

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901968137A1

Publication Date

20130128

Applicant

GIULIANI S.P.A.

Title

PLANTARICINE E BIOMASSA COMPRENDENTE PLANTARICINE PER L'USO
IN CAMPO COSMETICO E MEDICO.

- 1 -

Plantaricine e biomassa comprendente plantaricine per
l'uso in campo cosmetico e medico

La presente invenzione concerne plantaricine e biomassa comprendente plantaricine per l'uso in campo cosmetico e medico. In particolare, la presente invenzione concerne l'utilizzo di plantaricina A, N o K o loro miscele o di una biomassa contenente una o più delle plantaricine sopra menzionate eventualmente in associazione con i batteri lattici impiegati per la loro preparazione e loro usi nella stimolazione dell'angiogenesi e, quindi, di un adeguato apporto di sangue di fondamentale importanza nella normale crescita cellulare e nei processi di crescita dei capelli.

Il follicolo pilifero va incontro a cicli di trasformazioni passando da una fase di quiescenza (telogen), ad una fase di crescita (anagen) con una rapida proliferazione dei cheratinociti follicolari e l'allungamento del fusto del capello a cui segue una fase di regressione (catagen) che porta all'involuzione del follicolo. Questi cambiamenti ciclici comportano un rimodellamento dei componenti epiteliali e dermali.

E' noto che durante la fase anagen di crescita dei capelli si assiste a una fase di sviluppo della rete vascolare, probabilmente per aumentare l'afflusso di elementi nutritivi che supportino a pieno le esigenze della rapida divisione cellulare. Al contrario, durante la fase telogen, la perdita dei

capelli è accompagnata da una scomparsa dei vasi sanguigni a livello della papilla dermica e del bulbo in generale.

L'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e dei suoi recettori è correlata alla formazione di capillari.

La presenza di VEGF nel bulbo del capello è necessaria per l'induzione e il mantenimento di una efficace angiogenesi nel ciclo di vita del capello. In particolare, l'espressione di VEGF nel follicolo umano varia durante il ciclo del capello, in particolare: durante la fase anagen VEGF è fortemente espresso, mentre diminuisce durante la fase catagen e telogen.

In esperimenti condotti in vitro è stato ulteriormente evidenziato che VEGF è un fattore di crescita autocrino per le cellule della papilla dermica. La formazione di nuovi vasi sanguigni che avviene attraverso l'espressione di VEGF è un meccanismo regolato. L'espressione di VEGF è infatti indotta in cellule trattate con interleuchina-6, interleuchina-1beta, TGF-beta.

È inoltre noto che sostanze farmacologiche, come il Minoxidil, sono attive sulla vascolarizzazione attraverso l'induzione di VEGF e attraverso questo meccanismo esplicano la propria efficacia in situazioni di alopecia.

Ad oggi, quindi, sono noti i metodi impiegati per ripristinare la funzione del follicolo in situazioni di perdita dei capelli che si basano sulla sti-

molazione di VEGF, esistono infatti sostanze (peptidi) di origine vegetale che mimano l'azione di questo fattore di crescita tanto da essere definite growth factor like.

E' stato recentemente osservato che i batteri sono in grado di rilasciare e percepire molecole segnale come risposta a cambiamenti dell'ambiente circostante, incluse variazioni della propria densità cellulare e/o del numero di cellule di altre specie microbiche che popolano lo stesso ecosistema (Sturme et al., 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFA1. *Microbiology* 153: 3939-3947). Nei batteri lattici, tali risposte, che si manifestano secondo un meccanismo di "quorum sensing" (QS), includono molecole segnale denominate auto-induttori di tipo 2 (AI-2, soprattutto derivati dei furanoni), sintetizzate attraverso l'attività dell'enzima LuxS (Miller e Basler, 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6: 191-197), o molecole segnale denominate peptidi feromoni o peptidi auto-induttori (AIP) (Nakajama et al., 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 41: 145-154). E' stato recentemente dimostrato, che il genoma di *L. plantarum* WCFS1 contiene un elevato numero di geni che codificano per peptidi di AIP, insieme ad altri geni che codificano per altre funzioni coinvolte nei meccanismi di "quorum sensing" (Sturme et al., 2007.

Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFA1. *Microbiology* 153: 3939-3947). Alcuni studi hanno dimostrato che il sistema deputato alla sintesi di peptidi feromone di tipo plantaricina è coinvolto nei meccanismi di comunicazione cellulare intra-specie. In questo caso il peptide feromone è utilizzato come strumento per misurare la densità cellulare della specie che sintetizza la molecola (Diep et al., 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl Environ Microbiol* 60:160-166). Altri studi hanno anche dimostrato che peptidi feromone di tipo plantaricina possono essere coinvolti nei meccanismi di comunicazione cellulare inter-specie. In particolare, la presenza di microrganismi competitori può attivare il sistema di regolazione che è coinvolto nei meccanismi di antagonismo microbico (Maldonado et al., 2004. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* 181: 8-16). In presenza di elevate densità cellulari di altre specie microbiche, il peptide feromone favorisce una serie a cascata di reazioni di fosforilazione che coinvolgono complessi fenomeni di regolazione metabolica, i quali culminano con la sintesi di molecole segnale che nel caso specifico fungono da composti antimicrobici di tipo batteriocina (es. plantaricine di tipo A, K e N) (Hauge et al., 1998. Plantaricin A

is an ampkiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* 37:16026-16032).

Sebbene il meccanismo di comunicazione cellulare tra cellule procariotiche ed eucariotiche sia stato in parte dimostrato, molto limitata è la letteratura a riguardo delle interazioni tra molecole segnale coinvolte nei meccanismi di "quorum sensing" dei batteri (es. peptidi feromoni) e le cellule della mucosa intestinale dell'uomo. L'unico esempio è rappresentato dal pentapeptide CSF, sintetizzato dal microrganismo probiotico *Bacillus subtilis*, quale molecola segnale coinvolta nei fenomeni di competenza e sporulazione (Fujija et al., 2007. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 1:299-308). E' stato dimostrato che questo pentapeptide è in grado di causare l'induzione della chinasi p38 MAP, della chinasi B (Akt) e della criotolleranza, favorendo la prevenzione del danno ossidativo a livello intestinale e rinforzando così le funzioni di barriera. Allo stato attuale delle conoscenze, nessuna pubblicazione o brevetto ha, inoltre, considerato l'effetto di molecole segnale, coinvolte nei meccanismi di comunicazione cellulare tra i batteri, nei confronti del follicolo pilifero.

Gli inventori della presente invenzione hanno ora trovato che la plantaricina, in particolare la

planatricina A, ha un effetto positivo sulle stimolazione di VEGF, quindi, sull'angiogenesi, da parte di cheratinociti.

Le plantaricine possono essere di origine sintetica o prodotte mediante procedimenti microbiologici. E' inoltre vantaggioso l'impiego delle biomasse ottenute mediante procedimenti microbiologici e che contengono plantaricine. La preparazione di biomassa contenente plantaricine può vantaggiosamente avvenire mediante la co-coltivazione di due batteri lattici: *L. plantarum* DC400 (depositato presso il DSMZ in data 21 Dicembre 2009 con N. DSM 23213) e *L. rossiae* DPPMA174 (depositato presso il DSMZ in data 21 Dicembre 2009 con N. DSM 23214). La coltivazione di *L. plantarum* DSM 23213 in condizioni di co-coltura con *L. rossiae* DSM 23214 è in grado di attivare la sintesi di peptidi feromone del tipo plantaricina (in particolare plantaricina A) ottenendo concentrazioni ca. 50 volte superiori rispetto a quelle osservate in presenza della mono-coltura di *L. plantarum* DC400 (DSM 23213). E' stato inoltre dimostrato che la co-coltivazione di *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) con altre specie di batteri lattici, anche esse isolate da "lievito naturale", non è in grado di stimolare la sintesi di peptidi feromone come nel caso dell'associazione con *L. rossiae*. Altro aspetto importante del procedimento sopra menzionato è che la sintesi di plantaricina A è possibile non solo su terreni colturali usualmente impiegati per la coltivazione di batteri lattici in laboratorio, ma anche

su mosto d'uva, siero di latte ed estratti acquosi di prodotti orto-frutticoli. Questo procedimento di co-coltura per l'ottenimento delle plantaricine è oggetto delle domande di brevetto IT RM2010A000004 e PCT/IT2011/000003 in cui è riportata la sintesi di biomassa contenente plantaricine, in particolare plantaricina tipo A (PlnA) come meccanismo di risposta alla co-coltivazione dei due batteri lattici *L. plantarum* e *L. rossiae* che popolano uno stesso ecosistema alimentare, quale il "lievito naturale" usato per la produzione di lievitati da forno. Le domande di brevetto descrivono un protocollo biotecnologico standardizzato ed ottimizzato che prevede la co-coltivazione dei due batteri in CDM (Chemically Defined Medium), WFH (Wheat Flour Hydrolyzate) (Gobbetti, 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Technol* 9:267-274), mosto d'uva (diluito all'1% di carboidrati solubili, aggiunto di 0,5% di maltosio e 0,5% di estratto di lievito, pH 5,6), siero di latte (aggiunto di 0,5% di maltosio e 0,5% di estratto di lievito, pH 5,6) o estratti acquosi di prodotti orto-frutticoli (aggiunto di 0,5% di maltosio e 0,5% di estratto di lievito, pH 5,6) per 18 - 24 h a 30 - 37°C. In particolare, prima della co-coltivazione, i batteri lattici sono coltivati per 24 h, raccolti mediante centrifugazione (10.000 x g per 15 min a 4°C), lavati due volte in tampone fosfato 50 mM, pH 7,0 e risospesi in acqua alla densità cellulare di 9,0 log ufc/ml, inoculati (4%, per ciascuna specie) in con-

dizioni di co-coltura su uno dei terreni colturali menzionati sopra.

