

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 228**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/99 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2018** **PCT/US2018/035800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2018** **WO18226556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2018** **E 18814429 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3634375**

54 Título: **Potencial antienviejecimiento del metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC5856**

30 Prioridad:

06.06.2017 US 201762516077 P
06.06.2017 US 201762516083 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

SAMI-SABINSA GROUP LIMITED (100.0%)
19/1 & 19/2, I Main, II Phase Peenya Industrial Area
Bangalore, Karnataka 560058, IN

72 Inventor/es:

MAJEED, MUHAMMED;
NAGABHUSHANAM, KALYANAM;
ARUMUGAM, SIVAKUMAR;
ALI, FURQAN;
MAJEED, SHAHEEN y
MUNDKUR, LAKSHMI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 228 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

Potencial antienviejecimiento del metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC5856

5 Referencia cruzada a solicitud de patente relacionada

La presente invención es un registro no provisional de la Solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62516083 presentada el 06 de junio de 2017 y 62516077 presentada el 06 de junio de 2017.

10 Campo de la invención

La invención en general se refiere a las aplicaciones biológicas del metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856. Más específicamente, la presente invención divulga el potencial antienviejecimiento del metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

15 Descripción del estado de la técnica

Con el aumento de la edad, la piel humana se ve sometida a muchos cambios que incluyen arrugas, flacidez y una mayor laxitud que revelan visiblemente los signos del envejecimiento. Existen muchos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al envejecimiento cutáneo, tales como hormonas, microflora asociada a la piel, pH cutáneo, reducción del contenido lipídico del estrato córneo, disminución de la absorción de especies reactivas del oxígeno (ROS), mayor actividad de las metaloproteinasas, desecación, laxitud, arrugas finas y atrofia de la piel. De los factores mencionados, muchos son naturales y no pueden alterarse. Existen otros factores que provocan el envejecimiento prematuro de la piel y sobre los que se puede influir para inducir un envejecimiento de la piel grácil.

En la actualidad, la prevención del envejecimiento cutáneo es un objetivo ampliamente perseguido por los agentes de la industria en el campo de los cosméticos y existe una mayor demanda de productos naturales que prevengan el envejecimiento de la piel. Los probióticos se utilizan actualmente en la industria del cuidado de la piel debido a los beneficios que aportan a la salud. El papel de los probióticos en el envejecimiento, la belleza, el fotodaño y la salud de la piel están bien descritos en los siguientes documentos de la técnica anterior:

1. Sharma D, Kober MM y Bowe WP, Anti-Aging Effects of Probiotics, J Drugs Dermatol. Ene 2016; 15(1):9-12
2. Benedetta Cinque, Paola Palumbo, Cristina La Torre, Esterina Melchiorre, Daniele Corridoni, Gianfranca Miconi, Luisa Di Marzio, Maria Grazia Cifone y Maurizio Giuliani, Probiotics in Aging Skin, Textbook of Aging Skin, pp. 1315-1327
3. Probiotics Provide Anti Aging Defense, LIFE EXTENSION MAGAZINE, Octubre 2015 <http://www.lifeextension.com/Magazine/2015/10/Probiotics-Provide-Anti-Aging-Defense/Page-01>, consultado el 24 de mayo de 2018.

Actualmente, tanto los probióticos como sus metabolitos extracelulares se están incorporando a los productos para el cuidado de la piel (Katie Schaefer, Anti-aging Probiotic from *Bacillus coagulans*, <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/active/142099203.html>, 9 de marzo de 2012, consultado el 26 de mayo de 2018). Sin embargo, es bien sabido en la técnica científica que los efectos biológicos de los probióticos o de sus productos son específicos de cada cepa y no pueden generalizarse entre géneros, especies y cepas (Probiotics: In Depth/NCCIH, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Institutos Nacionales de Salud). Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar una cepa probiótica superior y su producto extracelular que puedan utilizarse eficazmente para reducir todos los signos del envejecimiento cutáneo. La presente invención resuelve el problema mencionado divulgando los efectos beneficiosos de la preparación de metabolitos extracelulares parcialmente purificados de *Bacillus coagulans* en la reducción del envejecimiento de la piel.

Además, las composiciones tópicas para la reducción de los signos visibles del envejecimiento que comprenden un portador dermatológicamente aceptable y una cantidad antienviejecimiento de un producto extracelular de *Bacillus coagulans*, por ejemplo, *Bacillus coagulans* Hammer, preferiblemente *Bacillus coagulans* cepa Hammer No. De acceso ATCC 31284, se divulga en US2015/0044317 A1.

