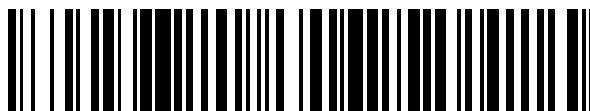


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 174**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61K 8/99** (2007.01)  
**A61K 8/31** (2006.01)  
**A61Q 17/04** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61P 17/18** (2006.01)  
**A61P 39/06** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/FR2014/050852**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167247**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14720194 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 2983797**

54 Título: **Composición cosmética, farmacéutica o alimentaria que comprende un extracto de *Arthrobacter agilis* rico en carotenoides**

30 Prioridad:

**09.04.2013 FR 1353200**

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

**08.10.2021**

73 Titular/es:

**THOREL, JEAN-NOËL (100.0%)**  
**3 Rue Larochelle**  
**75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**THOREL, JEAN-NOËL y**  
**PELLAY, FRANÇOIS-XAVIER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

ES 2 863 174 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

Composición cosmética, farmacéutica o alimentaria que comprende un extracto de *Arthrobacter agilis* rico en carotenoides

5

Campo de la invención

La presente solicitud describe un extracto de *Arthrobacter agilis*, y más exactamente, un extracto rico en carotenoides, para su uso concretamente en cosmética.

10

Más exactamente, se refiere a la demostración de la protección de las proteínas de dicho extracto, contra los radicales libres de oxígeno (ROS) y las radiaciones lumínicas (UV y visible), que permite combatir el deterioro de las células, en particular las de la piel, provocado por agresiones externas. Dicho extracto, en combinación con la vitamina E o con uno de sus derivados utilizados como antioxidantes, permite por tanto combatir el estrés oxidativo y, concretamente, el envejecimiento celular.

15

Estado de la técnica

En los organismos aerobios y, concretamente, en seres humanos, el oxígeno es necesario para la supervivencia, pero también es responsable del daño oxidativo relacionado con sus metabolitos reactivos. De este modo, el término ROS (siglas del inglés *reactive oxygen species*, "especies reactivas del oxígeno") o ROM (siglas del inglés, *reactive oxygen metabolites*, "metabolitos reactivos del oxígeno") se utiliza habitualmente para referirse a todos los radicales libres y especies químicas no radicales que intervienen en los procesos biológicos oxidativos y cuyo exceso se considera como la base de un número creciente de procesos degenerativos y enfermedades. Más exactamente, el término ROS incluye el radical aniónico superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el radical hidroxilo OH, el oxígeno singulete <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como los radicales alcoxi RO y los radicales peróxido ROO, que se forman a partir de moléculas orgánicas en procesos oxidativos. La producción de origen exógeno de estos metabolitos depende esencialmente de acontecimientos físicos, tales como la irradiación ultravioleta (UV) o los acontecimientos químicos, tales como los agentes xenobióticos. En cuanto a la producción endógena, esta está esencialmente relacionada con la fuga de electrones en la cadena respiratoria a nivel de las mitocondrias.

20

25

30

Independientemente de su procedimiento de formación, estos metabolitos son peligrosos para el organismo debido a su alta reactividad y su acción afecta a diversos componentes celulares, entre los que se encuentra una gran cantidad de proteínas estructurales, enzimas, aminoácidos, ADN y ARN, glúcidos, así como lípidos y fosfolípidos.

35

Cabe señalar que en el caso de la irradiación UV, además de la generación de especies reactivas, también puede haber daños físicos directos en los componentes celulares. De este modo, se sabe que los rayos UV inducen dímeros de timina que pueden causar mutaciones, o incluso roturas de ADN.

40

En una situación de producción excesiva de metabolitos reactivos, el organismo se enfrenta a un proceso conocido como "estrés oxidativo" ("*oxidative stress*" en inglés).

Para defenderse del daño causado por estos metabolitos, el cuerpo ha desarrollado sistemas de defensa contra la oxidación para reducir la reactividad de estas sustancias, o incluso para neutralizarlas. Estos sistemas pueden ser de naturaleza proteica, como la seroalbúmina (HSA, siglas del inglés *humam serum albumin*), la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, las peroxidasas o péptidos pequeños, o de naturaleza no proteica, tales como el ubiquinol, las antocianinas, los flavonoides, las vitaminas liposolubles (por ejemplo, vitaminas A y E) y vitaminas hidrosolubles (por ejemplo, vitamina C). Las células también tienen sistemas para reparar y degradar moléculas oxidadas.

45

50

De este modo, para combatir el estrés oxidativo, es recomendable adoptar una dieta rica en sustancias antioxidantes naturales y tomar medicamentos o complementos alimentarios concretamente a base de vitaminas capaces de neutralizar especies reactivas. En el campo de la cosmética, muchos productos llevan incorporados agentes antioxidantes que permiten, concretamente, combatir el envejecimiento prematuro relacionado con el estrés oxidativo.

55

Por consiguiente, la búsqueda de nuevas moléculas o de nuevos extractos que presenten actividad antioxidante, para incorporarse concretamente en complementos alimentarios o en composiciones cosméticas, ha sido un desafío importante durante muchos años.

Descripción de la invención

60

La presente solicitud se refiere a la identificación de un extracto obtenido de una bacteria extremófila, que presenta una actividad antioxidante de interés. Además de un efecto directo sobre los radicales libres, la presente solicitud se refiere a un efecto particular de dicho extracto sobre el daño causado por los rayos UV o incluso por la luz visible, y más generalmente, a un efecto protector, incluso estabilizador sobre las proteínas, así como a una sinergia con antioxidantes conocidos.

65

De este modo, la presente solicitud ilustra una composición cosmética o farmacéutica que comprende un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis*, más exactamente, un extracto que contiene carotenoides obtenidos de esta bacteria, y un agente antioxidante seleccionado del grupo de la vitamina E o de uno de sus derivados.

5 El documento KR 2012/0068367 propone una composición cosmética que comprende el sobrenadante del cultivo, rico en exopolisacáridos, obtenido de la fermentación a baja temperatura de microorganismos psicrófilos, concretamente *Arthrobacter agilis*.

10 El documento JP H07 132096 describe un protocolo de preparación de un carotenoide de tipo bacteriorrubberina obtenido de microorganismos de tipo *Halobacterium*.

15 En el documento de SAITO *et al.* (RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY, vol. 50, n.º 3, 1997, páginas 267-269), se describe un estudio acerca del efecto de la bacteriorrubberina extraída de *Rubrobacter radiotolerans* sobre la timina expuesta a irradiación de cobalto. Este estudio se refiere a un efecto protector de la bacteriorrubberina sobre la timina frente a los radicales OH.

20 Ya se dispone de composiciones cosméticas antienvjecimiento ("M.D. Formulated Age Antidote Day Cream", n.º de registro 10194702 de la base de datos MINTEL y "Shining Star Eye Cream", n.º de registro 1305663 de la base de datos MINTEL) o alimentarias ("Dietary Supplement", n.º de registro 1230777 de la base de datos MINTEL) que comprenden una multitud de ingredientes que incluyen carotenoides de origen diferente o no identificado y vitamina E o sus derivados.

