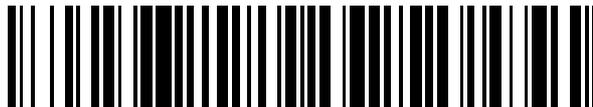


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 424**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 8/99** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2014 PCT/FR2014/050914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14170595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2014 E 14722277 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2986347**

54 Título: **Aplicaciones cosméticas de Lactobacillus Pentosus**

30 Prioridad:

**15.04.2013 FR 1353395**

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

**25.03.2020**

73 Titular/es:

**GREENTECH (100.0%)  
Biopole Clermont-Limagne  
63360 St Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

**RIOS, LAURENT;  
TROPEL, DAVID;  
BERTHON, JEAN-YVES, ANTONIN y  
CHAISEMARTIN, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 750 424 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**

Aplicaciones cosméticas de *Lactobacillus Pentosus*.

5 La invención se refiere a la utilización cosmética y farmacéutica del microorganismo *Lactobacillus pentosus*.

La piel es un órgano en perpetua renovación que cubre la superficie del cuerpo y lo aísla del entorno exterior. La piel forma una protección contra los agentes externos, tales como los ataques químicos y mecánicos, la temperatura, las infecciones, la humedad y las radiaciones. La piel está estructurada en dos compartimientos principales: la epidermis que cubre la superficie de la piel y la dermis profunda.

Aunque la estructura entera de la piel participa activamente en la defensa del cuerpo, el papel de la epidermis es esencial en la prevención de la pérdida de agua y de otros componentes del cuerpo hacia su entorno exterior y en la protección del cuerpo de una variedad de agresiones medioambientales. Su función principal es, por lo tanto, proteger el cuerpo de amenazas exteriores estableciendo unas barreras físicas, químicas, bioquímicas e inmunológicas para las mismas, manteniendo al mismo tiempo una cierta capacidad de intercambios entre los medios exterior e interior.

La epidermis es un epitelio subdividido en varias capas o estratos, desde la capa basal justo encima de la dermis, atravesando las capas granulosa y espinosa, hasta la capa alta, el estrato córneo. El estrato córneo está compuesto por células muertas que no poseen membrana plásmica, ni núcleo, y que están encajadas en una estructura denominada envuelta cornificada (o córnea). La envuelta cornificada es muy resistente y está constituida por proteínas estructurales y por lípidos. Así, el estrato córneo es la capa de la epidermis que desempeña el papel principal en la barrera física.

En efecto, el estrato córneo constituye una barrera impermeable al agua que impide la desecación. Debe hidratarse correctamente para asegurar su función protectora, una descamación normal y permanecer flexible. Para ello, la epidermis produce su propio factor de hidratación natural o NMF (Natural Moisturizing Factor).

El NMF está constituido por varias pequeñas moléculas, tales como la urea, unos aminoácidos, unos ácidos lácticos, unos azúcares o unos iones minerales. Algunos tienen unas propiedades higroscópicas que explican la capacidad para fijar el agua. Otros como el colesterol proporcionan un grado de fluidez y flexibilidad a lo que sería de otra manera un sistema de membranas frágil y rígido.

El NMF representa hasta un 20-30% de la materia seca del estrato córneo y le ayuda a permanecer hidratado. Con la edad, la sequedad de la piel aumenta debido a una disminución del NMF. De manera similar, el nivel de los componentes del NMF se reduce después de lavar la piel con jabón. Una reducción del NMF conduce a una piel seca y a una perturbación de su función de barrera. La piel, menos protegida, se vuelve entonces mucho más susceptible a los desgastes causados por los agentes irritantes. El NMF se considera, por lo tanto, como el componente esencial de la regulación de la homeostasis epidérmica y existe la necesidad de reforzarlo.

Es un objeto de la presente invención aportar una solución biológica a la protección de la función de barrera de la piel y a su reparación tras una agresión exterior.

Así, la invención se refiere a la utilización cosmética o en una composición dermatológica de uso tópico de un principio activo que procede de un cultivo de *Lactobacillus pentosus*. En la presente descripción, *Lactobacillus pentosus* será abreviado *L. pentosus*.