El objetivo principal de la invención es dar a conocer la actividad antienviejecimiento de una composición que contiene una preparación de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 mediante la inhibición de las actividades de la collagenasa y la elastasa, y el aumento de la expresión del TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico y el ácido hialurónico.

Otro objetivo de la invención es dar a conocer la actividad antiglicación de una composición que contiene una preparación de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

La presente invención cumple los objetivos mencionados y proporciona otras ventajas relacionadas.

65 Depósito de material biológico

El depósito del material biológico *Bacillus coagulans* con número de acceso MTCC 5856, mencionado en la presente solicitud se ha realizado el 19 de septiembre de 2013 en la Colección de Cultivos Tipo Microbianos y Banco de Genes (MTCC), CSIR-Instituto de Tecnología Microbiana, Sector 39-A, Chandigarh - 160036, India.

5 Breve descripción de la invención

La presente invención divulga la capacidad del metabolito extracelular parcialmente purificado aislado del *Bacillus coagulans* MTCC 5856 para prevenir el envejecimiento de la piel. Más específicamente, la invención divulga la actividad anticolagenasa, antielastasa, antiglicación y potenciadora de la expresión del TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico y el ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos humanos, de metabolitos extracelulares aislados de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

Breve descripción de los dibujos

15 La FIG. 1 es una representación gráfica del % de inhibición de la actividad de la colagenasa por el metabolito extracelular parcialmente purificado aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.
La FIG. 2 es una representación gráfica del % de inhibición de la actividad de la elastasa por el metabolito extracelular parcialmente purificado aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.
20 La FIG. 3 es una representación gráfica del aumento de la expresión del TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico y el ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos humanos por el metabolito extracelular parcialmente purificado aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

Descripción de las realizaciones más preferidas

25 En la realización más preferida, la presente invención da a conocer un método no terapéutico para prevenir el envejecimiento cutáneo en mamíferos, en donde dicho método comprende el paso de administrar una concentración eficaz de una composición que contiene metabolito extracelular parcialmente purificado aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 a dichos mamíferos para provocar una reducción de los signos y síntomas del envejecimiento cutáneo. En una realización relacionada, los signos y síntomas del envejecimiento de la piel se seleccionan del grupo que consiste en arrugas, flacidez de la piel, sequedad, piel moteada y líneas. En otra realización relacionada, el envejecimiento cutáneo se previene inhibiendo la actividad de las enzimas colagenasa y elastasa, inhibiendo la glicación y potenciando la expresión de TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico y el ácido hialurónico. En otra realización relacionada, la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total. En otra realización relacionada, la composición se formula con excipientes, adyuvantes, bases, diluyentes, portadores, agentes acondicionadores, potenciadores de la biodisponibilidad, antioxidantes y conservantes farmacéuticamente/cosmécicamente aceptables y/o se incorpora a formulaciones que contienen ingredientes antienvjecimiento y se administran por vía tópica en forma de cremas, geles, lociones, polvos, sueros, aceites, suspensiones, pomadas, jabones, exfoliantes, emulsiones y compactos. En una realización relacionada, el mamífero es preferiblemente un humano.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método no terapéutico de inhibición de la actividad de la colagenasa en los fibroblastos de la piel, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz de una composición que contiene una preparación de metabolito extracelular parcialmente purificada de *Bacillus coagulans* MTCC 5856, para provocar en ella el efecto de inhibición de la colagenasa.
45 En otra realización relacionada, la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un método no terapéutico de inhibición de la actividad de la elastasa en los fibroblastos de la piel, en donde dicho método comprende el paso de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz de preparado de metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856, para provocar en él el efecto de inhibición de la elastasa. En otra realización relacionada, la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.

50 En otra realización preferida, la invención se refiere a un método no terapéutico de inhibición de la glicación en los fibroblastos de la piel, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz de preparado de metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856, para provocar en él el efecto de antiglicación. En otra realización relacionada, la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.

60 En otra realización preferida, la invención se refiere a un método no terapéutico de potenciar la expresión de TGF- β , factor de crecimiento epidérmico y ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos humanos, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz de preparado de metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856, para provocar el aumento de la expresión de genes relacionados con el efecto antienvjecimiento.

65 A continuación, se incluyen ejemplos ilustrativos específicos que enuncian las realizaciones más preferidas

Ejemplo 1: Actividad anticolagenasa

Aislamiento del metabolito extracelular

El metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 se aisló siguiendo los pasos descritos en US9596861. El producto está disponible comercialmente bajo el nombre comercial LACTOSPORIN® (INCI: Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus*) de Sabinsa Corporation, EE. UU.