Al termine della coltivazione, le cellule possono essere o meno allontanate dalla brodo-coltura mediante centrifugazione sottoponendo, quindi, il surnatante ad un processo di disidratazione mediante essiccazione o liofilizzazione.

Coltivando *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) e *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) in condizioni di co-coltura su uno qualunque dei substrati precedentemente descritti è stata osservata la sintesi di plantaricina A ad una concentrazione compresa tra 2,5 e 4,0 µg/mL. In condizioni di mono-coltura, la concentrazione di plantaricina A sintetizzata da *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) è risultata dell'ordine di ca. 0.06 µg/mL. In condizioni di co-coltura con altre specie di batteri lattici (es. *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus rhamnosus*) la sintesi di plantaricina A è risultata decisamente inferiore. In condizioni di co-coltivazione con *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214), è stata osservata anche la sintesi di altri peptidi feromone, quali plantaricina tipo K e N, sebbene a concentrazioni inferiori rispetto la plantaricina A, e precisamente nell'intervallo di 0,02-0,06 µg/ml.

In una valutazione biologica in vitro su cheratinociti, l'incubazione con differenti concentrazioni 0.1, 1 e 10 µg/ml di plantaricina A, sia di origine sintetica sia contenuta nella biomassa descritta so-

pra, condotta per tempi di contatto differenti è risultata stimolare VEGF.

Gli inventori della presente invenzione hanno inoltre trovato che la biomassa ottenuta mediante il procedimento descritto sopra e contenente una o più plantaricine, eventualmente in associazione con i batteri lattici *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) e *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214), ha una maggiore efficacia nel promuovere l'angiogenesi a livello del bulbo rispetto all'impiego della plantaricina da sola.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione una biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso come cosmetico per il trattamento dei capelli e degli annessi cutanei quali ciglia e sopracciglia.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso, cosmetico o farmaceutico, nel trattamento

o nella prevenzione della caduta dei capelli.

La presente invenzione concerne inoltre una biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, preferibilmente plantaricina A, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso, cosmetico o farmaceutico, nel trattamento o nella prevenzione degli stati di alterazione del cuoio capelluto, quali ad esempio alopecia indotta da chemioterapia, alopecia indotta da radioterapia, alopecia aerata, alopecia androgenetica, telogen effluvium, o degli annessi cutanei quali ciglia e sopraciglia.

La biomassa secondo la presente invenzione o dette una o più plantaricine sono in grado, infatti, di migliorare lo stato di salute dei capelli, di rinforzare il follicolo pilifero, di aumentare la vascolarizzazione migliorando l'apporto di nutrienti alle cellule.

La biomassa secondo la presente invenzione può essere preparata mediante un procedimento che comprende le o consiste nelle seguenti fasi:

- a) propagare in coltura i due batteri lattici *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214;
- b) co-inoculare un substrato scelto nel gruppo che consiste in CDM, WFH, mosto d'uva, siero di latte o estratti di prodotti orto-frutticoli, con una sospen-

sione acquosa dei batteri lattici definiti nella fase a);

c) incubare; ed, eventualmente,

d) centrifugare la brodo-coltura per rimuovere le cellule dei batteri lattici.

In particolare, la sospensione della fase a) può avere una densità cellulare pari a ca. 9,0 Log ufc/ml per ciascuna delle due specie ed può essere aggiunta al substrato in una percentuale che varia dall'1 al 4% rispetto al volume del substrato.

L'incubazione è condotta ad una temperatura da 30 a 37°C, preferibilmente 30°C, per 18 - 24 h, preferibilmente 18 h. La centrifugazione è condotta a 10.000 x g per 15 min a 4°C. Il procedimento di preparazione della biomassa può comprendere ulteriormente una fase e) di disidratazione del surnatante ottenuto nella fase d) mediante essiccazione o liofilizzazione.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica o cosmetica comprendente o consistente in una biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, della biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, per gli usi definiti sopra.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

Figura 1 (A-D) mostra i grafici dei valori di VEGF ottenuti nei cheratinociti umani NCTC2544 da esperimenti di Elisa assay nei cheratinociti umani NCTC2544. Le NCTC2544 sono state sottoposte trattamenti con solo terreno di coltura (controllo positivo); PlnA di sintesi 10 µg/ml; biomassa contenente PlnA da co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DC400 e *Lactobacillus rossiae* DPPMA174, contenente PlnA ad una concentrazione di 10 µg/ml; o acido ialuronico ad una concentrazione di 200 µg/ml. Le analisi sono state effettuate dopo incubazione a 37°C, 5% CO₂ per 4 (Fig. 1A), 8 (Fig. 1B), 16 (Fig. 1C) e 24h (Fig. 1D).