*L. pentosus* es una bacteria láctica que es prevalente en el medio de fermentación de la oliva verde denominada a la Española. Esta especie, probiótica, también presente en el tubo digestivo, es conocida por su capacidad para estimular algunos mecanismos inmunitarios. A título de ejemplo, se informa que favorece la secreción de inmunoglobulinas A salivares en pacientes mayores (Y. Kotani *et al.* 2011), también que estimula de la inmunidad de tipo 1, confiriéndole un papel en la lucha contra algunas infecciones y alergias (SH Koizumi *et al.* 2008). Según el documento JP2008013502A, se conoce la utilización de bacterias lácticas como *L. pentosus* en administración por vía oral, para prevenir o tratar infecciones por *Candida*.

Los autores de la presente invención han descubierto que un extracto de cultivo de *L. pentosus*, en aplicación cutánea, posee unas propiedades beneficiosas sobre la piel, de las cuales algunas son completamente inesperadas. Estas se han observado en primer lugar por la determinación de un parámetro, la pérdida de agua insensible (PEI) que es un buen indicador de la función de barrera de la piel. Se utiliza habitualmente para evaluar los daños cutáneos provocados por algunos agentes químicos, algunas agresiones mecánicas o condiciones patológicas como el eczema. Este parámetro se ha medido en un ensayo que se ilustrará en los ejemplos, y que revela una función real de mejora de la función de barrera de un extracto de cultivo, sobre una piel que presenta una ruptura de la barrera causada mecánicamente, con la ayuda de una cinta adhesiva.

Prosiguiendo sus investigaciones, los autores han puesto en evidencia que, para poseer las propiedades

esperadas, dicho extracto de cultivo debe reunir no solo un sobrenadante, sino también un lisado celular del cultivo.

Un objeto de la invención es, por lo tanto, una utilización cosmética de una asociación de un sobrenadante de cultivo y de un lisado celular de *Lactobacillus pentosus*, para reforzar la función de barrera del estrato córneo, procediendo dicho sobrenadante y dicho lisado celular de un cultivo de *Lactobacillus pentosus* en fase estacionaria, después de la centrifugación del medio de cultivo para obtener un sobrenadante y una biomasa, separación del sobrenadante y de la biomasa, lisis celular completa de la biomasa para obtener el lisado, y mezcla de dicho sobrenadante y dicho lisado en una relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado de 1 a 50. Otro objeto de la invención es una composición dermatológica de uso tópico, que comprende la asociación de un sobrenadante de cultivo y de un lisado celular, procediendo dichos sobrenadante y lisado de un cultivo de *Lactobacillus pentosus* en fase estacionaria, para su utilización en el tratamiento del estado irritado o estacionario de la piel, procediendo dicho sobrenadante y dicho lisado celular de un cultivo de *Lactobacillus pentosus* en fase estacionaria, y después de la centrifugación del medio de cultivo para obtener un sobrenadante y una biomasa, separación del sobrenadante y de la biomasa, lisis celular completa de la biomasa para obtener el lisado, y mezcla de dicho sobrenadante y dicho lisado en una relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado de 1 a 50, estando dicha asociación presente en una concentración del 0,1 al 10% en peso con respecto al peso total de la composición.

Los autores han descubierto que esta asociación permite reunir unas proteínas, unos péptidos, unos polisacáridos y unos aminoácidos y ácidos orgánicos de cadenas cortas y, más generalmente, el conjunto de los compuestos que forman la célula bacteriana y unos metabolitos producidos por *L. pentosus* que, en combinación, mejoran la función de barrera del estrato córneo o acelerando la recuperación cuando está alterada, alimentando el NMF.

El principio activo, a saber la asociación antes citada, se puede obtener de diferentes maneras.

