónicos.
- 35 **7. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según una de las reivindicaciones anteriores, para luchar contra los efectos del envejecimiento cutáneo.**
- 8. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para estimular la proliferación de los fibroblastos.**
- 40 **9. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para estimular el quimiotaxismo de los fibroblastos.**
- 10. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para estimular la migración celular de los fibroblastos.**
- 11. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para estimular la síntesis de colágeno de tipo III y/o de tipo IV por los fibroblastos.**
- 45 **12. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para estimular la síntesis de lumican y para inhibir la síntesis de decorina por los fibroblastos.**
- 13. Utilización de una mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según la reivindicación 7, para inducir la diferenciación de los queratinocitos.**

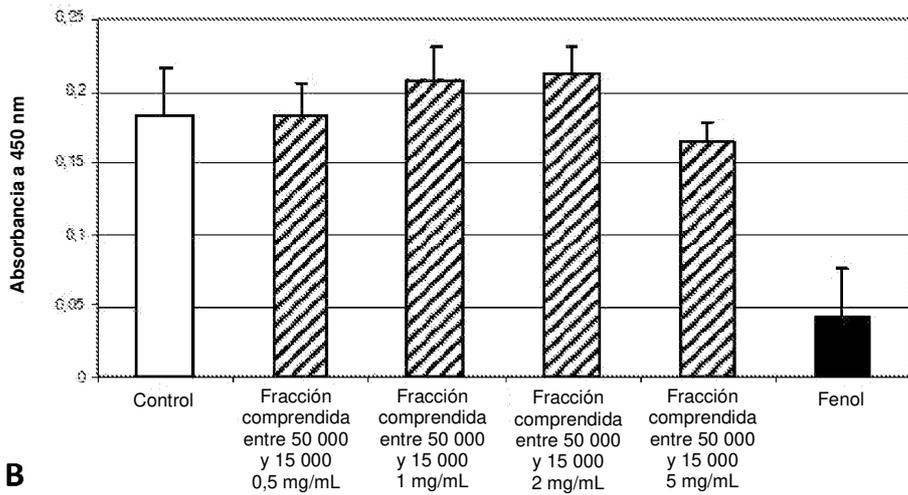
- 14.** Composición dermatológica o cosmética que comprende una mezcla de oligosacáridos neutros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos un vehículo cosmética o dermatológicamente aceptable.
- 15.** Composición dermatológica o cosmética según la reivindicación anterior, en la que la concentración de oligosacáridos neutros está comprendida entre 0,1 y 5 mg/mL.
- 5 **16.** Composición dermatológica o cosmética según las reivindicaciones 14 o 15, **caracterizada por que** se presenta en forma de una crema, de un gel, de una loción, de un sérum, de una espuma o de una pomada.
- 17.** Composición dermatológica o cosmética según una de las reivindicaciones 14 a 16, destinada a aplicarse sobre la piel o en las faneras.
- 10 **18.** Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino según una de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización como medicamento.
- 19.** Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino para su utilización según la reivindicación anterior para favorecer la cicatrización de los tejidos, en particular, en las úlceras crónicas o después de una intervención quirúrgica.
- 15 **20.** Mezcla de oligosacáridos neutros extraídos de semillas de lino para su utilización según la reivindicación 18 para favorecer la reparación tisular cutánea, en particular la cicatrización de una herida.

Muestras	Código	MS (%)	Cenizas/MS	Prot/MS	Sulfatos/MS	Azúcares tot/MS	Azúcares libres/MS	Urónicos/MS	Bario/MS
Tras hidrólisis, neutralizado, centrifugado	E1	0,91%	0,00%	11,42%	0,21%	73,60%	14,80%	11,21%	0,22%
Retenido 50 kD, centrifugado (sobrenadante)	E3	2,73%	5,30%	3,30%	0,01%	42,70%	0,70%	26,24%	0,72%
Permeado 50 kD, concentrado	E2	1,49%	0,90%	12,55%	0,36%	85,30%	19,80%	4,17%	0,02%
Retenido 15 kD, concentrado	E5	0,79%	6,00%	26,91%	0,12%	52,89%	5,70%	11,01%	0,11%
Permeado 15 kD, concentrado	E6	0,68%	0,00%	0,82%	0,06%	92,10%	27,80%	1,62%	
Retenido 5 kD, concentrado	E8	1,10%	0,50%	9,78%	0,26%	88,30%	19,70%	1,34%	
Permeado 5 kD, concentrado	E7	1,23%	3,10%	4,39%	0,38%	87,20%	36,30%	0,71%	