ESEMPIO 1: *Studio sugli effetti della plantaricina A e della biomassa comprendente plataricine sulla proliferazione cellulare dei cheratinociti*

MATERIALI E METODI

Culture cellulari

La linea utilizzata è una linea cellulare di cheratinociti umani NCTC 2544 (Perry V.P. et al., 1957) mantenuta in coltura in fiasche sterili, incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ in terreno di coltura MEM (Minimum Essential Medium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), L-glutammina 2mM, 1% di aminoacidi non essenziali, in presenza di 1% di penicillina e streptomicina. Le cellule crescono in vitro aderendo alla superficie delle piastre di coltura, in monostrato.

Composti testati

- Biomassa comprendente plantaricine, in particolare Plantaricina A, da co-coltura di *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) e *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214);
- Plantaricina A di sintesi (NeoMPS PolyPeptide laboratories S.A.-Strasburgo, Francia);
- Controllo positivo (cellule non trattate);
- Controllo commerciale (acido ialuronico);

FASE 1

1.1 Scongelamento della coltura cellulare

La procedura prevede lo scongelamento della linea cellulare, stoccata in cryovials a -80°C , la successiva eliminazione del terreno esausto e del DMSO mediante centrifugazione e la risospensione delle cellule in terreno di coltura completo.

1.2 Propagazione della linea cellulare

Si utilizza la linea immortalizzata di cheratinociti umani NCTC 2544 (15) mantenuta in coltura in fiasche sterili, incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO_2 in terreno di coltura MEM (Minimum Essential Medium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), L-glutammina 2mM, 1% di aminoacidi non essenziali, in presenza di 1% di penicillina e streptomicina.

Lo split 1:3 della linea cellulare si effettua ogni 2 giorni al raggiungimento del monostrato mediante lavaggio con PBS 1X (tampone fosfato senza Ca^{2+} e Mg^{2+}) e distacco delle cellule con una soluzione di tripsina-EDTA a 37°C per 2 minuti.

FASE 2

2.1 Test di citotossicità mediante MTT assay

(per la determinazione delle concentrazioni non citotossiche di biomassa da utilizzare)

Il saggio serve a valutare la diminuzione di vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno, (*MTT bromide*) corrispondente ad un sistema policiclico ($C_{18}H_{16}BrN_5S$) dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando - per apertura dell'anello tetrazolico - un composto cromogeno azotato detto *formazano*, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R^1NH-N=CR^2-N=NR^3$.

Si utilizza la linea immortalizzata di cheratinociti umani NCTC 2544 mantenuta in coltura in fiasche sterili, incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ in terreno di coltura MEM (Minimum Essential Medium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), L-glutammina 2mM, 1% di aminoacidi non essenziali, in presenza di 1% di penicillina e streptomicina.

La procedura prevede:

- Trasferimento delle cellule in fase di crescita esponenziale in piastre da 96 pozzetti;
- Incubazione overnight a 37°C;
- Sostituzione del terreno di coltura con 100 µl delle sostanze da testare;
- Incubazione a 37°C, 5% CO₂ per 24/48h/72h;
- Terminato il tempo di incubazione aspirazione del terreno ed effettuare lavaggi con PBS;

- Diluizione della soluzione stock di MTT, precedentemente preparata, in terreno completo senza rosso fenolo (10 µl di soluzione stock in 100 µl di terreno completo senza rosso fenolo);
- Applicazione dell'MTT alle cellule (100µl) e incubazione per 3h a 37°C;
- Terminata l'incubazione, eliminazione dell'MTT dai pozzetti e estrazione del formazano mediante risospensione delle cellule in 100 µl di soluzione di DMSO;
- Lettura spettrofotometrica a 570 e 630nm;

FASE 3

Analisi della risposta cellulare al danno mediante valutazione dei livelli di espressione di VEGF-A mediante Elisa assay.

Si utilizza la linea immortalizzata di cheratinociti umani NCTC 2544 mantenuta in coltura in fiasche, incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ in terreno di coltura MEM (Minimum Essential Medium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), glutammina 2mM, 1% di aminoacidi non essenziali, in presenza di 1% di penicillina e streptomina. L'esperimento richiede in un primo tempo, lo sviluppo di un monolayer di cellule confluenti in piastre da 12 pozzetti.