El sobrenadante y el lisado celular pueden proceder del mismo cultivo; según esta variante, pueden proceder directamente de un medio de cultivo: mientras que el principio activo se obtiene por mezclado de la totalidad o parte de dicho sobrenadante y de la totalidad o parte del lisado celular; así, puede presentarse en forma de un extracto total de cultivo, después de que dicho medio o dicho extracto haya sido sometido a una etapa de lisis. Pero, preferentemente, la relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado es superior a 1. Las condiciones de lisis deben conducir a la inactivación y a la liberación de los constituyentes celulares de las células del medio. La lisis es total. Estas condiciones atañen a los conocimientos generales del experto en la materia, provocan la lisis de todas las células del medio. Según otra variante, el sobrenadante y el lisado celular pueden ser separados del medio de cultivo, eventualmente tratados y después reunidos para obtener dicho principio activo. Por tratamiento de uno y/u otro de los sobrenadantes y del lisado celular, se comprende cualquier operación de optimización que tiene como objetivo mejorar su calidad con vistas a las propiedades buscadas.

Los medios de cultivo adaptados para el crecimiento de *L. pentosus* comprenden generalmente unos extractos de levadura, unas peptonas, unas sales, unas fuentes inorgánicas u orgánicas de fosfato, de nitrógeno y de potasio, etc. así como azúcares; estos medios, disponibles en el comercio, así como las condiciones de crecimiento de esta bacteria (pH, temperatura, aireación, agitación, potencial redox, duración) son unas nociones bien conocidas por el experto en la materia. Según la invención, este tipo de medio puede ser puesto a punto por el experto en la materia, puede ser utilizado tal cual está disponible en el comercio, o bien ser modificado, generalmente por la modificación de la concentración y/o de la naturaleza de los ingredientes antes citados, para favorecer el desarrollo de *L. pentosus*.

En la prolongación de sus estudios, los autores han constatado que dicho principio activo presentaba, además, unas propiedades beneficiosas sobre el brillo de la tez.

El brillo de la tez es de origen multifactorial. Es una mezcla ponderal de las características de la textura de la superficie cutánea (por ejemplo, suave o rugosa), de su brillo, de su microcirculación y de su color. La evaluación del brillo de la tez se realiza generalmente por la observación realizada por paneles de expertos.

Así, en la utilización cosmética de la invención, el principio activo precipitado permite reforzar el brillo de la tez.

Un principio activo tal como se ha descrito anteriormente posee una actividad anti-inflamatoria que resulta de su capacidad para inhibir las enzimas de tipo lipooxigenasas. Las lipooxigenasas (LOX) son una familia de dioxigenasas con hierro no hemérico, que representan unas enzimas claves en la biosíntesis de leucotrienos que tienen supuestamente un papel importante en la patofisiología de varias enfermedades inflamatorias y alérgicas. Los productos procedentes de la oxigenación catalizada por los LOX (ácidos hidroperoxi/hidroxi-eicosatetraenoicos, leucotrienos y lipoxinos) están aparentemente implicados en el desarrollo de soriasis y más generalmente en la irritación de la piel.

Se desprende de estas propiedades que una composición dermatológica de la invención tal como se ha definido anteriormente está destinada a ser utilizada en el tratamiento, por aplicación tópica, de las alergias cutáneas y de las enfermedades inflamatorias cutáneas, como la soriasis.

Ya sea para una aplicación cosmética o dermatológica, por vía cutánea, la concentración del principio activo varía ventajosamente del 0,1 al 10% en peso con respecto al peso total de la composición.

La producción del principio activo comprende las etapas siguientes:

5 Para una producción óptima de *L. pentosus*, se cultiva ventajosamente la bacteria, hasta una fase avanzada de la fase exponencial del crecimiento microbiano, preferentemente en fase estacionaria. Un medio particularmente adecuado para la obtención de un principio activo se selecciona de entre los medios M20 y MRS, comercializados, así como estos mismos medios, cuya concentración y/o naturaleza de los ingredientes pueden ser modificados para favorecer el desarrollo de *L. pentosus*. El sedimento y el sobrenadante se recuperan entonces. La etapa de recuperación se realiza de manera convencional, y las técnicas de rutina en microbiología son adecuadas. Así, se puede separar el sobrenadante del medio de cultivo por filtración o centrifugación. La biomasa microbiana resultante se trata con el fin de obtener un lisado de células.