25 Koch *et al.* (*Int J Syst Bacteriol.* 1995, 45 (4): 837-9) describieron la bacteria *Arthrobacter agilis* y pudo identificarse fácilmente, concretamente gracias a la secuencia de su ARN 16S, accesible en las bases de datos con el número X80748 y que corresponde a la siguiente secuencia SEQ ID NO: 1:

GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGCGGCG TGCTTAACAC ATGCAAGTCG  
AACGATGAAC  
CTCACTTGTG GGGGGATTAG TGGCGAACGG GTGAGTAACA CGTGAGTAAC CTGCCCTTGA  
CTCTGGGATA AGCCTGGGAA ACCGGGTCTA AACTGCGATA CGACCTTCTG GCGCATGCCA  
TGTTGGTGGA AAGCTTTTGT GGTTTTGGAT GGA CTGCGCGG CCTATCAGCT TGTTGGTGGG  
GTAATGGCCT ACCAAGGCCA CGACGGGTAG CCGGCCTGAG AGGGTGACCG GCCACACTGG  
GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATATTG CACAATGGGC  
GCAAGCCTGA TGCAGCGACG CCGCGTGAGG GATGAAGGCC TTCGGGTTGT AAACCTCTTT  
CAGTAGGGAA GAAGCCTGTC TTTTGGGTGG GTGACGGTAC CTGCAGAAGA AGCGCCGGCT  
AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGGCGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG  
CGTAAAGAGC TCGTAGGCGG TTTGTGCGGT CTGCCGTGAA AGTCCGGGGC TTAACCTCCG

ATCTGCGGTG GGTACGGGCA GACTAGAGTG CAGTAGGGGA GACTGGAATT CCTGGTGTAG  
 CGGTGAAATG CGCAGATATC AGGAGGAACA CCGATGGCGA AGGCAGGTCT CTGGGCTGTA  
 ACTGACGCTG AGGAGCGAAA GCATGGGGAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAT  
 GCCGTAACG TTGGGCACTA GGTGTGGGGG ACATTCCACG TTTTCCGCGC CGTAGCTAAC  
 GCATTAAGTG CCCCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTA AAACCTCAAAG GAATTGACGG  
 GGGCCCGCAC AAGCGGCGGA GCATGCGGAT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA  
 AGGCTTGACA TGAACCGGAA TGATGCAGAG ATGTGTCAGC CACTTGTGGC CGGTTTACAG  
 GTGGTGCATG GTTGTCTGCA GCTCGTGTG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC  
 GCAACCCTCG TTCCATGTTG CCAGCGGGTT ATGCCGGGGA CTCATGGGAG ACTGCCGGGG  
 TCAACTCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTC AATCATCATG CCCCTTATGT CTTGGGCTTC  
 ACGCATGCTA CAATGGCCGG TACAAAGGGT TGCGATACTG TGAGGTGGAG CTAATCCCAA  
 AAAGCCGGTC TCAGTTCGGA TTGAGGTCTG CAACTCGACC TCATGAAGTT GGAGTCGCTA  
 GTAATCGCAG ATCAGCAACG CTGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCCTGTAC ACACCGCCCG  
 TCAAGTCACG AAAGTTGGTA ACACCCGAAG CCGGTGGCCT AACCCCTTGT GGGAGGGAGC  
 CGTCGAAGGT GGGACCGGCG ATTGGGACTA AGTCGTAACA AG

5 De este modo y según una realización particular, la cepa bacteriana utilizada tiene un ARN 16S codificado por una secuencia que presenta una identidad mayor del 90 % o mayor del 95 % o del 99 % o incluso del 100 %, con la secuencia SEQ ID NO: 1, por ejemplo, de secuencia parcial SEQ ID NO: 2.

Según la invención, dicho extracto contiene carotenoides, ventajosamente es rico en carotenoides.

10 En el contexto de la invención, el término "carotenoides" significa pigmentos liposolubles caracterizados por su color, que puede variar de rojo a amarillo, y por su espectro de absorción. Pertenecen a la familia química de los terpenoides, con una estructura alifática o alicíclica poliinsaturada.

15 Como se ha mencionado, un extracto según la invención contiene carotenoides, que pueden ser tanto membranosos como citoplasmáticos.

20 De manera ventajosa, y como se demuestra, por ejemplo, mediante un análisis HPLC (por las siglas del inglés *high-performance liquid chromatography*, cromatografía de líquidos de alto rendimiento), un extracto objeto de la presente invención es rico en carotenoides. Los carotenoides tienen una zona de absorción máxima entre 400 y 600 nm, más exactamente entre 450 y 550 nm, y son identificables por su espectro de absorción de "3 dedos" a una longitud de onda cercana a 490 nm. de manera incluso más ventajosa, los carotenoides representan una cantidad mayor del 50 % incluso del 60 %, 70 %, 80 % o incluso del 90% del extracto. Preferentemente, el extracto carece de proteínas y/o ADN y/o glúcidos.

25 Según una realización preferida, el extracto según la invención contiene diferentes formas de carotenoides, ventajosamente 6 formas principales, incluyendo diferentes isómeros o formas glicosiladas.

Un extracto según la invención se obtiene, ventajosamente, cultivando *Arthrobacter agilis* en las siguientes condiciones:

30 El medio de cultivo utilizado es normalmente un medio LB sin sal, en decir, que contiene un 1 % en peso de triptona y un 0,5 % en peso de extracto de levadura. Como alternativa, también pueden contemplarse los medios R2A (Koch *et al.*, 1995, *Int J Syst Bacteriol.* 45 (4): 837-9) y Bacto Marine 2216 (Fong *et al.*, 2001, *Appl Microbiol Biotechnol.* 56 (5-6): 750-6).

35 Ventajosamente, las células se cultivan a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C, por ejemplo, a 25 °C.

De manera adecuada, el crecimiento tiene lugar en condiciones aerobias, preferentemente, con ventilación mediante burbujas de aire o de oxígeno.

40 El extracto según la invención se obtiene, ventajosamente, de células en fase estacionaria, o normalmente después de un crecimiento de 3 días en las condiciones descritas anteriormente.

Para obtener el extracto, las células bacterianas se someten a un protocolo de extracción/purificación que permite

aislar y purificar los carotenoides. Debido a la naturaleza liposoluble de los carotenoides, la obtención del extracto objeto de la invención, se basa, ventajosamente, en el aislamiento de una fase apolar.

5 En una primera etapa, se trata de extraer componentes membranosos y citoplasmáticos, ventajosamente con la excepción de lípidos, proteínas y ADN. De manera adecuada, se utiliza un disolvente polar que permite "romper" las membranas y disolver una gran cantidad de moléculas hidrófilas y algunas lipófilas.

10 De este modo y como ejemplo, el sedimento bacteriano se puede extraer con acetona, metanol o con una mezcla de acetona/metanol (por ejemplo, 1/5 en volumen).

15 En una segunda etapa, la adición de un disolvente apolar, ventajosamente hexano, y de una solución salina saturada acuosa, ventajosamente, una solución saturada de NaCl, permite obtener una mezcla bifásica, es decir, una fase acuosa por un lado y la fase apolar por el otro, correspondiente al extracto de interés en el contexto de la invención. De manera ventajosa, la fase acuosa se puede lavar, opcionalmente, varias veces, utilizando un disolvente apolar.

Después, las fases apolares se juntan y se evaporan al vacío. El extracto obtenido de este modo puede conservarse en frío, en particular, puede congelarse.

20 De este proceso se desprende claramente que se trata de un extracto bacteriano y no de un sobrenadante de cultivo.

Según una primera realización, el extracto según la invención se utiliza en forma seca, como un polvo. Como alternativa, el sedimento se puede recoger en cualquier fase lipófila adecuada. En el contexto de la aplicación cosmética según la invención, el extracto se recoge ventajosamente en un aceite, en propanodiol o en una microemulsión.