Materiales y métodos

La colagenasa es una de las metaloproteasas de matriz, que digieren el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (MEC). La MEC actúa como un andamiaje para estabilizar la estructura de la piel, y también ayuda en la proliferación y las funciones metabólicas de las células cutáneas. La pérdida de colágeno provoca arrugas y flacidez en la piel. El principio del ensayo de inhibición de la colagenasa se basa en que el sustrato de gelatina DQ™ está conjugado con fluoresceína un compuesto fluorescente. En la gelatina DQ™, la fluorescencia se inactiva. La gelatina DQ™ es digerida eficazmente por las colagenasas para producir un compuesto fluorescente que puede medirse. El aumento de la fluorescencia es proporcional a la actividad enzimática. En presencia de un compuesto anticolagenasa, la cantidad de fluorescencia disminuirá para una concentración fija de enzima y sustrato.

Materiales

Equipo-BMG FLUOstar Optima (lector de microplacas fluorescente)

Reactivos: Disolución amortiguadora de fosfato (pH 7,4)

Kit de ensayo enzimático de colagenasa (colagenasa Enzchek®, kit de ensayo de gelatinasa, Invitrogen, EE. UU.)

Placas de microtitulación - Placas de microtitulación de 96 pozos (negras) - Corning, EE. UU

El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación negra de 96 pozos. Para el ensayo, se utilizó el tipo IV de *Clostridium histolyticum* con gelatina DQ como sustrato. Se incubaron previamente diferentes concentraciones de LACTOSPORIN® (80 µl) con 20 µl de sustrato de gelatina (12,5 µg/ml). Se añadieron 100 µl de la disolución de enzima colagenasa (concentración final-0,4 U/ml) y se midió la intensidad de fluorescencia a Em: 485 nm y Ex: 520 nm después de 30 minutos. Se registró la actividad enzimática del control (disolución amortiguadora)

El porcentaje de inhibición se calcula de la siguiente manera: -

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(B-BC) - (T-C)}{(B-BC)} \times 100$$

B - Fluorescencia en presencia de enzima.

BC - Fluorescencia en ausencia de actividad enzimática

T - Fluorescencia de la actividad enzimática en presencia de inhibidor

TC - Fluorescencia del inhibidor solo

Resultados

El metabolito extracelular mostró una actividad anticolagenasa dependiente de la dosis con una IC₅₀ del 1,8 % (inhibición del 50 % de la actividad enzimática) (FIG. 1). Los resultados revelaron que el metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 puede preservar la matriz extracelular de la piel y evitar la formación de arrugas y la flacidez cutánea, previniendo así el envejecimiento de la piel.

Ejemplo 2: Actividad antielastasa

Aislamiento del metabolito extracelular

El metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 se aisló siguiendo los pasos descritos en US9596861. El

producto está disponible comercialmente bajo el nombre comercial LACTOSPORIN® (INCI: Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus*) de Sabinsa Corporation, EE. UU.

5 Materiales y métodos

La elastasa es una de las metaloproteinasas de la matriz, que digiere la elastina y otros componentes de la matriz extracelular y también es importante para el desarrollo normal de la piel. Si esta enzima no está regulada por proteínas inhibidoras se produce formación de arrugas en la piel, envejecimiento prematuro y carcinogénesis. El ensayo antielastasa mediante el kit de ensayo de elastasa de Enz Chek determina la actividad inhibidora de la elastasa de los productos. Los ensayos se realizaron utilizando el kit de ensayo de elastasa EnzChek. El sustrato es el ligamento del cuello bovino soluble en elastina DQ. La elastina DQ se etiqueta con el tinte BODIPY FL. El sustrato no fluorescente puede ser digerido por la elastasa para producir fragmentos altamente fluorescentes y, en presencia de inhibidor, la intensidad de la fluorescencia se inactiva. La intensidad de fluorescencia se midió en un lector de microplacas (emisión a 485 nm y excitación a 520 nm)

15 Materiales

Equipo - BMG FLUOstar Optima (lector de microplacas fluorescente)

Reactivos: Disolución amortiguadora de fosfato (pH 7,4)

Kit de ensayo enzimático de colagenasa (colagenasa EnzChek®, kit de ensayo de gelatinasa, Invitrogen, EE. UU.)