15 Un lisado designa comúnmente un material obtenido al final de la destrucción o disolución de células biológicas por un fenómeno denominado de lisis celular que provoca así la liberación de los constituyentes biológicos intracelulares naturalmente contenidos en las células del microorganismo considerado. En el sentido de la presente invención, el término lisado se utiliza indiferentemente para designar la totalidad del lisado, tal como se ha definido anteriormente, o una fracción de éste, siendo este lisado bruto o habiendo sufrido uno o varios tratamientos, éstos no deben afectar sustancialmente a las propiedades del lisado en un principio activo utilizado según la invención. Por lo tanto, el lisado aplicado está formado, en su totalidad o en parte, por los constituyentes biológicos intracelulares y por los constituyentes de las paredes y membranas celulares. Ventajosamente un lisado utilizado para la invención está constituido por la totalidad del lisado obtenido. Se puede llevar a cabo la lisis celular mediante diferentes tecnologías, tales como un choque osmótico, un choque térmico, los ultrasonidos, o también una tensión mecánica de tipo centrifugación.

Se mezclan entonces el lisado y el sobrenadante de cultivo. La relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado varía de 1 a 50, preferentemente de 5 a 15. El principio activo obtenido se puede utilizar en diferentes formas, tales como una solución, un polvo eventualmente liofilizado atomizado o concentrado.

30 En el marco de la presente invención, el principio activo puede ser formulado bajo cualquier forma galénica apropiada para su administración, por ejemplo en forma de crema, gel, loción, leche, emulsión aceite en agua o agua en aceite, solución, ungüento, pulverizador, aceite corporal, loción para después del afeitado, jabón, barra protectora de labios, barra y lápiz para maquillaje, aerosol, roll-on, stick, bola, polvo, toallita, incorporación en vectores de tipo liposomas, glicosferas, ciclodextrinas, en quilomicrones, macro-, micro-, nano-partículas, así como las macro-, micro- y nanocápsulas y también adsorción sobre polímeros orgánicos en polvo, talcos, bentonitas y otros soportes minerales.

40 Dicho principio activo se puede utilizar con unos aditivos o adyuvantes habituales en cosmetología, como por ejemplo unos agentes antimicrobianos o unos perfumes, pero también unos lípidos de extracción o de síntesis, unos polímeros gelificantes y viscosificantes, unos tensioactivos, y unos emulsificantes, unos principios activos hidro- o liposolubles, unos extractos de plantas, unos extractos tisulares, unos extractos marinos, unos activos de síntesis.

45 Se puede utilizar también con otros principios activos complementarios seleccionados por su acción, por ejemplo para el efecto adelgazante, el efecto anti-celulitis, el efecto reafirmante, el efecto hidratante, el efecto anti-edad, el efecto aclarante, el efecto sobre la coloración de la piel, la actividad antimicrobiana, la actividad anti-oxidante, la actividad anti-radical, el efecto cicatrizante, el efecto tensor, el efecto anti-arrugas, la actividad quelante, la actividad complejante y sequestrante, el efecto calmante, el efecto anti-ojeras, el efecto anti-rojeces, la actividad emoliente, el efecto acondicionador capilar, la actividad anti-caspa, el efecto que estimula el crecimiento del cabello, el efecto que inhibe la caída del cabello, el efecto de recubrimiento capilar, la actividad depilatoria, la actividad que limita el crecimiento del pelo, la actividad que participa en la renovación celular, la actividad que modula la respuesta inflamatoria, la actividad que participa en el mantenimiento del óvalo de la cara, pero también en la protección solar, la actividad anti-irritante, la nutrición celular, la respiración celular, los tratamientos anti-seborreicos, la tonicidad cutánea, la protección del cabello.

Cuando dicho principio activo se utiliza con unos principios activos complementarios, éstos están generalmente presentes a una concentración suficientemente elevada para que puedan ejercer su actividad.

60 Según la presente invención, la utilización es preferentemente diaria, y la aplicación de una o varias veces por día. Se tolera muy bien, y no presenta ninguna toxicidad y, para periodos de tiempo prolongados, no implica ningún efecto sistémico.

65 Se describe a continuación un procedimiento ventajoso de preparación de un principio activo cosmético o dermatológico para uso tópico, a base de un medio de cultivo de *L. pentosus*. Este procedimiento, que no es un objeto de la invención, comprende las etapas siguientes:

Se obtiene un cultivo de *L. pentosus* hasta la fase estacionaria,  
 Se centrifuga el medio de cultivo con el fin de obtener un sobrenadante de cultivo y una biomasa microbiana,  
 Se separa el sobrenadante de la biomasa,  
 Se realiza una lisis celular de la biomasa para obtener un lisado celular, y  
 Se mezcla el sobrenadante y el lisado.  
 La relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado varía de 1 a 50.