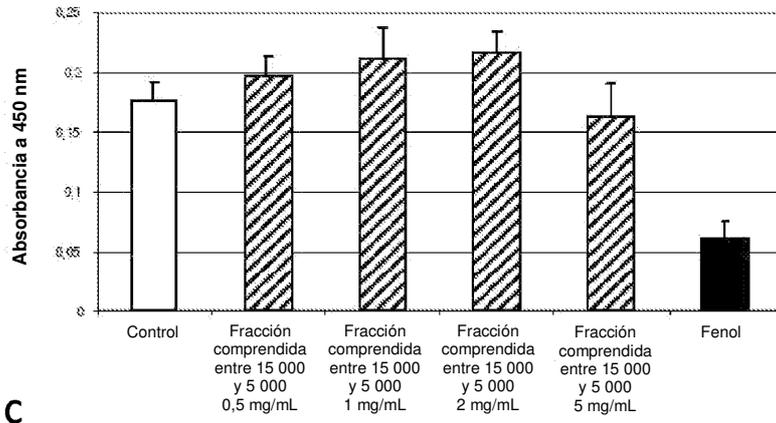
FIG. 1



A



B



C

FIG. 2

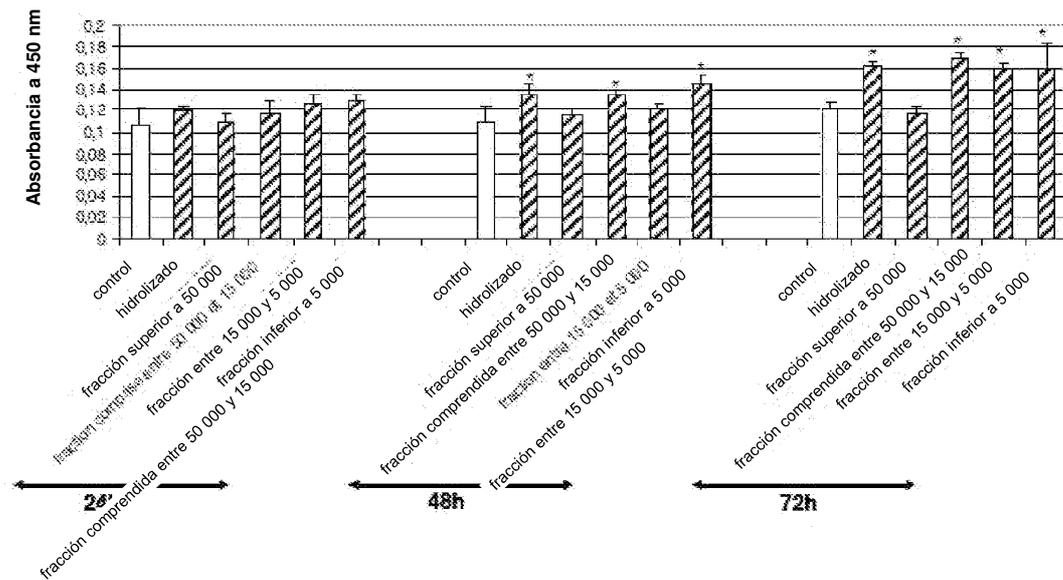


FIG. 3

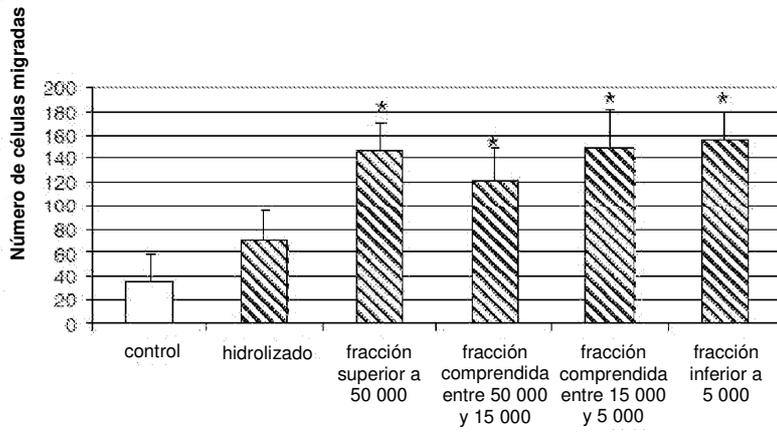