Successivamente al raggiungimento della confluenza le cellule sono state esposte al trattamento con i composti da testare per 4, 8, 16, 24h. I composti da testare sono stati diluiti in terreno colturale completo fino ad ottenere le seguenti concen-

trazioni di trattamento: PlnA da co-coltura 0,1-1-10 μ g/ml; PlnA di sintesi 0,1-1-10 μ g/ml; acido ialuronico (da soluzione commerciale di Connettivina, Fidia S.p.A.) 200 μ g/ml. Cellule incubate nel solo terreno colturale sono state utilizzate come controllo positivo.

Al termine di ogni tempo di incubazione sono stati raccolti i surnatanti colturali e sottoposti ad Elisa assay per VEGF-A.

ELISA è l'acronimo di Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, è una tecnica, per la quantificazione di proteine che riesce a combinare la specificità di un anticorpo con la sensibilità di un semplice saggio enzimatico, utilizzando anticorpi o antigeni coniugati con enzimi. Le piastre da 96 pozzetti utilizzate per il saggio sono piastre pre-stratificate con l'anticorpo specifico per la proteina da saggiare (VEGF-A).

Gli standard e i campioni sono aggiunti successivamente nei pozzetti insieme ad una soluzione di anticorpo biotinilato specifico per la proteina da testare ed ad una miscela di avidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP). Dopo incubazione una soluzione di substrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) verrà aggiunta ad ogni pozzetto.

Solo i pozzetti contenenti la proteina di interesse manifesteranno un cambiamento di colore.

La reazione enzima-substrato termina con l'aggiunta di una soluzione di acido solforico e si misurerà il cambiamento di colore attraverso uno

spettrofotometro alla lunghezza d'onda di $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

La concentrazione di proteina nei campioni è stata poi determinata attraverso il confronto tra l'O.D. dei campioni rispetto alla curva standard.

RISULTATI

Tabella 1: MTT assay

Controllo e composti testati	Concentrazioni (µg/ml)	Vitalità % ± sd		
		Dopo 24h di trattamento	Dopo 48h di trattamento	Dopo 72h di trattamento
Controllo negativo*	100µg/ml	111.295±0.165	104.483±0.404	112.302±0.173
	200µg/ml	115.239±0.171	121.738±0.280	108.653±0.289
	400µg/ml	107.767±0.086	84.848±0.069	0.990±0.009
	0.01µg/ml	103.380±0.000	131.860±0.362	147.042±0.491
	0.1µg/ml	95.850±0.317	128.819±0.378	130.530±0.375
PlnA (biomassa)	1µg/ml	98.970±0.074	117.653±0.305	111.475±0.042
	10µg/ml	89.360±0.306	136.660±0.061	107.983±0.460
	50µg/ml	2.030±0.010	1.497±0.008	1.592±0.004
	100µg/ml	2.200±0.005	2.685±0.004	1.901±0.001
	0.01µg/ml	105.730±0.116	138.014±0.397	126.372±0.250
PlnA (di sintesi)	0.1µg/ml	99.200±0.206	133.595±0.497	130.791±0.206
	1µg/ml	106.810±0.014	116.679±0.697	130.886±0.251
	10µg/ml	113.350±0.143	106.629±0.433	109.432±0.308
	50µg/ml	122.560±0.132	67.736±1.348	147.565±0.180
	100µg/ml	94.360±0.014	82.537±0.923	15.110±0.424

*Acido ialuronico in formulazione spray (Fidia Farmaceutici)

La tossicità è stata testata mediante MTT assay sia per la Plantaricina (PlnA) di sintesi sia per la biomassa da co-coltura sui cheratinociti NCTC 2544.

Rispetto al controllo (cellule non trattate) l'incubazione con PlnA di sintesi da 0.01 a 50 µg/ml aumenta significativamente ($p < 0.05$) la proliferazione cellulare (Tab. 1), mentre l'esposizione a 100 µg/ml causa un decremento significativo ($p < 0.05$) della proliferazione cellulare.

L'effetto maggiore della PlnA di sintesi è riscontrato dopo 72h.

Dopo 48 e 72h di incubazione l'esposizione alla biomassa da cocoltura contenente PlnA da 0.01 a 10 µg/ml determina un aumento significativo ($p < 0.05$) della proliferazione cellulare. Dopo 24 h di incubazione non si riscontra nessun aumento significativo. Con incubazioni di biomassa da co-coltura contenente PlnA maggiori o uguali a 50 µg/ml si osserva una diminuzione marcata della proliferazione cellulare.

L'acido ialuronico a 100 e 200 µg/ml aumenta la proliferazione cellulare. In seguito ad incubazione di 48 e 72h con acido ialuronico 400 µg/ml si ha un'inibizione della proliferazione cellulare.

Rispetto alla PlnA di sintesi e alla biomassa da co-coltura, l'acido ialuronico risulta meno efficace nell'incrementare la proliferazione cellulare.

La figura 1 A-D mostra che l'espressione di VEGF risulta marcatamente indotta sia dal trattamento con PlnA di sintesi, ma soprattutto dalla biomassa da co-coltura contenente PlnA.