Por supuesto, cualquier etapa complementaria, por ejemplo de tratamiento de uno y/u otro del sobrenadante y de la biomasa, bien conocido por el experto en la materia, se puede efectuar para obtener un principio activo tal como se ha descrito anteriormente.

La invención se refiere también a la cepa *L. pentosus* CNCM I-4730 tal como se ha depositado el 4 de abril de 2013 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM).

La presente invención se ilustra ahora, de manera no limitativa, por los ejemplos siguientes y la figura adjunta.

La figura ilustra la actividad anti-inflamatoria de un extracto de cultivo utilizado según la presente invención, por el análisis de la liberación y/o síntesis de la interleucina 8 (en pg/ml) por unas epidermis reconstruidas estimuladas.

**Ejemplo 1: Cultivo de *L. pentosus* CNCM I-4730**

La cepa *L. pentosus* CNCM I-4730 se produce en un fermentador de 80 l en el medio de cultivo presentado en la tabla 1. El medio se inocula con un inóculo del 3% (volumen/volumen) a partir de un cultivo de *L. pentosus* CNCM I-4730 de 24h de edad. El crecimiento de la cepa de *L. pentosus* CNCM I-4730 se realiza a 30°C con una agitación de 50 rpm sin llegada de aire, ni regulación de pH. El cultivo se lleva a cabo hasta la fase estacionaria, es decir 20 horas después de su inoculación.

Tabla 1: medio de cultivo de *L. pentosus* CNCM I-4730

Medio de cultivo	
Ingrediente	Concentración en g/l de medio de cultivo
Extracto de levadura	15,00
Glucosa	20,00
Tween® 80	1,08
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00
Acetato de sodio	5,00
Citrato de amonio	2,00
MgSO <sub>4</sub>	0,20
MnSO <sub>4</sub>	0,05

**Ejemplo 2: preparación del principio activo utilizado según la invención**

El cultivo obtenido en las condiciones descritas en el ejemplo 1 se centrifuga totalmente sobre centrifugadora en continuo, del tipo Sharpless, a 15000 rpm con el fin de separar la biomasa microbiana y el sobrenadante de cultivo. Después, se tratan la biomasa celular y el sobrenadante de la siguiente manera.

Preparación del lisado de células de *L. pentosus* CNCM I-4730

Se recupera la biomasa microbiana (aproximadamente 900 g de sedimento con un 21-25% de materia seca) y después se resuspende en 5 volúmenes de agua y se centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos. Después de la eliminación del agua, se recupera la biomasa. La biomasa así lavada se diluye en una solución 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una proporción másica 50/50. La preparación se calienta a 100°C durante 1h30 min con el fin de realizar la lisis de las células bacterianas.

Preparación del sobrenadante

Se filtran 60 l de sobrenadante procedente de la centrifugación Sharpless anterior a 0,2 µm sobre un filtro placa. Se recupera el filtrado.

Preparación del extracto de *L. pentosus* CNCM I-4730

Con el fin de obtener el extracto de cultivo según la presente invención, se mezcla un volumen del lisado de células de *L. pentosus* CNCM I-4730 con 9 volúmenes de sobrenadante, y después se ajusta el pH a 4 con NaOH.

**Ejemplo 3: Formulación posible del activo a base del extracto de *Lactobacillus pentosus* CNCM I-4730 obtenido según el ejemplo 2.**

El principio activo obtenido en el ejemplo 2 se formula a pH 5,5 según la composición siguiente, en porcentaje másico:

Agua	89.39
SEPIGEL™ 305	2.00
LABRAFAC™ CC	5.00
MICROCARE® PM4	1.00
SILK&CARE	0.50
Extracto <i>L. pentosus</i>	2.00
NaOH 10%	0.09
Ácido cítrico 10%	0.02
Total	100.00

**Ejemplo 4: Actividad antiinflamatoria**Actividad antiinflamatoria evaluada *in vitro* por un ensayo de inhibición de la actividad de la 5-lipoxigenasa (LOX-5)

La LOX-5 es una enzima implicada en el proceso proinflamatorio que permite la formulación de leucotrienos inflamatorios a partir del ácido araquidónico.