25 La concentración de carotenoides de la composición reconstituida a partir del extracto seco se puede medir fácilmente, por ejemplo, midiendo la absorbancia a 512 nm en DMSO o a 502 nm en propanodiol.

30 Cabe señalar que, ventajosamente, las diferentes etapas de extracción y purificación se realizan protegidas de la luz, en la oscuridad o en la penumbra, para impedir la posible degradación del extracto.

35 Debido a las notables propiedades demostradas en el contexto de la presente solicitud y explicadas a continuación, dicho extracto puede utilizarse, concretamente, en una composición cosmética, una composición farmacéutica o un complemento alimentario.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere, por tanto, a una composición cosmética que comprende un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides y un agente antioxidante que es la vitamina E. Según una realización preferida, la composición cosmética comprende un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* rico en carotenoides.

40 La composición cosmética según la invención tiene, ventajosamente, un uso tópico, y está destinada para aplicarse en la piel y opcionalmente en el cabello. Puede contener cualquier ingrediente o excipiente de uso habitual en cosmética. En otras palabras, comprende al menos un excipiente cosméticamente aceptable, todos los excipientes utilizados en dicha composición deben ser cosméticamente aceptables.

45 Cabe señalar que, concretamente, el metanol no se considera un excipiente cosméticamente aceptable. Por tanto, según una realización particular, la composición cosmética según la invención no contiene metanol.

50 También puede presentarse en forma de loción, crema, gel, aerosol, ...

Según una realización particular, tiene un color rosa.

55 Según otro aspecto, la presente invención se refiere, por tanto, a una composición farmacéutica que comprende un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides y un agente antioxidante que es la vitamina E. Según una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* rico en carotenoides.

60 La composición farmacéutica según la invención puede estar destinada concretamente a la administración tópica u oral. Puede contener cualquier ingrediente o excipiente de uso común en farmacia. En otras palabras, comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, todos los excipientes utilizados en dicha composición deben ser farmacéuticamente aceptables.

65 Cabe señalar que, concretamente, el metanol no se considera un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por tanto, según una realización particular, la composición farmacéutica según la invención no contiene metanol.

También puede presentarse en forma de loción, crema, gel, aerosol, soluciones, por ejemplo, en forma de gotas,

cápsulas, comprimidos, ...

5 Dicha composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, en el campo oftálmico, concretamente para tratar algunas retinopatías (DMRE, ...), en el tratamiento de enfermedad hepática crónica o hiperoxia después de isquemia por reperfusión. De manera más general se contemplan patologías en las que un estrés oxidativo puede dañar de forma irreversible las proteínas.

En el mismo contexto, una composición según la presente solicitud, puede ser un complemento alimentario.

10 Las composiciones según la invención, también pueden contener otros principios activos, además del extracto objeto de la presente invención.

15 En particular, esto puede incluir otros agentes antioxidantes, reagrupando diferentes clases de moléculas, en particular, carotenoides, tioles o fenoles.

15 Un agente antioxidante, para el que se ha demostrado un efecto sinérgico con el extracto según la invención, es la vitamina E.

20 Extractos de plantas, tales como un extracto de té verde, un extracto de sarmiento de vid, un extracto de hojas de argán, un extracto de pomelo, un extracto de hojas de morera y/o un extracto de manzana, también pueden combinarse con un extracto según la invención.

25 Los expertos en la materia determinan, en cada caso, las concentraciones de extracto y de principio activo, respectivamente, de modo que la sinergia entre los dos se exprese totalmente. De este modo y de manera adecuada, las concentraciones del extracto y del principio activo adicional, deben optimizarse para obtener el efecto antioxidante deseado.

30 De manera ventajosa, el extracto seco representa del 0,00001 ( $10^{-5}$ ) al 0,1 ( $10^{-1}$ ) %, ventajosamente del 0,0001 ( $10^{-4}$ ) al 0,01 ( $10^{-2}$ ) % en peso de la composición según la invención.

30 Debido a las notables propiedades demostradas en el contexto de la presente solicitud, dicha composición puede utilizarse en particular contra el envejecimiento (efecto anti-envejecimiento) o para la protección solar (efecto anti-UV).

35 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético, ventajosamente, para combatir el estrés oxidativo, concretamente, el envejecimiento celular de la piel, que consiste en aplicar sobre la piel la composición cosmética según la invención. El estrés oxidativo también puede producirse por una exposición a la radiación (UV y/o visible), contra la cual la composición según la invención es particularmente eficaz.

40 Un primer uso posible de una composición según la invención, es el de un agente anti radicales, concretamente frente a los siguientes radicales libres: el radical superóxido  $O_2^-$ ; el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ ; el ion hipoclorito  $ClO^-$ ; el radical hidroxilo  $OH^\cdot$ ; los radicales peróxido (ROO) o alcoxilo (RO) donde R es una cadena carbonada; radicales derivados de ácidos grasos insaturados; el peroxinitrito ONOO $^-$ ; el monóxido de nitrógeno NO; el dioxígeno singlete  $^1O_2$ .

45 Una composición según la invención también puede utilizarse como agente anti UV, así como contra los rayos UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) y/o UV-C (280-153 nm), concretamente contra los UV-C. De manera destacable, se ha demostrado que una composición según la invención ejerce un efecto anti UV a través de varios mecanismos de acción:

- 50
- un efecto de neutralización de singletes del oxígeno ( $^1O_2$ ) generados por los rayos UV;
  - un efecto de "pantalla", "filtro" o "escudo", por absorción directa de los UV;
  - un efecto antioxidante más tradicional, es decir, la neutralización de los radicales libres generados por los singletes del oxígeno ( $^1O_2$ ).

55 Como ya se ha mencionado, una composición según la invención también es de interés en la protección contra la luz visible, en particular frente a la luz azul violeta (longitud de onda comprendida normalmente entre 400 y 500 nm).

60 Por otro lado, una composición según la invención ejerce un efecto protector sobre las proteínas. De este modo, dicha composición puede estabilizar a las proteínas y protegerlas.

60 Como se demuestra en la presente solicitud, esta protección del proteoma se ejerce concretamente frente a la carbonilación. Más manera más general, la presente solicitud demuestra el potencial protector de un extracto rico en carotenoides sobre el proteoma.

65 De este modo y según otro aspecto, la presente solicitud describe el uso de carotenoides para la protección del proteoma.

## Ejemplos de realización

5 La manera en la que se puede realizar la invención y las ventajas resultantes de la misma, surgirán mejor a partir de los siguientes ejemplos de realización, que se ofrecen de manera indicativa y limitativa, con la ayuda de las figuras adjuntas.

La Figura 1 corresponde a una imagen de microscopía inversa (aumento x100) de la cepa SB 5.

10 La figura 2 representa el espectro de HPLC del extracto SBE según la invención, así como el espectro de absorbancia de cada uno de los 6 picos (1 a 6) principales.

La figura 3 representa el poder antioxidante del extracto según la invención (SBE), medido mediante el ensayo ABTS, en comparación con otros agentes antioxidantes conocidos, expresado en equivalente de Trolox.

15 La figura 4 representa el poder protector de las proteínas, frente a los radicales libres, del extracto según la invención (SBE) en comparación con otros agentes antioxidantes, expresado en equivalente de Trolox (A), y compara este poder protector con el de las fracciones correspondientes a los 6 picos observados en la HPLC (B).