Anche l'acido ialuronico, utilizzato come controllo negativo commerciale stimola la sintesi del gene VEGF ma l'effetto risulta inferiore rispetto a quello prodotto dalla Plantaricina A.

In particolare, per tutti i tempi di trattamento considerati la PlnA da cocoltura 10 µg/ml provoca il più alto incremento di VEGF. In particolare, a 10 µg/ml l'induzione ad opera della PlnA da cocoltura risulta sempre maggiore rispetto alla stessa quantità di PlnA di sintesi.

Questo studio ha dimostrato quindi come il peptide feromone PlnA, che è comunemente coinvolto nei meccanismi di quorum-sensing dei batteri lattici sia percepito positivamente dai cheratinociti umani.

ESEMPIO 2: LOZIONE TOPICA

Componente (nome chimico/INCI)	Quantità p/p(%)
Alcool denaturato.....	13 - 18
Mannitol.....	0,5 - 2
Betain.....	0,05 - 0,5
PEG - 40 Hydrogenated castor oil.....	0,1 - 0,5
VP/VA Copolymer.....	0,01 - 0,05
Parfum.....	0,05 - 0,2
Biomassa contenente Plantaricina A...	0,001 - 0,8
Aqua.....	q.b. 100

ESEMPIO 3: MASCARA ALLUNGANTE RINFORZANTE

Componente (nome chimico/INCI)	Quantità p/p(%)
Biomassa contenente Plantaricina A...	0,001 - 0,80
Isopropyl alcohol.....	5 - 10
Cera alba/beeswax.....	5 - 10

Stearic acid.....	3,0 - 5,0
Tricontanyl PVP.....	3,0 - 5,0
Dimethicone.....	3,0 - 5,0
Ceteareth - 12.....	1,0 - 3,0
Mica.....	1,0 - 3,0
Cera Carnauba/Carnauba Wax.....	1,0 - 3,0
Glyceryl stearate.....	1,0 - 3,0
Silica.....	1,0 - 3,0
Ceteth - 20.....	1,0 - 3,0
Polyvinyl alcohol.....	1,0 - 3,0
Phenoxyethanol.....	0,5 - 1,0
Parfum.....	0,1 - 0,7
Panthenol.....	0,1 - 1,0
Propylene glycol.....	0,1 - 1,0
Disodium stearyl glutamate.....	0,1 - 1,0
Ammonium hydroxide.....	0,01 - 1,0
Propylparaben.....	0,05 - 0,19
Diazolidinyl Urea.....	0,05 - 0,5
Hydrolyzed keratin.....	0,01 - 1,0
Disodium EDTA.....	0,02 - 0,10
Quaternium - 15.....	0,01 - 0,2
Aluminium hydroxide.....	0,01 - 1,0
C.I. 77007/Ultramarines.....	q.b
C.I. 77491, 77492, 77499/Iron Oxides.....	q.b.
C.I. 77891/Titanium dioxide.....	q.b.
Aqua.....	q.b. 100 g

ESEMPIO 4: SHAMPOO

Componente (nome chimico/INCI).....	Quantità p/p(%)
Disodium Laureth Sulfosuccinate.....	1 - 5
Magnesium Laureth Sulfate.....	5 - 9
PEG - 7 Glyceryl Cocoate.....	0,50 - 1,0

Cocamide MIPA.....	0,5 - 2,0
Peg - 200 Hydrogenated Glyceryl Palmate	0,5 - 2,0
Polyquaternium - 10.....	0,1 - 0,5
Tetrasodium EDTA.....	0,05 - 0,20
Sodium Lauroyl Sarcosinate.....	1 - 4
Tetrasodium EDTA.....	0,05 - 0,20
BHA.....	0,05 - 0,015
Potassium Undecilenoyl Wheat Protein.	0,50 - 1
Laureth - 4.....	0,01 - 0,80
Parfum.....	0,10 - 0,80
Glycol Distearate.....	0,50 - 1,0
Laureth - 7.....	0,50 - 0,80
Sodium Cocoamphoacetate.....	0,05 - 3,0
Cocamidopropyl Betaine.....	0,01 - 2
Sodium Laureth Sulfate.....	0,01 - 3
Sodium Hydroxymethylglycinate.....	0,20 - 0,45
Biomassa contenete Plantaricina A ...	0,005 - 1,0
Benzoic acid.....	0,5 - 0,10
Sodium hydroxyde.....	q.b.
Citric acid.....	q.b.
Aqua.....	q.b. 100

ESEMPIO 5: LOZIONE TRATTAMENTO ALOPECIA ANDROGE-
NETICA

Componente (nome chimico/INCI).....	Quantità p/v (%)
Hydroxypropyltrimonium hyaluronathe..	0,005 - 0,50
Polyurethane - 26.....	0,004 - 4
Lecithin.....	0,005 - 5
Alcohol denat.....	15 - 20
PEG - 40 Hydrogenated Castor Oil.....	0,5 - 2
Octadecyl di-t-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate	0,02 -