La actividad antiinflamatoria de un extracto de cultivo, obtenido en el ejemplo 2, se evalúa *in vitro* por su capacidad para inhibir la LOX-5. Esta se estima por espectrofotometría (a 233 nm), por inhibición de la transformación del ácido linoleico en ácido hidroxiperoxilinoico. El seguimiento de la inhibición de la actividad LOX-5 por diferentes concentraciones del extracto de cultivo permite determinar el IC<sub>50</sub> de este extracto, es decir la concentración de dicho extracto de cultivo necesaria para inducir una inhibición del 50% de la actividad LOX-5.

Para ello, en un medio de reacción (3 ml) que contiene 2950 µl de tampón fosfato (0,1 M, pH=7,4), 1000 unidades de la enzima LOX-5 (10 µl) y 50 µM de ácido linoleico (10 µl), se añaden 30 µl del extracto de cultivo obtenido anteriormente a diferentes diluciones (0 - 16,8 - 56 - 112 mg materia seca/ml de extracto).

Los resultados de este estudio han permitido poner en evidencia una actividad antiinflamatoria del extracto de cultivo, por inhibición de la actividad 5-lipoxigenasa con una IC<sub>50</sub> de 0,674 mg de materia seca/ml de extracto.

Actividad antiinflamatoria evaluada *in vitro* sobre la síntesis y la liberación de la interleucina 8 (IL-8) por unas epidermis reconstruidas estimuladas

Se han estimulado unas epidermis reconstruidas por el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), un agente pro-inflamatorio. La estimulación de las epidermis reconstruidas por el PMA a 0,3 µg/ml durante 24h provoca un estado inflamatorio y genera una importante liberación y/o síntesis de IL-8.

La liberación y/o síntesis de IL-8 han sido evaluadas por el método inmuno-enzimático ELISA, a partir de los sobrenadantes de cultivo de las epidermis reconstruidas de la siguiente manera:

- epidermis no tratadas,
- epidermis tratadas con el PMA para imitar el estado inflamatorio,
- epidermis pre-tratadas con dexametasona (10<sup>-7</sup>M), una hormona glucocorticoide de síntesis que sirve de control), y después tratadas con el PMA,
- epidermis pre-tratadas con el extracto de cultivo obtenido anteriormente, a diferentes concentraciones (0,112 y 0,280 mg de materia seca/ml de extracto), y después tratadas con el PMA.

La pre-incubación de las epidermis reconstruidas con la dexametasona ha inhibido la liberación y/o síntesis de IL-8 en 2,4 veces.

La pre-incubación de las epidermis reconstruidas con el extracto de cultivo obtenido en el ejemplo 2, a 0,112 mg/ml y 0,280 mg/ml, ha disminuido significativamente en 1,8 y 2,4 veces la liberación y/o síntesis de IL-8, respectivamente.

Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 1. Han permitido poner en evidencia una potente actividad antiinflamatoria del extracto de cultivo obtenido para la presente invención. En efecto, el extracto de cultivo a las

concentraciones de 0,112 mg y 0,280 mg de materia seca/ml de extracto, ha inhibido la liberación y/o síntesis de IL-8 inducida por el agente proinflamatorio PMA. Se observa que esta actividad se acerca (para la concentración de 0,112 mg/ml) y es similar (para la concentración de 0,280 mg/l) a la de la dexametasona.

**5 Ejemplo 5: Efecto de protección de la función de barrera cutánea**

Se ha realizado un estudio clínico en doble ciego sobre 8 voluntarios humanos (8 mujeres de tipo caucásico de 19 a 69 años de edad) con el fin de estimar, a nivel del antebrazo, el efecto protector de la función de barrera cutánea de un principio activo según la presente invención preparado según el ejemplo 2.