La figura 5 representa el poder protector de las proteínas, frente a los rayos UV, del extracto según la invención (SBE) en comparación con otros agentes antioxidantes, expresado en equivalente de Trolox.

20 La figura 6 representa el seguimiento de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP, siglas del inglés *Alkaline Phosphatase*), en función de la concentración del extracto según la invención (SBE).

La figura 7 representa el poder protector de las proteínas, frente a los radicales libres, del extracto según la invención (SBE) mezclado con otros agentes antioxidantes, expresado en equivalente de Trolox (B).

La figura 8 representa el poder protector de las células humanas (queratinocitos) y de su ADN, frente a los radicales libres y los rayos UV, del extracto según la invención (SBE) con respecto al acetato de tocoferol a través del ensayo del cometa.

25 La figura 9 representa la medida de la carbonilación de las proteínas evaluando el poder protector de las células humanas (queratinocitos) y de sus proteínas, frente a una radiación UV/visible, del extracto según la invención (SBE) con respecto al acetato de tocoferol.

30 1/ Aislamiento y caracterización de la cepa SB5:

Se aisló una bacteria (SB5) de nieve caída caía y se seleccionó por su resistencia a los rayos UVC y por su capacidad para crecer rápidamente. Dicha bacteria se caracterizó como perteneciente a *Arthrobacters*, un género de bacterias gram positivas, muchas de las cuales son extremófilas o extremotolerantes.

35 Más exactamente, la bacteria aislada pertenece a una cepa de *Arthrobacter agilis*. *A. agilis* es una bacteria cocoide gram positiva, no esporulante y no patógena, con un diámetro de 0,8 a 1,2  $\mu\text{m}$  y que puede tener de 0 a 3 flagelos (Koch *et al.* (1995) *Int J Syst Bacteriol.* 45(4):837-9, se aisló por primera vez en 1889 (Ali-Cohen (1889) *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 6:33-36).

40 La Figura 1 muestra una imagen de microscopía inversa de la cepa aislada, conforme con la descripción de la bacteria *Arthrobacter agilis*.

45 Por otro lado, la pertenencia de la cepa SB5 a la especie *Arthrobacter agilis* se confirmó mediante secuenciación parcial de su ARN 16S. La secuencia correspondiente (SEQ ID NO: 2) es la siguiente, indicando la base N que no se pudo determinar si el nucleótido correspondía a A, C, G o T:

## ES 2 863 174 T3

ACATGCAAGT CGAACGATGA ACCTCACTTG TGGGGGGATT AGTGCCGAAC GGGTGAGTAA  
CACGTGAGTA ACCTGCCCTT GACTCTGGGA TAAGCCTGGG AAACCGGGTC TAATACTGGA  
TACGACCTTC TGCGCATGC CATGTTGGTG GAAAGCTTTT GTGTTTTGG ATGGACTCGC  
GGCCTATCAG CTTGTTGGTG GGGTAATGGC CTACCAAGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG  
AGAGGGTGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG  
TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCGA CGCCGCGTGA GGGATGAAGG  
CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCAGTAGGG AAGAAGCCGG CCTTTTGGGT TGGTGACGGT  
ACCTGCAGAA GAAGCGCCGG CTAACACGT GCCAGCAGCC GCGTAATAC GTAGGGCGCA  
AGCGTTATCC GGAATTATTG GCGTAAAGA GCTCGTAGGC GGTTTGTGCG GTCTGCCGTG  
AAAGTCCGGG GCTTAACTCC GGATCTGCGG NGGGTACGGG CAGACTAGAG TGCAGTAGGG  
GAGACTGGAA TTCTGGTGT AGCGGTGAAA TGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGATGCC  
GAAGGCAGGT NTCTGGGCTG TAACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCATGGGG AGCGAACAGG  
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ATGCCGTAAA CGTTGGGCAC TAGGTGTGGG GGACATTCCA  
CGTTTTCCGC GCCGTAGCTA ACGCATTAAAG TGCCCCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGC  
TAAAACCTAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGCG GAGCATGCGG ATTAATTCGA  
TGCAACCGCA AGAACCTTAC CAAGGCTTGA CATGAACCGG AATGATGCAG AGATGTGCA  
GCCACTTGTG GCCGGTTTAC AGGTGGTGCA TGTTTGTGCT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT  
TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT CGTCCATGT TGCCAGCGGG TTATGCCGGG  
GACTCATGGG AGACTGCCGG GGTCAACTCG GAGGAAGGTG GGGACGACGT CAAATCATCA  
TGCCCCCTAT GTCTGGGCT TCACGCATGC TACAATGGCC GGTACAAAGG GTTGCATAC  
TGTGAGGTGG AGCTAATCCC AAAAAGCCGG TCTCAGTTCG GATTGAGGTC TGCAACTCGA  
CCTCATGAAG TTGGAGTCGC TAGTAATCGC AGATCAGCAA CGCTGCGGTG AATACGTTCC  
CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCAAGTCA CGAAAGTNGT AACACCCGAA GCCGGNGCCT  
AACCCCTTGN GGAGGGAGCC

Esta secuencia presenta efectivamente más de un 99,2 % de identidad con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 1, confirmando que esta cepa pertenece a la especie *Arthrobacter agilis*.

5

### 2/ Preparación del extracto SBE:

#### 2-1. Cultivo de la cepa SB5:

10 La cepa se cultiva en medio LB sin sal a una temperatura de 25 °C, en condiciones aerobias y con fuerte agitación, hasta que se alcanza la fase estacionaria, o después de aproximadamente 3 días.

A continuación, las células se recogen mediante centrifugación, normalmente a una velocidad de 5 000 rpm durante aproximadamente 15 minutos. Después, el sedimento se seca conservándolo en la oscuridad a 4 °C.

15

#### 2-2. Aislamiento del extracto SBE:

20 El sedimento se recoge en 6 ml de acetona por gramo de sedimento, opcionalmente en presencia de metanol, por ejemplo, en una mezcla de metanol/acetona (5/1). Esta etapa de extracción tiene lugar durante varias horas, normalmente 18 horas, a 4 °C y en la oscuridad.

25 La suspensión en acetona, o en la mezcla de acetona/metanol, se completa agregando hexano, ventajosamente a la mitad del volumen de acetona. Después, se añade una solución saturada de NaCl (cloruro de sodio) hasta que se separe la mezcla bifásica, con una fase acuosa por un lado y una fase apolar por el otro. De manera ventajosa, la fase acuosa se extrae de nuevo con hexano y las fases de hexano se juntan.

La fase apolar o de hexano se evapora, ventajosamente al vacío y a 25 °C.

30 El extracto de SBE se puede conservar tal cual a -20°C o se puede extraer en solución, por ejemplo, en DMSO (dimetilsulfóxido) o THF (tetrahidrofurano) o propanodiol, para su ensayo en células vivas, y es muy soluble en diclorometano y acetona.

La concentración de carotenoides se determina midiendo la absorbancia a 512 nm en DMSO o a 502 nm en propanodiol.

En la figura 2 se muestra el espectro de HPLC del extracto, así como el espectro de absorbancia de cada uno de los 6 picos principales. La comparación de estos espectros con los datos que aparecen en la bibliografía (Fong *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56: 750-756) muestra que el extracto está constituido principalmente por carotenoides, con un espectro de absorción característico de 3 "dedos" alrededor de 490 nm. Como se indica en Fong *et al.*, (*Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56: 750-756), el espectro de absorción también revela la presencia de formas glicosiladas y de diferentes isómeros de estos carotenoides.