0,05

Parfum..... 0,10 - 0,25
 Helianthus annuus seed oil..... 0,001 - 0,01
 Lactic acid..... q.b. a pH 4,9
 Biomassa contenente Plantaricina A... 0,001 - 0,50
 Aqua..... q.b. 100 ml

ESEMPIO 6: SIERO TRICOLOGICO

Componente (nome chimico/INCI)..... Quantità p/v(%)
 Hydroxypropyltrimonium Hyaluronat... 0,005 - 0,50
 Polyurethane - 26..... 0,004 - 4
 Lecithin..... 0,005 - 5
 Alcohol denaturato..... 15 - 20
 Hydrogenated Castor oil..... 0,50 - 0,9
 Octadecyl Di-t-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate
 0,01 - 0,05
 Parfum..... 0,01 - 0,05
 Ethoxydiglycol..... 0,05 - 1,0
 Hydroxypropyl guar..... 0,1 - 0,8
 Lactic acid..... q.b. to pH=5
 Biomassa contenente Plantaricina A... 0,001 - 0,50
 Aqua..... q.b. 100 ml

ESEMPIO 7: BALSAMO CONDIZIONANTE

Componente (nome chimico/INCI)..... Quantità p/p(%)
 Behentrimonium Methosulfate..... 0,5 - 3,0
 Panthenol..... 0,5 - 3,0
 Cetearyl Alcohol..... 0,5 - 4,0
 Palmitic acid..... 0,5 - 4,0
 Mirystic acid..... 0,5 - 4,0
 Hydrolyzed Wheat Protein..... 0,05 - 1,0
 Cetrimonium Chloride..... 1,0 - 3,0
 Penthylene glycol..... 5,0

- 24 -

Phenoxyethanol..... 0,5 - 1,0
Parfum..... 0,1 - 0,3
Biomassa contenente Plantaricina A... 0,01 - 0,50
Aqua..... q.b. 100 g

Barzanò & Zanardo Roma SpA

RIVENDICAZIONI

- 1) Biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso come cosmetico per il trattamento dei capelli e degli annessi cutanei quali ciglia e sopraciglia.
- 2) Biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso nel trattamento o nella prevenzione della caduta dei capelli.
- 3) Biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, detta biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214 o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, detta biomassa e dette una o più plantaricine per l'uso nel trattamento o nella prevenzione degli stati di alterazione del cuoio capelluto o degli annessi cutanei quali ciglia e sopraciglia.
- 4) Biomassa o plantaricine per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui gli stati di alterazione del cuoio capelluto sono scelti nel gruppo che consiste in alopecia indotta da chemioterapia, alopecia indotta da radioterapia, alopecia aerata, alopecia andro-

genetica, telogen effluvium.

5) Biomassa per l'uso secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detta biomassa viene preparata mediante un procedimento che comprende le o consiste nelle seguenti fasi:

a) propagare in coltura i due batteri lattici *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214;

b) co-inoculare un substrato scelto nel gruppo che consiste in CDM, WFH, mosto d'uva, siero di latte o estratti di prodotti orto-frutticoli, con una sospensione acquosa dei batteri lattici definiti nella fase a);

c) incubare; ed, eventualmente,

d) centrifugare la brodo-coltura per rimuovere le cellule dei batteri lattici.

6) Biomassa per l'uso secondo la rivendicazione 5, in cui, la sospensione della fase a) ha una densità cellulare pari a ca. 9,0 Log ufc/ml per ciascuna delle due specie ed è aggiunta al substrato in una percentuale che varia dall'1 al 4% rispetto al volume del substrato.

7) Biomassa per l'uso secondo ognuna delle rivendicazioni 5-6 in cui l'incubazione è condotta ad una temperatura da 30 a 37°C, preferibilmente 30°C, per 18 - 24 h, preferibilmente 18 h.

8) Biomassa per l'uso secondo ognuna delle rivendicazioni 5-7, in cui la centrifugazione è condotta a 10.000 x g per 15 min a 4°C.

9) Biomassa per l'uso secondo ognuna delle rivendica-

zioni 5-8, in cui il procedimento comprende ulteriormente una fase e) di disidratazione del surnatante ottenuto nella fase d) mediante essiccazione o liofilizzazione.

10) Composizione farmaceutica o cosmetica comprendente o consistente in una biomassa comprendente una o più plantaricine A, N o K, della biomassa essendo ottenuta mediante co-coltura di *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 e *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o una o più plantaricine scelte tra plantaricina A, K o N, per l'uso come definito in ognuna delle rivendicazioni da 1 a 9.