Cada voluntaria aplicó, en uno de sus antebrazos, una formulación cosmética que contenía un 2% de dicho principio activo (es decir 2 g de extracto de cultivo por 100 g de composición), y en su otro antebrazo una formulación cosmética placebo (formulación de composición idéntica pero que no contenía extracto de cultivo para la presente invención). La distribución de los antebrazos se ha realizado de manera aleatoria. Quince minutos después de la aplicación de estas formulaciones, la función de barrera cutánea de los dos antebrazos es alterada por un método denominado de "tape-stripping" definido por 8 ciclos sucesivos, de 2 segundos cada uno, de aplicación/retirada de una banda adhesiva.

La evaluación de la función de barrera cutánea se realiza antes de la aplicación de las formulaciones y 30 minutos después de la agresión cutánea por "tape-stripping" mediante la medición de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL = *TransEpidermal Water Loss*) gracias a la utilización de un Tewameter™ TM 300 (comercializado por Courage + Khazaka electronic). La medición de la TEWL permite estimar el grado de evaporación de agua que se difunde a través del estrato córneo ( $g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ ). Una alteración de la función de barrera cutánea induce una pérdida transepidérmica de agua y, por lo tanto, un aumento de la TEWL. Cuanto más débil sea la TWEL más se preservará la función de barrera.

Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 2 siguiente

Tabla 2

<b>Porcentaje de variación de la TEWL 30 minutos después de la agresión cutánea</b>	
Formulación placebo	Formulación con el extracto de cultivo al 2%
13,8 ± 4	4 ± 0,7

El extracto de cultivo para la presente invención, utilizado al 2% en formulación cosmética, presenta una actividad de protección de la función de la barrera cutánea. En efecto, la pérdida en agua transepidérmica (TEWL) medida 30 minutos después de la agresión cutánea aumenta sólo en  $4 \pm 0,7\%$  en las personas que han recibido una aplicación de la formulación que contiene el extracto de cultivo para la presente invención, mientras que este aumento es de  $13,8 \pm 4\%$  en las personas que han recibido una aplicación de la formulación placebo.

El extracto de cultivo presenta un efecto protector sobre la función de barrera cutánea.

**40 Ejemplo 6: Efecto de reparación de la función de barrera cutánea**

Se ha realizado un estudio clínico en doble ciego sobre 14 voluntarios humanos (14 mujeres de tipo caucásico de 18 a 69 años de edad) con el fin de estimar, a nivel del antebrazo, el efecto reparador de la función de barrera cutánea (después de una agresión cutánea por "tape-stripping") de un principio activo para la presente invención. Durante 13 días (D-7 a D+6), dos veces al día, cada voluntaria aplicó, en uno de sus antebrazos, una formulación cosmética que contenía un 2% en peso de extracto de cultivo para la presente invención (es decir 2 g de extracto de cultivo por 100 g de formulación), tal como se ha preparado en el ejemplo 2; en su otro antebrazo una formulación cosmética placebo (formulación de composición idéntica pero que no contiene extracto de cultivo). La distribución de los antebrazos se ha realizado de manera aleatoria. El D0, después de 7 días de aplicación de los dos tipos de formulaciones, la función de barrera cutánea de los dos antebrazos es alterada por "tape-stripping" (8 ciclos sucesivos, de 2 segundos cada uno, de aplicación/retirada de una banda adhesiva). El seguimiento de la función de barrera cutánea se realiza el D0 después de la agresión cutánea, el D+1, el D+2 y el D+6, mediante la medición de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL = *TransEpidermal Water Loss*) gracias a la utilización de un Tewameter™ TM 300 (comercializado por Courage + Khazaka electronic). La medición de la TEWL permite estimar el grado de evaporación de agua que se difunde a través del estrato córneo ( $g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ ). Una alteración de la función de barrera cutánea induce una pérdida transepidérmica de agua y, por lo tanto, un aumento de la TEWL. Cuanto más débil sea la TWEL más se preserva la función de barrera. El efecto de reparación de la función de barrera cutánea se determina por el seguimiento del porcentaje de variación de la TEWL a lo largo del tiempo después de la agresión cutánea, tomando como referencia la medición de la TEWL realizada justo después de la agresión cutánea. El efecto reparador corresponderá a una disminución en el tiempo de este porcentaje de variación de la TEWL.

Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

<b>Porcentaje de variación de la TEWL a lo largo del tiempo después de la agresión cutánea</b>			
	el D+1	el D+2	el D+6
Formulación placebo	12,9 ± 3	8,5 ± 1,3	-1,8 ± 0,3
Formulación con un 2% del extracto de cultivo según la presente invención	5,9 ± 1,1	-1,1 ± 0,3	-5,4 ± 1,1

5

Estos resultados confirman que un principio activo utilizado según la presente invención presenta un efecto protector sobre la función de barrera cutánea, ya que un día (D+1) después de la agresión cutánea, el porcentaje de variación de la TEWL aumenta sólo en  $5,9 \pm 1,1\%$  en las personas que han recibido la formulación que contiene el extracto de cultivo para la presente invención, en comparación con el aumento de  $12,9 \pm 3\%$  en las personas que han recibido la formulación placebo.

10

El extracto de cultivo para la presente invención acelera y amplifica la recuperación de la función de barrera cutánea. En efecto, a partir de dos días (D+2) después de la agresión cutánea, el porcentaje de variación de la TEWL es negativo ( $-1,1 \pm 0,3\%$ ) lo cual significa que la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) es inferior a la medida justo después de la agresión cutánea (valor de referencia). Seis días (D+6) después de la agresión cutánea, la recuperación de la función de barrera cutánea es 2,8 veces más importante en las personas que han recibido la formulación que contiene el extracto de cultivo utilizado según la presente invención (porcentaje de variación de la TEWL de  $-5,4 \pm 1,1\%$ ) con respecto a las personas que han recibido la formulación placebo (porcentaje de variación de la TEWL de  $-1,8 \pm 0,3\%$ ).

15

20

El extracto de cultivo utilizado según la presente invención acelera y amplifica la reparación de la función de barrera cutánea.

**Bibliografía**

25

Y. Kotani *et al.*: Oral intake of Lactobacillus pentosus strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial, *Immunity & Ageing* 2010, 7:11, 1-11.

30

SH Koizumi *et al.*: Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1+ cell-dependent activation of type 1 immunity by Lactobacillus pentosus strain S-PT84, *Immunology Letters* 2008, 120, 14-19.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización cosmética de una asociación de un sobrenadante de cultivo y de un lisado celular de *Lactobacillus pentosus*, para reforzar la función de barrera del estrato córneo, procediendo dicho sobrenadante y dicho lisado celular de un cultivo de *Lactobacillus pentosus* en fase estacionaria, después de la centrifugación del medio de cultivo para obtener un sobrenadante y una biomasa, separación del sobrenadante y de la biomasa, lisis celular completa de la biomasa para obtener el lisado, y mezcla de dicho sobrenadante y de dicho lisado en una relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado de 1 a 50.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado varía de 5 a 15.
3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, para reforzar el brillo de la piel.
- 15 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el sobrenadante y el lisado proceden del mismo cultivo.
- 20 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el o los cultivos de *Lactobacillus pentosus* son el (los) de la cepa *Lactobacillus pentosus* CNCM I4730 tal como se ha depositado el 4 de abril de 2013 de acuerdo con el tratado de Budapest ante la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM).
- 25 6. Composición dermatológica de uso tópico que comprende la asociación de un sobrenadante de cultivo y de un lisado celular, procedentes de un cultivo de *Lactobacillus pentosus*, para su utilización en el tratamiento del estado irritado o inflamatorio de la piel, procediendo dicho sobrenadante y dicho lisado celular de un cultivo de *Lactobacillus pentosus* en fase estacionaria, después de la centrifugación del medio de cultivo para obtener un sobrenadante y una biomasa, separación del sobrenadante y de la biomasa, lisis celular completa de la biomasa para obtener el lisado, y mezclado de dicho sobrenadante y de dicho lisado en una relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado de 1 a 50, estando dicha asociación presente en una concentración del 0,1 al 10% en peso con respecto al peso total de la composición.
- 30 7. Composición según la reivindicación 6, caracterizada por que la relación ponderal entre el sobrenadante y el lisado varía de 5 a 15.
- 35 8. Cepa *Lactobacillus pentosus* CNCM I-4730 tal como se ha depositado el 4 de abril de 2013 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM).

Figura