Placas de microtitulación - Placas de microtitulación de 96 pozos (negras) - Corning, EE. UU

El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación negra de 96 pozos. Para el ensayo, se utilizó la enzima elastasa del páncreas porcino y la elastina DQ como sustrato. Se incubaron previamente diferentes concentraciones de LACTOSPORIN® (50 µl) con 50 µl de sustrato de elastina (25 µg/ml). 100 µl de la disolución de enzima elastasa (concentración final-0. 1 U/ml) y se midió la intensidad de fluorescencia a Em: 485 nm y Ex: 520 nm después de 30 minutos. Se registró la actividad enzimática del control (disolución amortiguadora)

El porcentaje de inhibición se calcula de la siguiente manera: -

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(B-BC) - (T-C)}{(B-BC)} \times 100$$

B - Fluorescencia en presencia de enzima

BC - Fluorescencia en ausencia de actividad enzimática

T - Fluorescencia de la actividad enzimática en presencia de inhibidor

TC - Fluorescencia del inhibidor solo

Conclusión

El metabolito extracelular mostró una actividad antielastasa dependiente de la dosis con una IC₅₀ del 1,8 % (inhibición del 50 % de la actividad enzimática) (FIG. 2). Los resultados revelaron que el metabolito extracelular aislado de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 puede preservar la matriz extracelular de la piel y evitar la formación de arrugas y la flacidez cutánea, al inhibir la enzima elastasa, previniendo así el envejecimiento de la piel.

50 Ejemplo 3: Antiglicación

Aislamiento del metabolito extracelular

El metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 se aisló siguiendo los pasos descritos en US9596861. El producto está disponible comercialmente bajo la marca LACTOSPORIN® (INCI: Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus*) de Sabinsa Corporation, EE. UU.

Materiales y métodos

Los productos finales de glicación avanzada (AGE) se generan mediante la formación no enzimática de aductos entre los grupos amino de las proteínas (predominantemente lisina y arginina) y los grupos carbonilo del azúcar reductor, también conocida como reacción de Maillard. En las primeras etapas, los azúcares reductores reaccionan con grupos amino libres para formar un compuesto de aldimina inestable que sufre un reordenamiento molecular para formar un producto de

glicación temprana estable conocido como producto de Amadori. En las etapas posteriores, el proceso de glicación a través de reacciones de oxidación, deshidratación y ciclado forma los productos finales de glicación avanzada, también conocidos como AGE. Se sabe que diversas estructuras de los AGE, tales como Nε-(carboximetil)-lisina (CML), pirralina, pentosidina, están asociadas a trastornos degenerativos, tales como el envejecimiento, la diabetes, la aterosclerosis la enfermedad de Alzheimer y la insuficiencia renal. Los AGE, también implicados en el envejecimiento cutáneo, se acumulan como resultado de la irradiación UV tanto en la piel senescente como en la fotoenvejecida.

Los AGE pueden ser tanto de naturaleza fluorescente como no fluorescente. Normalmente, los AGE del tipo de la vesperlisina con la estructura típica que se muestra a continuación tienen una excitación a 370 nm y una emisión a 440 nm, mientras que los AGE del tipo de la pentosidina tienen una excitación a 335 nm y una emisión a 385 nm. El principio se basa en que el azúcar ribosa y la albúmina sérica bovina se mezclan en una relación específica y se incuban durante 24 horas. Los AGE tipo vesperlisina formados por la reacción se estimaron por el aumento de fluorescencia detectado en Ex/Em a 390/460 nm, y las pentosidinas se detectaron en Ex/Em a 320/405 nm

15 Materiales

Ribosa, albúmina sérica bovina, placas de microtitulación negras de 96 pozos

Ribosa - Método BSA: Se añadieron 10 µl de diversas concentraciones de muestras a 40 µl de BSA (albúmina sérica bovina, cepa de 25 mg/ml) y 50 µl de D-Ribosa (cepa de 150 mg/ml) por pozo de microplaca negra de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La muestra con sólo BSA se tomó como el control. Los AGE (productos finales de glicación avanzada) formados se detectaron mediante la fluorescencia a Ex/Em a 390/460 nm para AGE vesperlisina y a Ex/Em a 320/405 nm para AGE pentosidina.

25 Resultados

La inhibición de los AGE vesperlisina y pentosidina por el preparado de metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 se tabula en la Tabla 1.

Tabla 1: Porcentaje de inhibición de los AGE mediante la preparación de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans*

Con. de la preparación de metabolitos extracelulares (%)	% de inhibición de la vesperlisina Ex/Em a 390/460 nm	% de inhibición de la pentosidina Ex/Em a 320/405 nm
2 %	86,87±3,09	41,75±1,48
1 %	60,78±3,35	34,26±1,89
0,50 %	39,58±2,60	28,14±1,85
	IC50 = 0,7%	IC50 = 2,89%

Resultados

La preparación del metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 mostró una inhibición significativa de la formación de productos finales de glicación avanzada tipo vesperlisina, con una inhibición del 50 % a 0,7 %. Además, se descubrió que el metabolito inhibía la formación de AGE tipo pentosidina en un 41,75 % a una concentración del 2 %, lo que indica que la preparación del metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 tiene la capacidad de prevenir diferentes tipos de productos finales de la glicación y, por lo tanto, puede proteger contra los efectos destructivos de la glicación y ayudar a impulsar la cicatrización de la piel y, de este modo, prevenir el envejecimiento cutáneo.