### 3/ Actividades del extracto SBE:

#### 3-1. Ensayo ABTS:

Como se mencionó anteriormente, este ensayo utilizado convencionalmente en la industria cosmética y agroalimentaria permite establecer, de manera puramente química, el "poder antioxidante total" de un extracto. Aunque este ensayo es incompleto porque solo mide la actividad antioxidante del extracto frente a un tipo de radical particular, tiene la ventaja, a través de su normalización con Trolox, de dar resultados que son comparables con los de miles de moléculas distintas sometidas a ensayo de esta manera.

Este ensayo se realizó como se describe en Re *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.* (1999) 26(9-10): 1231-7.

La figura 3 revela que el extracto según la invención (SBE), muestra un poder antioxidante más de 4 veces mayor que el del antioxidante de referencia, Trolox.

En el contexto de la invención, un equivalente de Trolox se corresponde con el número de moles del producto ensayado que permite obtener un efecto equivalente al de 1 mol de Trolox. El extracto según la invención, se cuantificó usando carotenoides como marcador del extracto. De este modo, 1 mol del extracto de SBE corresponde a 1 mol de carotenoides, medido mediante absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción y restado del coeficiente de extinción molar de los carotenoides.

#### 3-2. Protección de las proteínas contra los radicales libres:

Este ensayo consiste en medir la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) a 405 nm en presencia de radicales libres, concretamente hidroxilos (OH), y de un compuesto o extracto de interés, para evaluar el poder protector frente a las proteínas de dicho compuesto o extracto.

#### Material y métodos:

##### Reactivos:

Tampón: polvo de "solución salina tamponada con Tris" (Sigma; Referencia del producto: T6664-10PAK);

Enzima: Fosfatasa alcalina 10 KU a 125 U/μl en solución tamponada de glicerol (Sigma; Referencia del producto: P0114);

##### Agente oxidante:

1/ Peróxido de hidrógeno al 30 % o 9 M (Sigma; Referencia del producto: H1009-5ML): solución B1;

2/ Sulfato de hierro II heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O) 0,1 M (Fluka; Referencia del producto: 44970): solución B2;

Sustrato: solución de 4-nitrofenilfosfato ("sustrato amarillo de fosfatasa alcalina"; Sigma; Referencia del producto: P7998-100ML).

##### Kit:

- Placa de 96 pocillos;
- Tampón: 20 ml de una solución de TBS 0,05 M a pH 8;
- Solución A (enzima): 10 μl de la solución madre diluida a 1/1000 (1,25 U o 0,125 U/μl) en tampón;
- 100 μl de solución B1 y 100 μl de solución B2 o solución B correspondiente a la mezcla de las soluciones B1 y B2 a una dilución adecuada en tampón (por ejemplo, 3 ml de solución B a 90 mM, obtenida a partir de 30 μl de solución B1 (30 μl de solución B2, es decir, una dilución de 1/100);
- Solución C (sustrato): 5 ml de la solución comercial.

##### Protocolo:

- Diluir la solución A en tampón a una dilución adecuada;
- Depositar, en cada pocillo, 10 μl de solución A diluida para tener una cantidad de enzima comprendida entre 0,005 y 0,05 U;

- Añadir, a cada uno de los pocillos, 10 µl del producto o extracto a ensayar, opcionalmente diluidos en tampón. Los diferentes pocillos se pueden usar para ensayar una variedad de diluciones;
- Añadir, a cada uno de los pocillos, 30 µl de solución B. La concentración de la solución B se ajusta para obtener una inactivación del 90 % de la cantidad de enzima presente. La concentración final del agente oxidante corresponde al 30 % de la concentración de la solución B;
- Incubar sin agitación durante 15 minutos a 37°C;
- Añadir 50 µl de la solución C. El volumen de reacción es por tanto igual a 100 µl;
- Colocar la placa a 37 °C con agitación;
- Leer la absorbancia a 405 nm durante 20 minutos (cinética) o después de 5 minutos de reacción (puntual).

#### Resultados:

La figura 4A revela que el extracto según la invención (SBE), tiene un poder protector de las proteínas, frente a los radicales libres, aproximadamente 100 veces más alto que el de Trolox, y más de 6 veces más alto que todos los antioxidantes ensayados. La diferencia entre este resultado y el potencial antioxidante medido mediante ensayo ABTS, demuestra que la protección de las proteínas no solo está relacionada con el potencial antioxidante de SBE.

Por otro lado, esta misma técnica se utilizó para comparar el efecto de 6 fracciones (señaladas SB1 a SB6) correspondientes a los 6 picos principales identificados mediante el análisis de HPLC con el del extracto de SBE total.

En la figura 4B puede apreciarse que el extracto SBE tiene un poder protector de las proteínas frente a los radicales libres de 2 a 4 veces superior al de cada uno de los picos que lo componen y demuestra un efecto sinérgico entre las diferentes fracciones del extraído.

#### 3-3. Protección de las proteínas contra los rayos UV:

Este ensayo es similar al descrito en el apartado anterior. Consiste en medir la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) a 405 nm, irradiada con rayos UV-C (254 nm), en presencia de un compuesto o extracto de interés, para evaluar el poder protector frente a las proteínas de dicho compuesto o extracto.

#### Material y métodos:

La fosfatasa alcalina se sometió a irradiación UV a 254 nm correspondiente a la de los rayos UV-C. Con agitación constante, se aplicaron dosis de UV que permitían una inactivación del 90 % de la enzima en un medio de reacción y en condiciones similares a las mencionadas anteriormente. Cabe señalar que, en este caso, el volumen ocupado por el agente oxidante se reemplaza por tampón. En la práctica, se utilizó una lámpara con una potencia igual a 0,0365 J/cm<sup>2</sup>/min, con un tiempo de exposición de 1 o 2 horas.

#### Resultados:

La figura 5 revela que el extracto según la invención (SBE), tiene un poder protector de las proteínas, frente a los rayos UV, más de 300 veces más alto que el de Trolox y casi 40 veces más alto que el de todos los antioxidantes ensayados.

Este efecto protector tan fuerte del extracto según la invención, podría explicarse mediante varios efectos combinados del extracto en presencia de:

- un efecto de neutralización de singuletes del oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) generados por los rayos UV;
- un efecto de "pantalla", "filtro" o "escudo", por absorción directa de los UV;
- un efecto antioxidante más tradicional, es decir, la neutralización de los radicales libres generados por los singuletes del oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).

#### 3-4. Protección de las proteínas:

La actividad de la fosfatasa alcalina se midió en ausencia de cualquier estrés oxidativo pero en presencia de concentraciones crecientes del extracto según la invención (SBE).

La figura 6 revela que la actividad de la AP aumenta en presencia del extracto según la invención (SBE) a dosis muy bajas. Este aumento podría deberse a la protección de la enzima durante las etapas de incubación y agitación. También se contempla que algunas oxidaciones experimentadas por la enzima conservada -20 °C, se reduzcan debido al extracto de SBE, lo que podría incrementar su actividad por "rejuvenecimiento".