FIG. 4

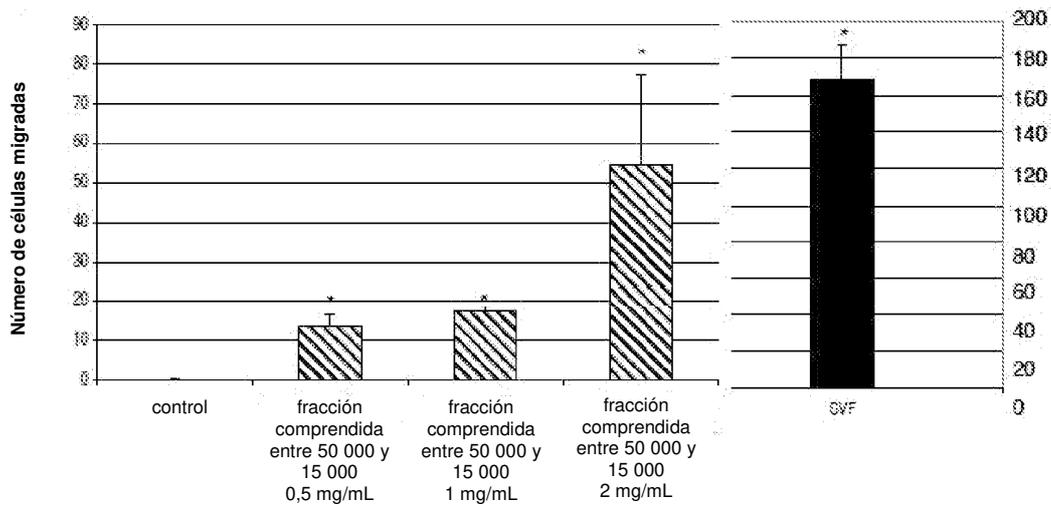


FIG. 5

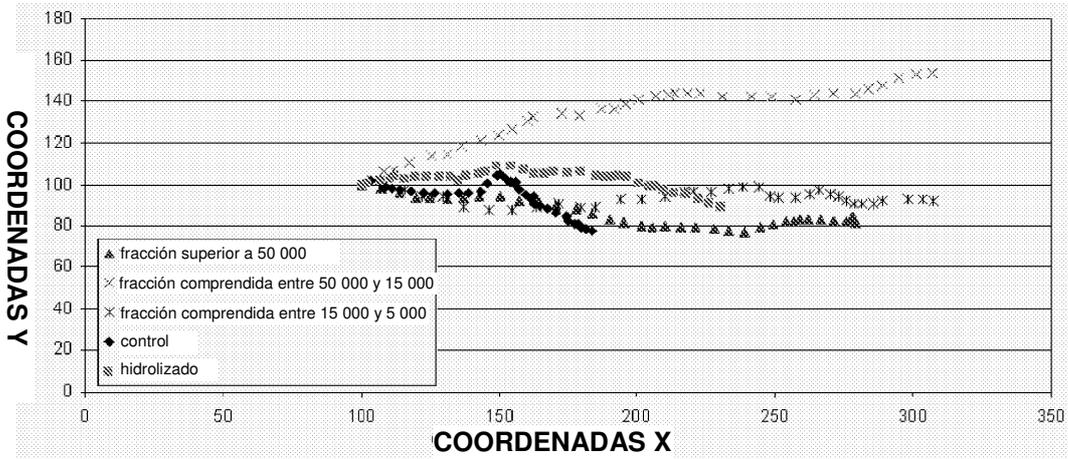
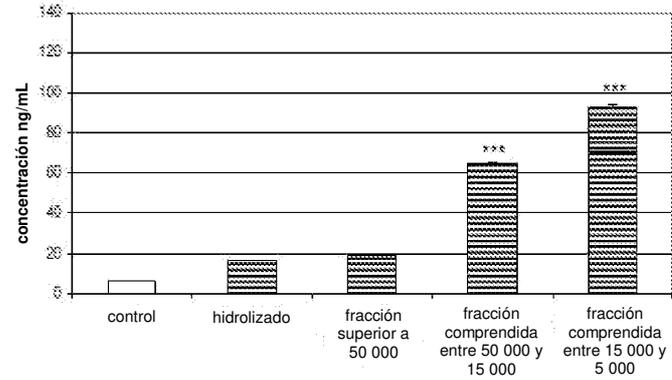