Ejemplo 4: Expresión génica

Aislamiento del metabolito extracelular

El metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 se aisló siguiendo los pasos descritos en US9596861. El producto está disponible comercialmente bajo el nombre comercial LACTOSPORIN® (INCI: Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus*) de Sabinsa Corporation, EE. UU.

50 Materiales y métodos

Los fibroblastos dérmicos son componentes celulares cruciales para la integridad estructural de la piel. La matriz extracelular contiene colágeno, elastina e hialurón que determinan la integridad de la piel. Hialuronano (HA) sintetizado por hialuronano sintetas que añaden residuos de UDP-glucosamina y ácido UDP-glucurónico a una cadena polimérica de HA en crecimiento. El factor de crecimiento transformante (TGF)-β desempeña un papel central en la biosíntesis de la MEC y controla la homeostasis del colágeno mediante la regulación tanto de la síntesis como de la degradación del

colágeno. El factor de crecimiento epidérmico estimula el crecimiento celular e induce la síntesis de colágeno.

Materiales: Células de fibroblastos dérmicos humanos, placas de microtitulación de 6 pozos, medio de crecimiento de fibroblastos, Trizol, kit de síntesis de lata, mezcla maestra SYBR Green para RT-PCR

Métodos:

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos en placas de microtitulación de 6 pozos en presencia de 0,25 % de metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 durante 24 horas. Las células no tratadas se utilizaron como control. Al final del tiempo de incubación, se lisaron las células y se extrajo el ARN

Extracción de ARN

Las células se recolectaron tras la segunda progresión el día 7 y se extrajo el ARN total mediante el método de Trizol. El ARN extraído se trató con DNAsa I para eliminar cualquier ADN contaminante y se extrajo de nuevo mediante extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:25: 1). La calidad del ARN se determinó comprobando la absorbancia a 260/280 nm utilizando un instrumento NanoDrop (Thermo)

PCR cuantitativa en tiempo real

Se tomaron 2 µg de ARN total para la síntesis de ADNc utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Life Technologies). Se llevó a cabo un análisis RT-PCR cuantitativo para determinar la expresión de los genes específicos de la grasa parda en el cicladador Roche Light 96 utilizando la mezcla maestra SYBR Green (Thermo Scientific). se utilizó β actina como gen de mantenimiento. La abundancia relativa de ARN de los genes se normalizó con respecto al gen β actina de mantenimiento y se expresó como delta delta CT (equivalente al cambio múltiplo transformado por Log₂). La Tabla 2 indica la lista de cebadores utilizados para los estudios de expresión.

Tabla 2: Secuencias de cebadores

Nombre	Secuencia de cebadores
Genes específicos de BAT	
h tiene F	TGTGACTCGGACACAAGGTTG
h tiene R	GCCTAAGAACTGCTGCAA
H TGF-β -F	CCCAGCATCTGCAAAGCTC
H TGF-β - R	GTCAATGTACAGCTGCCGCA
hEGF F	CTCAAGGAATCGGCTGGGGA
hEGF R	CAGTCAAAGATCCTGGAGCA

Resultados

El preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 potenció significativamente la sintasa de ácido hialurónico (2,14 veces), el factor de crecimiento transformante (TGF)-β (1,8 veces) y el factor de crecimiento epidérmico (2,94 veces) en los fibroblastos dérmicos humanos, lo que indica que el preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 tiene la capacidad de aumentar la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular. La matriz extracelular (MEC) que proporciona estructura y soporte a las células cutáneas y confiere resistencia a la tracción y firmeza a la piel haciendo que ésta parezca más joven.

Ejemplo 5: Formulaciones que contienen un preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* para la prevención del envejecimiento cutáneo.

La composición que contiene el metabolito extracelular de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 puede formularse con excipientes, adyuvantes, bases, diluyentes, portadores, agentes acondicionadores, potenciadores de la biodisponibilidad, antioxidantes y conservantes farmacéuticamente/cosmécéuticamente aceptables y/o se incorpora a formulaciones que contienen ingredientes antienvjecimiento y se administran por vía tópica en forma de cremas, geles, lociones, polvos, sueros, aceites, suspensiones, pomadas, jabones, exfoliantes, emulsiones y compactos.