Barzanò & Zanardo Roma SpA

CLAIMS

- 1) Biomass comprising one or more plantaricins A, N or K, said biomass being obtained by co-culture of *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 and *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, or one or more plantaricins chosen among plantaricin A, K or N, said biomass and said one or more plantaricins for use as cosmetic for the treatment of hair and eyelashes or eyebrow cutaneous adnexa.
- 2) Biomass comprising one or more plantaricins A, N or K, said biomass being obtained by co-culture of *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 and *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, or one or more plantaricins chosen among plantaricin A, K or N, said biomass and said one or more plantaricins for use in the treatment or prevention of loss of hair.
- 3) Biomass comprising one or more plantaricins A, N or K, said biomass being obtained by co-culture of *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 and *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, or one or more plantaricins chosen among plantaricin A, K or N, said biomass and said one or more plantaricins for use in the treatment or prevention of change conditions of scalp or eyelashes or eyebrow cutaneous adnexa.
- 4) Biomass or plantaricins for use according to claim 3, wherein change conditions of scalp are chosen from the group consisting of alopecia induced by chemotherapy, radiotherapy, alopecia areatum, androgenic alopecia, telogen effluvium.
- 5) Biomass for use according to anyone of claims 1-

- 2 -

4, wherein said biomass is prepared by a process comprising or consisting of the following steps:

a) culture propagation of *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 and *Lactobacillus rossiae* DSM 23214 lactic acid bacteria;

b) co-inoculation of a substrate selected from the group consisting of CDM, WFH, grape must, milk serum or fruit and vegetable product extracts, with aqueous suspension of lactic acid bacteria as defined in step a);

c) incubation; and, optionally,

d) centrifugation of the culture broth in order to remove the lactic acid bacteria cells.

6) Biomass for use according to claim 5, wherein the cell density of suspension from step a) is about 9.0 Log ufc/ml for each lactic acid bacteria species and it is added to the substrate in a percentage ranging from 1 to 4% respect to the substrate volume.

7) Biomass for use according to anyone of the claims 5-6, wherein the incubation is carried out at a temperature from 30 to 37°C, preferably 30°C, for 18 - 24 hours, preferably 18 hours.

8) Biomass for use according to anyone of the claims 5-7, wherein the centrifugation is carried out at 10.000 x rpm for 15 min a 4°C

9) Biomass for use according to anyone of the claims 5-8, further comprising the step e) for dehydration of the supernatant obtained in step d) by means drying or freeze-drying.

10) Cosmetic or pharmaceutical composition comprising

- 3 -

or consisting of a biomass comprising one or more plantaricins A, N or K, said biomass being obtained by co-culture of *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 and *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, or one or more plantaricins chosen among plantaricin A, K or N for use as defined in anyone of the claims 1-9.

BARZANO' & ZANARDO ROMA SPA

Fig.2

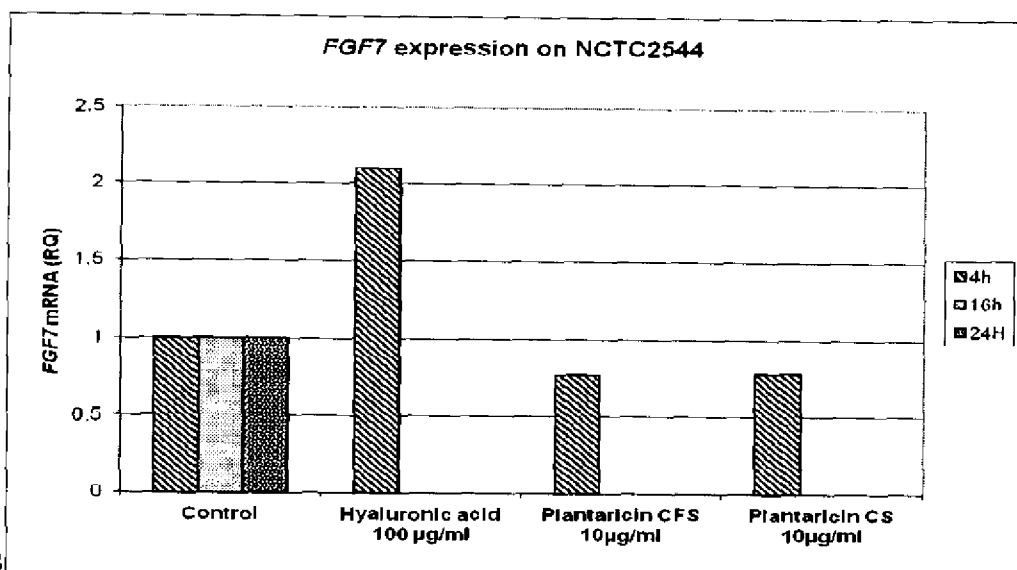


Fig. 3