En lo que respecta a la figura 6, una concentración adecuada de extracto según la invención (SBE) está entre 0,001 y 100 µM, ventajosamente entre 0,1 y 1 µm. Sin embargo, se trata de concentraciones que deben alcanzarse en las células diana de la piel. De este modo, en las composiciones cosméticas, la concentración debe ser mucho mayor para tener en cuenta las pérdidas relacionadas con la penetración cutánea.

Una interacción entre la enzima y el extracto podría estar en el origen de esta acción "potenciadora". Por extensión, el extracto según la invención puede proteger a las proteínas presentes en el organismo, concretamente las que participan directamente en la protección del organismo contra el estrés oxidativo o en la reparación del daño oxidativo.

### 5 3-5. Sinergia con otros antioxidantes:

Para identificar antioxidantes capaces de aumentar la eficacia de la protección de las proteínas mediante el extracto según la invención (SBE), el ensayo descrito en el apartado 3-2 se realizó mezclando el extracto según la invención (SBE) y unos diez antioxidantes conocidos, tomados individualmente. El interés es identificar moléculas con las que el extracto según la invención (SBE) combine los efectos antioxidantes, o incluso demuestre sinergias que vayan más allá de los efectos aditivos. Otro interés de dichas mezclas es la posible estabilización del extracto según la invención (SBE).

La Figura 7 muestra que en presencia del conjunto de antioxidantes ensayados, y particularmente en presencia de Trolox, el extracto según la invención (SBE) presenta una fuerte sinergia, lo que aumenta significativamente (en un factor superior a 5 con Trolox) su poder protector de las proteínas frente a los radicales libres.

### 15 3-6. Protección de las células humanas:

#### 20 A/ Ensayo del cometa:

Para confirmar la protección que ejerce el extracto según la invención (SBE) sobre las células humanas, a través del ensayo denominado del cometa, se realizaron mediciones de la protección de cultivos de queratinocitos primarios y su ADN frente a un estrés oxidativo inducido por la luz UV/visible, como lo describen Ostling, O., y K. J. Johanson. (*Biochemical and biophysical research communications* 123.1 (1984): 291-298) et Singh, Narendra P., *et al.* (*Experimental cell research* 175.1 (1988): 184-191). El interés es mostrar la actividad protectora del extracto según la invención (SBE) en un modelo celular y compararlo con un antioxidante de referencia, el acetato de tocoferol.

#### 30 Material y métodos:

Las propiedades antioxidantes del SBE y del acetato de tocoferol (Ac-Toc) contra las radiaciones UVB/UVA/VISIBLE (Irradiado: 290 nm - 800 nm) se evaluaron mediante el ensayo del cometa (versión alcalina) en cultivos de queratinocitos primarios humanos normales.

La evaluación de las propiedades antioxidantes se efectuó a concentraciones de 500 nM para SBE y de 50 µM para Ac-Toc. Los dos productos se disolvieron en tetrahidrofurano a una concentración final del 1 %. Las propiedades antioxidantes se definieron como la capacidad de disminuir el número de roturas de una sola hebra en el ADN de las células que se produce después de la irradiación UVB/UVA/visible (290-800 nm) y estas propiedades se midieron después del contacto con los productos durante 120 min a 37°C. La irradiación la suministró un simulador solar Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussey le Boeuf, Francia). La dosis de irradiación total fue de 12,0 J/cm<sup>2</sup> durante un período de 2,7 min (potencia nominal de la lámpara 750 W/m<sup>2</sup>). Los controles negativos incluyeron queratinocitos tratados con THF (1 %) y no irradiados, Ac-Toc (50 µM) y SBE (500 nM) en THF al 1 % y no irradiados.

#### 45 Resultados:

La figura 8 muestra que el extracto según la invención (SBE) tiene un fuerte potencial protector de las células frente a un estrés oxidativo y que permite proteger el ADN de las células mejor que el acetato de tocoferol, siendo 100 veces menos concentrado. Su poder protector *in vitro* es por tanto más de 100 veces mayor que el del acetato de tocoferol.

#### 50 B/ Ensayo de carbonilación:

Siguiendo el mismo protocolo de irradiación UV/visible que el utilizado anteriormente para el ensayo del cometa, se midió la tasa de carbonilación de queratinocitos en presencia de SBE y acetato de tocoferol.

#### 55 Material y métodos:

##### 1- Cultivo de queratinocitos e irradiación

- Queratinocitos humanos normales (QHN) (T6) -10<sup>6</sup> células/condición

#### 60 - Condiciones:

- Control de disolvente de THF al 1 %
- SBE 200 nM
- Acetato de tocoferol 20 µM

- Cada condición se realizó por triplicado.

65 - Durante 2 h, los QHN se pusieron en contacto en las diferentes condiciones experimentales.

- Irradiación UVB UVA visible a 120 kJ/m<sup>2</sup> de las células colocadas en PBS con un simulador solar Suntest CPS+

(Atlas Material testing technology) a 4 °C. Los controles negativos se mantuvieron a 4 °C durante el mismo tiempo que la irradiación.

- Tripsinación de las células después de la irradiación. Aclarado del PBS congelado. Eliminación del PBS y congelación inmediata de los sedimentos celulares a -80 °C.

5

#### 2- Medición de la carbonilación

- Las proteínas se extrajeron después de la lisis de las células y su concentración se midió mediante el ensayo de Bradford.

10 - Las proteínas se derivan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que se fija a los grupos carbonilo.  
- A continuación, se midió la tasa de carbonilación en placas ELISA (kit de cuantificación de proteínas oxidadas OxyELISA™, Millipore) a 450 nm.

#### Resultados:

15 La Figura 9 muestra que la tasa de carbonilación de las proteínas de los queratinocitos aumenta significativamente después de la irradiación UV/visible. Este aumento disminuye significativamente (valor de  $P < 0,01$ ) mediante la adición del extracto SBE o acetato de tocoferol que protege a las proteínas contra la oxidación. Esta protección es similar (valor de  $P > 0,01$ ) para el SBE y el acetato de tocoferol, aunque el extracto SBE es 100 veces menos concentrado.

20 Aunque es ligeramente menos fuerte, el potencial de protección del proteoma por el SBE es del mismo orden que el observado en el ensayo del cometa y del orden de 100 veces el del acetato de tocoferol, que corresponde a los resultados obtenidos anteriormente basados en la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina (PA).

25 Por tanto, la protección de las células, observada mediante el ensayo del cometa, parece deberse principalmente a la capacidad del SBE para proteger el proteoma.

#### 4/ Composición cosmética que contiene el extracto SBE

30 Las composiciones cosméticas comprenden normalmente del 0,0001 al 0,01 % en peso del extracto (seco) según la invención.

Una crema puede tener la siguiente composición (en % en masa), incorporándose ventajosamente el principio activo, constituido por el extracto según la invención, en el isononanoato de isononilo.

35

Nombre INCI	% ponderal
Agua	78,290000
Goma Xantana	0,100000
Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP y Agua	0,800000
Glicerina	5,000000
Butilenglicol	2,000000
Fenoxietanol	0,350000
EDTA disódico	0,200000
Clorfenesina	0,260000
Steareth-21	1,160000
Steareth-2	1,840000
Dimeticona	2,000000
Dibehenato de glicerilo y tribehenina y behenato de glicerilo	0,500000
Isononanoato de isononilo	5,000000
Acacia decurrens/Jojoba/Cera de semillas de girasol/Ésteres de poligliceril-3	1,000000
Alcohol cetílico	1,500000

De manera característica, estas composiciones pueden tener un color que varía del rosa claro al rojo, debido al color del extracto según la invención.