En un aspecto relacionado, uno o más ingredientes antienvjecimiento para el cuidado de la piel se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, ácido alfa lipoico, oxiresveratrol, extracto de raíz de remolacha, extracto de *Boswellia serrata*, ácidos β boswélicos, aceite de *Boswellia serrata*, extracto de *Centella asiatica*, triterpenos, extracto de *Garcinia indica*, antocianinas, extracto y zumo de *Cocos nucifera*, extracto de *Coleus forskohlii*, forskolina, aceite de *Coleus forskohlii*, tetrahidropiperina, ácido elágico, extracto de agallas de roble, polifenoles, extracto de galanga, ácido glicirricínico, extracto de té verde, galato de epigallocatequina, extracto de regaliz, glicirricinato monoamónico, limonoides,

- ácido oleanólico, péptidos cosméticos (ácido oleanólico ligado a Lys-Thr-Thr-Lys-Ser, ácido oleanólico unido a Lys-Val-Lys), oleuropeína, extracto de *Piper longum*, piperina, ácido elágico, extracto de granada (soluble en agua), pterostilbeno, resveratrol, extracto de *Pterocarpus santalinus*, extracto de romero, ácido rosmarínico, extracto de Amla, betaglucogallina, tetrahidrocurcumina, extracto de hoja de *Salvia officinalis* (Salvia), ácidos ursólicos, saponinas, extracto de semilla de *Sesamum indicum* (Sésamo), sesamina y sesamolina, aceite de moringa, extracto de semilla de moringa, extracto de Castaño de Indias, aceite de vitex, ácido ximenínico, ácido etil-ascórbico, aceite de argán, extracto de cáscara de limón, aceite de cúrcuma, beta-glucanos de cebada, coenzima Q10, aceite de oliva, aceite de aguacate y aceite de arándano.
- En otro aspecto relacionado, uno o más antioxidantes y agentes antiinflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, vitamina A, D, E, K, C, complejo B, ácido rosmarínico, ácido alfa lipoico, oxiresveratrol, ácido elágico, ácido glicirrónico, galato de epigallocatequina, polifenoles vegetales, glabridina, aceite de moringa, ácido oleanólico, oleuropeína, ácido carnósico, ácido urocánico, fitoeno, ácido lipoico, lipoamida, ferritina, desferal, bilirrubina, biliverdina, melaninas, ubiquinona, ubiquinol, palmitato de ascorbilo, fosfato de ascorbilo Mg, acetato de ascorbilo, tocoferoles y derivados, tal como el acetato de vitamina E, ácido úrico, α -glucosilrutina, calalasa y superóxido dismutasa, glutatión, compuestos de selenio, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), metabisulfito sódico (SMB), galato de propilo (PG) y aminoácido cisteína.
- En otro aspecto relacionado, uno o más potenciadores de la biodisponibilidad se seleccionan del grupo, pero sin limitarse a ellos, de piperina, tetrahidropiperina, quercetina, extracto de ajo, extracto de jengibre y naringina.

Las Tablas 3-7 proporcionan ejemplos ilustrativos de formulaciones antienvjecimiento para el cuidado de la piel que contienen una preparación de metabolitos extracelulares parcialmente purificados de *Bacillus coagulans* MTCC 5856 (extracto de filtrado de fermentos de *Bacillus*)

Tabla 3: Suero antienvjecimiento

Principios activos
Extracto filtrado de fermentos de <i>Bacillus</i> 0,01 % - 2 %
Péptido cosmético (Olepent®), Tetrahidrocurcumina, Zumo de fruta de <i>Cocos nucifera</i> (coco), Aceite de cúrcuma, Aceite de argán, Lipactive Incalnchi®#
Otros Ingredientes/Excipientes
Agentes quelantes, Humectantes, Agentes acondicionadores, Emulsionantes, Antioxidantes, Conservantes, Espesantes (Como Derivados de la celulosa, Polímero cruzado de acrilatos, Acrilatos: Polímero cruzado de acrilato de alquilo de C10-30, Carbómeros), Agentes neutralizantes, Fragancia, Potenciadores de la biodisponibilidad
* - Marca registrada de Sabinsa Corporation # - Marca registrada de Greentech

Tabla 4: Limpiador antiedad

Principios activos
Extracto filtrado de fermentos de <i>Bacillus</i> 0,01 % - 2 %
Péptido cosmético (Olepent®), Tetrahidrocurcumina, Zumo de fruta de <i>Cocos nucifera</i> (coco), Aceite de cúrcuma, Aceite de argán, Lipactive Incalnchi®#
Otros Ingredientes/Excipientes
Niacinamida, Extracto de cáscara de limón, Acetato de vitamina E, Potenciadores de la biodisponibilidad (Extracto de piperina o tetrahidropiperina (Cosmoperine®)), Agentes quelantes, Humectantes, Tensoactivos no iónicos (Como Laurilglucósido, Decilglucósido, Glucósido de coco, Anfóteros), Emulgentes, Antioxidantes, Conservantes, Espesantes (Como Derivados de la celulosa, Polímero cruzado de acrilatos, Ppolímero cruzado de acrilatos/alquilacrilatos DE C10-30, carbómeros), agentes neutralizantes, Fragancia.
* - Marca registrada de Sabinsa Corporation # - Marca registrada de Greentech