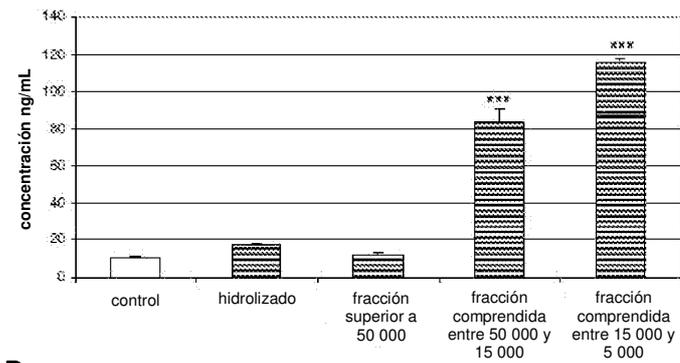


FIG. 6



A



B

FIG. 7

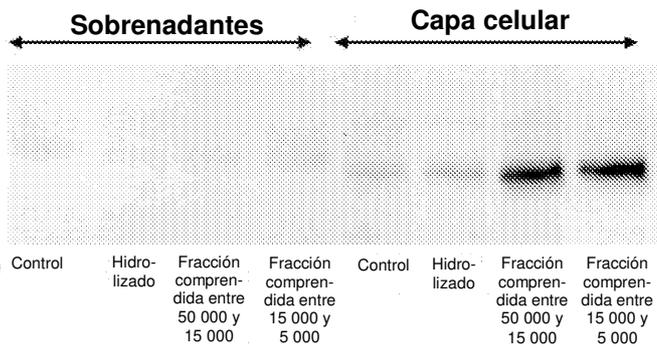


FIG. 8

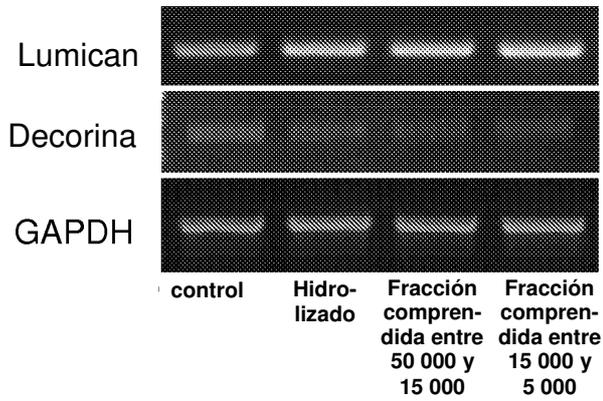


FIG. 9