40 Estos ejemplos de realización demuestran que la elección particular de la bacteria *Arthrobacter agilis* como fuente de carotenoides (presentes en muchas especies, concretamente, en plantas de algas, cianobacterias, hongos, ...) presenta ventajas inesperadas en el contexto de las aplicaciones previstas:

- 45
- Cultivo de la bacteria y preparación del extracto relativamente fáciles (a diferencia de muchos organismos extremófilos, concretamente halobacterias);
  - Sinergia entre las diferentes fracciones del extracto;
  - Contribución de las diferentes isoformas a la actividad global del extracto (a diferencia, por ejemplo, de la

deinoxantina de *Deinococcus radiodurans* sola);

- Actividad anti radicales y anti UV muy fuerte en comparación con la de los antioxidantes conocidos;
- Sinergia con los antioxidantes conocidos;
- Efecto protector nunca antes revelado frente al proteoma, que va más allá del potencial antioxidante: El potencial antioxidante del extracto SBE es 4 veces mayor que el de Trolox, mientras que su capacidad para proteger a las proteínas es 100 veces mayor que la de Trolox, tanto en el contexto de ensayos bioquímicos como en cultivos celulares.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> THOREL, Jean-Noel
- <120> EXTRACTO DE ARTHROBACTER AGILIS PARA SU USO CONCRETAMENTE EN COSMÉTICOS
- 15 <130> T131-B-35659 PCT
- <150> FR 13,53200
- <151> 09-04-2013
- 20 <160> 2
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- 25 <211> 1482
- <212> ADN
- <213> *Arthrobacter* sp.
- <220>
- 30 <221> fuente
- <222> 1..1482
- <223> / mol\_type = "ADN no asignado"
- /organismo="*Arthrobacter* sp."
- 35 <400> 1

ES 2 863 174 T3

gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgatgaac 60  
ctcacttgtg gggggattag tggcgaacgg gtgagtaaca cgtgagtaac ctgccottga 120  
ctctgggata agcctgggaa accgggtcta atactggata cgaccttctg gcgcatgcca 180  
tgttgggtgga aagcttttgt ggttttggat ggactcggcg cctatcagct tgttgggtggg 240  
gtaatggcct accaaggcga cgacgggtag ccggcctgag agggtgaccg gccacactgg 300  
gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg cacaatgggc 360  
gcaagcctga tgcagcgacg ccgctgagg gatgaaggcc ttcgggttgt aaacctctt 420  
cagtagggaa gaagcctgtc ttttgggtgg gtgacggtag ctgcagaaga agcgcggct 480  
aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggcgcaag cgttatccgg aattattggg 540  
cgtaaagagc tcgtaggcgg tttgtcgcgt ctgccgtgaa agtccggggc ttaactccgg 600  
atctgcggtg ggtacgggca gactagagtg cagtagggga gactggaatt cctgggtgtag 660  
cggtgaaatg cgcagatata aggaggaaca ccgatggcga aggcaggtct ctgggctgta 720  
actgacgctg aggagcgaaa gcatggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccat 780  
gccgtaaacg ttgggcaacta ggtgtggggg acattccacg ttttccgcgc cgtagctaac 840  
gcattaagtg ccccgccctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag gaattgacgg 900  
gggcccgcac aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag aacctacca 960  
aggcttgaca tgaaccggaa tgatgcagag atgtgtcagc cacttgtggc cggtttacag 1020  
gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatggtg ggttaagtcc cgcaacgagc 1080  
  
gcaaccctcg ttccatggtg ccagcggggt atgccgggga ctcatgggag actgccgggg 1140  
tcaactcggg ggaaggtggg gacgacgtca aatcatcatg ccccttatgt cttgggcttc 1200  
acgcatgcta caatggccgg taaaaaggtg tgcgatactg tgaggtggag ctaatcccaa 1260  
aaagccggtc tcagttcggg ttgaggtctg caactcgacc tcatgaagt ggagtgcgta 1320  
gtaatcgag atcagcaacg ctgcggtgaa tacgttcccg ggcttgtac acaccgcccg 1380  
tcaagtcaag aaagttggta acaccggaag ccgggtggcct aacccttgt gggagggagc 1440  
cgtcgaaggt gggaccggcg attgggacta agtcgtaaca ag 1482

- 5 <210> 2
- <211> 1400
- <212> ADN
- <213> *Arthrobacter sp.*
- 10 <220>
- <221> fuente
- <222> 1..1400
- <223> / mol\_type = "ADN no asignado"
- /organismo="*Arthrobacter sp.*"
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> 571, 671, 1358, 1376, 1390
- <223> /observación = "A o C o G o T"