Tabla 5: Tónico equilibrante antiedad

Principios activos
Extracto filtrado de fermentos de <i>Bacillus</i> 0,01 % - 2 %
Péptido cosmético (Olepent®), Tetrahidrocurcumina, Zumo de fruta de <i>Cocos nucifera</i> (coco), Aceite de cúrcuma, Aceite de argán, Lipactive Incalnchi®#
Otros Ingredientes/Excipientes
Tetrahidropiperina (Cosmoperine®), Agentes quelantes, Humectantes, Emulsionantes, Antioxidantes, Conservantes,

Espesantes (Como derivados de la celulosa, Polímero cruzado de acrilatos, Polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30, Carbómeros), Agentes neutralizantes (en caso necesario), Fragancia.

* - Marca registrada de Sabinsa Corporation

- Marca registrada de Greentech

Tabla 6: Hidratante antiedad

Principios activos

Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus* 0,01 % - 2 %

Péptido cosmético (Olepent®), Tetrahidrocurcumina, Zumo de fruta de *Cocos nucifera* (coco), Aceite de cúrcuma, Aceite de argán, Lipactive IncalInchi®#

Otros Ingredientes/Excipientes

Betaglucanos de cebada, Niacinamida, Policosanol, Extracto de amaranto, Manteca de aguacate y Aceite de macadamia, Tetrahidropiperina (Cosmoperine®), Agentes quelantes, Humectantes, Emulsionantes, Antioxidantes, Conservantes, Espesantes (Como derivados de la celulosa, Polímero cruzado de acrilatos, Polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30, Carbómeros), Agentes neutralizantes (en caso necesario), Fragancia y siliconas

* - Marca registrada de Sabinsa Corporation

- Marca registrada de Greentech

Tabla 7: Crema antiedad

Principios activos

Extracto filtrado de fermentos de *Bacillus* 0,01 % - 2 %

Coenzima Q10, Péptido cosmético (Olepent®), Tetrahidrocurcumina, Extracto de *Boswellia serrata*

Otros Ingredientes/Excipientes

Extracto de galanga, D-pantenol, Bisabolol, Tetrahidropiperina (Cosmoperine®), Agentes quelantes, Humectantes, Emulsionantes, Antioxidantes, Conservantes, Espesantes (Como derivados de la celulosa, Polímero cruzado de acrilatos, Polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30, Carbómeros), Agentes neutralizantes (en caso necesario), Fragancia, Siliconas, Aceite de oliva, Aceite de aguacate y Aceite de arándano

Las formulaciones anteriores son meros ejemplos ilustrativos; se considerará equivalente cualquier formulación que contenga el principio activo mencionado destinada a dicho fin.

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir el envejecimiento de la piel en un mamífero, en donde dicho método comprende el paso de administrar una concentración eficaz de una composición que contiene metabolito extracelular parcialmente purificado aislado de *Bacillus coagulans* a dicho mamífero para provocar una reducción de los signos y síntomas del envejecimiento de la piel, en donde *Bacillus coagulans* es de la cepa *Bacillus coagulans* MTCC 5856, en donde se excluye cualquier método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde los signos y síntomas del envejecimiento de la piel se seleccionan del grupo que consiste en arrugas, flacidez de la piel, sequedad, piel moteada y líneas.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la composición previene el envejecimiento cutáneo inhibiendo la actividad de las enzimas colagenasa y elastasa, inhibiendo la glicación y potenciando la expresión del TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico y el ácido hialurónico.
4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.
5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la composición se formula con excipientes, adyuvantes, bases, diluyentes, portadores, agentes acondicionadores, potenciadores de la biodisponibilidad, antioxidantes y conservantes farmacéuticamente/cosmecéuticamente aceptables y/o se incorpora a formulaciones que contienen ingredientes antienvjecimiento y se administran por vía tópica en forma de cremas, geles, lociones, polvos, sueros, aceites, suspensiones, pomadas, jabones, exfoliantes, emulsiones y compactos.
6. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el mamífero es un humano.
7. Un uso de un preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* en un método de inhibición de la actividad de la colagenasa en fibroblastos cutáneos, en donde el preparado de metabolitos extracelulares está parcialmente purificado y contenido en una composición, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz de la composición para provocar en ellas el efecto de inhibición de la colagenasa, en donde el *Bacillus coagulans* es de la cepa *Bacillus coagulans* MTCC 5856, en donde el método no comprende ningún método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
8. El uso de conformidad con la reivindicación 7, en donde la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.
9. Uso de un preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* en un método de inhibición de la actividad de la elastasa en fibroblastos cutáneos, en donde el *Bacillus coagulans* es el *Bacillus coagulans* MTCC 5856, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz del preparado de metabolitos extracelulares para provocar en ellas el efecto de inhibición de la elastasa, en donde el método no comprende ningún método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
10. El uso de conformidad con la reivindicación 9, en donde la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.
11. Un uso de un preparado de metabolitos extracelulares de *Bacillus coagulans* en un método de inhibición de la glicación en fibroblastos cutáneos, en donde *Bacillus coagulans* es *Bacillus coagulans* MTCC 5856, en donde dicho método comprende los pasos de poner en contacto dichas células de fibroblastos con una concentración eficaz del preparado de metabolitos extracelulares para provocar en ellas el efecto de antiglicación, en donde el método no comprende ningún método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
12. El uso de conformidad con la reivindicación 11, en donde la concentración efectiva del preparado de metabolito extracelular parcialmente purificado es de 0,01 % v/v a 2,0 % v/v de la composición total.

FIG. 1

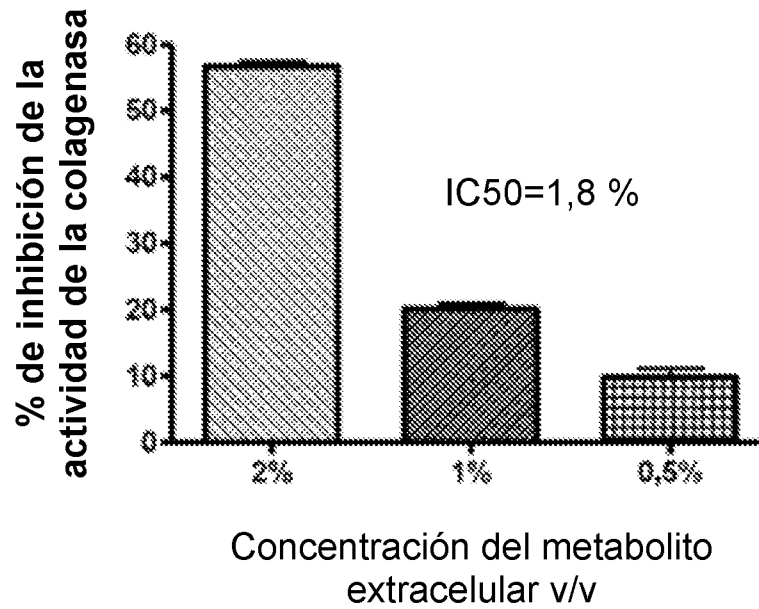


FIG. 2

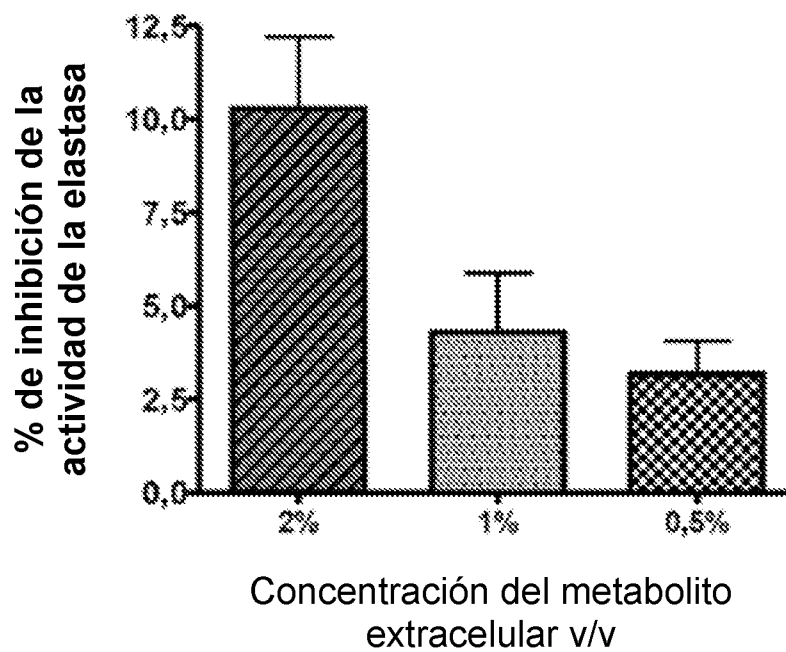


FIG. 3