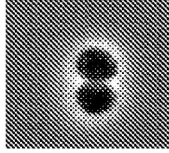
ES 2 863 174 T3

<400> 2

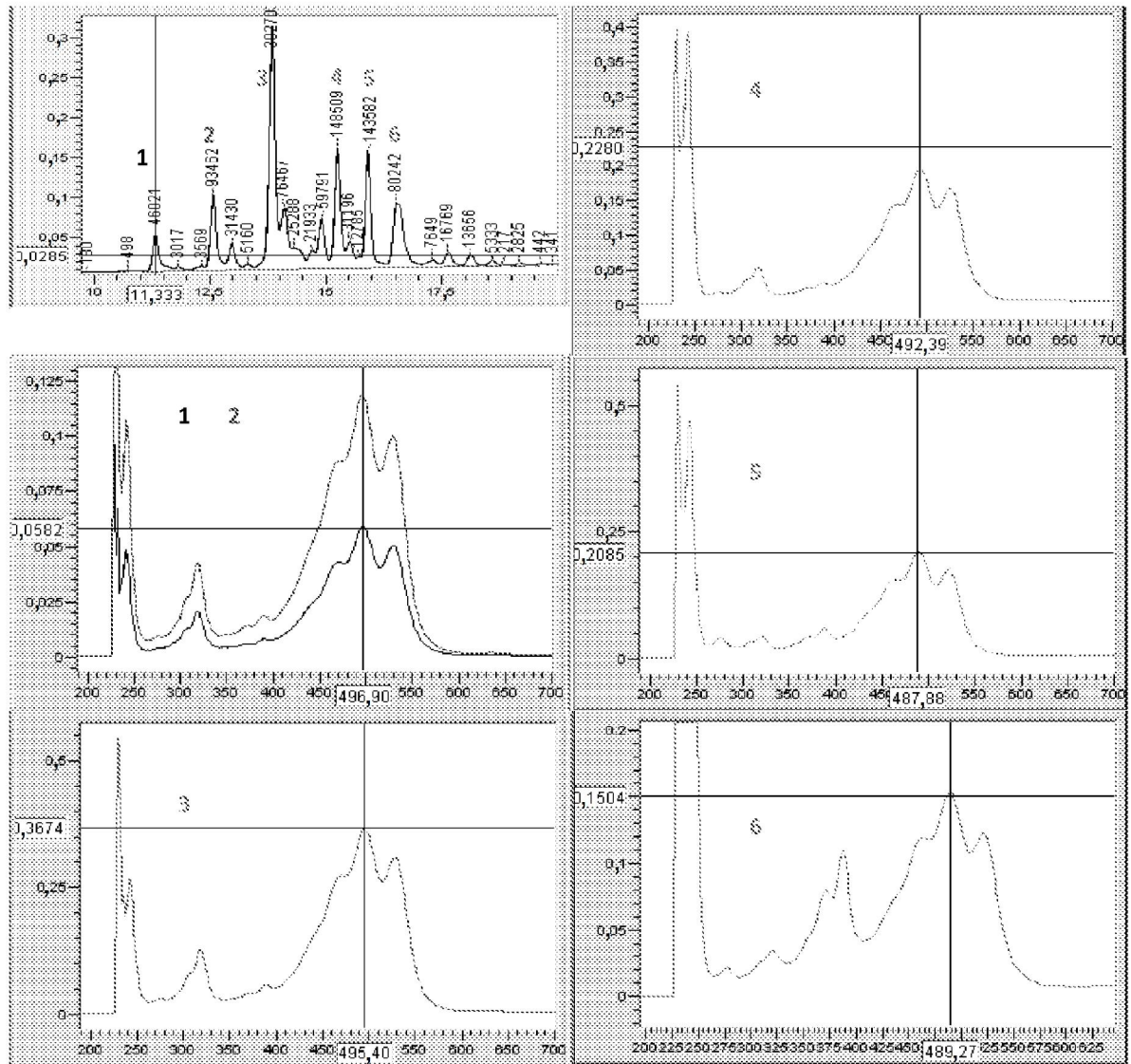
acatgcaagt cgaacgatga acctcacttg tggggggatt agtggcgaac gggtagta	60
cacgtgagta acctgccctt gactctggga taagcctggg aaaccgggtc taatactgga	120
tacgaccttc tggcgcacgc catgttggtg gaaagctttt gtggttttgg atggactcgc	180
ggcctatcag cttgttggtg gggtaatggc ctaccaaggc gacgacgggt agccggcctg	240
agagggtgac cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag	300
tggggaatat tgcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcga cgccgcgtga gggatgaagg	360
ccttcggggt gtaaacctct ttcagtaggg aagaagccgg ccttttgggt tggtagcgg	420
acctgcagaa gaagcggcgg ctaactacgt gccagcagcc gcggaatac gtagggcgca	480
agcgttatcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggtttgcgc gtctgccgtg	540
aaagtccggg gcttaactcc ggatctgcgg ngggtacggg cagactagag tgcagtaggg	600
gagactggaa ttctgtgtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa caccgatggc	660
gaaggcaggt ntctgggctg taactgacgc tgaggagcga aagcatgggg agcgaacagg	720
attagatacc ctggtagtcc atgccgtaa cgttgggcac taggtgtggg ggacattcca	780
cgttttccgc gccgtagcta acgcattaag tgccccgcct ggggagtacg gccgcaaggc	840
taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggcg gagcatgcgg attaattcga	900
tgcaacgcga agaaccctac caaggcttga catgaaccgg aatgatgcag agatgtgtca	960
gccacttgtg gccggtttac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt	1020
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct cgttccatgt tgccagcggg ttatgccggg	1080
gactcatggg agactgccgg ggtcaactcg gaggaagggt gggacgacgt caaatcatca	1140
tgccccttat gtcttgggct tcacgcatgc tacaatggcc ggtacaaagg gttgcgatac	1200
tgtgaggtgg agctaatacc aaaaagccgg tctcagttcg gattgaggtc tgcaactcga	1260
cctcatgaag ttggagtcgc tagtaatcgc agatcagcaa cgctgcgggtg aatacgttcc	1320
cgggccttgt acacaccgcc cgtcaagtca cgaaagtngt aacaccgaa gccgngcct	1380
aacccttgn ggaggagcc	1400

**REIVINDICACIONES**

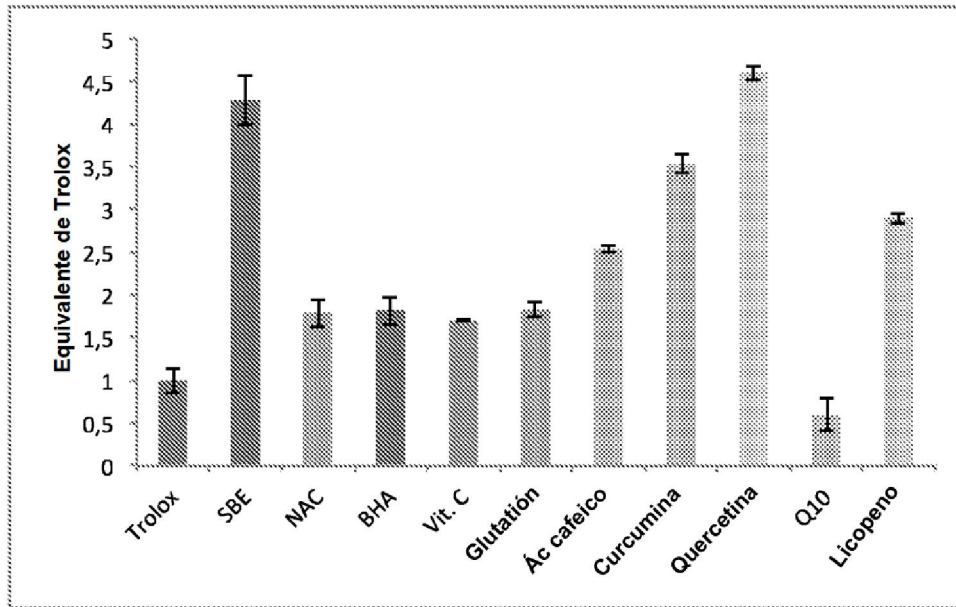
1. Composición cosmética o farmacéutica que comprende:  
5 - un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides; y  
- un agente antioxidante que es la vitamina E.
2. Composición según la reivindicación 1, *caracterizada* por que el extracto se obtiene cultivando la bacteria en un medio constituido por 1 % en peso de triptona y 0,5 % en peso de extracto de levadura.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, *caracterizada* por que el extracto se obtiene de células en fase estacionaria.
4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, *caracterizada* por que el extracto corresponde a la fase apolar obtenida del sedimento bacteriano.
- 15 5. Composición según la reivindicación 4, *caracterizada* por que el sedimento bacteriano se extrae, ventajosamente, con acetona y/o metanol, y por que la fase apolar se obtiene añadiendo un disolvente apolar, ventajosamente, hexano y una solución salina saturada, ventajosamente, una solución de NaCl.
- 20 6. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, *caracterizada* por que el extracto representa del 0,0001 al 0,01 % en peso seco de la composición.
7. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, *caracterizada* por que está en forma de loción, crema, gel, aerosol, soluciones, cápsulas o comprimidos.
- 25 8. Procedimiento de tratamiento cosmético, ventajosamente, para combatir el estrés oxidativo, y concretamente, el envejecimiento celular de la piel, que consiste en aplicar sobre la piel, la composición según una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Composición que comprende:  
- un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides; y  
- un agente antioxidante que es la vitamina E,  
para su uso como agente anti UV.
- 35 10. Composición que comprende:  
- un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides; y  
- un agente antioxidante que es la vitamina E,  
para su uso como agente protector contra la luz visible, en particular, en el campo del azul violeta.
- 40 11. Composición que comprende:  
- un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides; y  
- un agente antioxidante que es la vitamina E,  
para su uso como agente anti radicales.
- 45 12. Composición que comprende:  
- un extracto de la bacteria *Arthrobacter agilis* que contiene carotenoides; y  
- un agente antioxidante que es la vitamina E,  
para su uso como agente protector de proteínas.



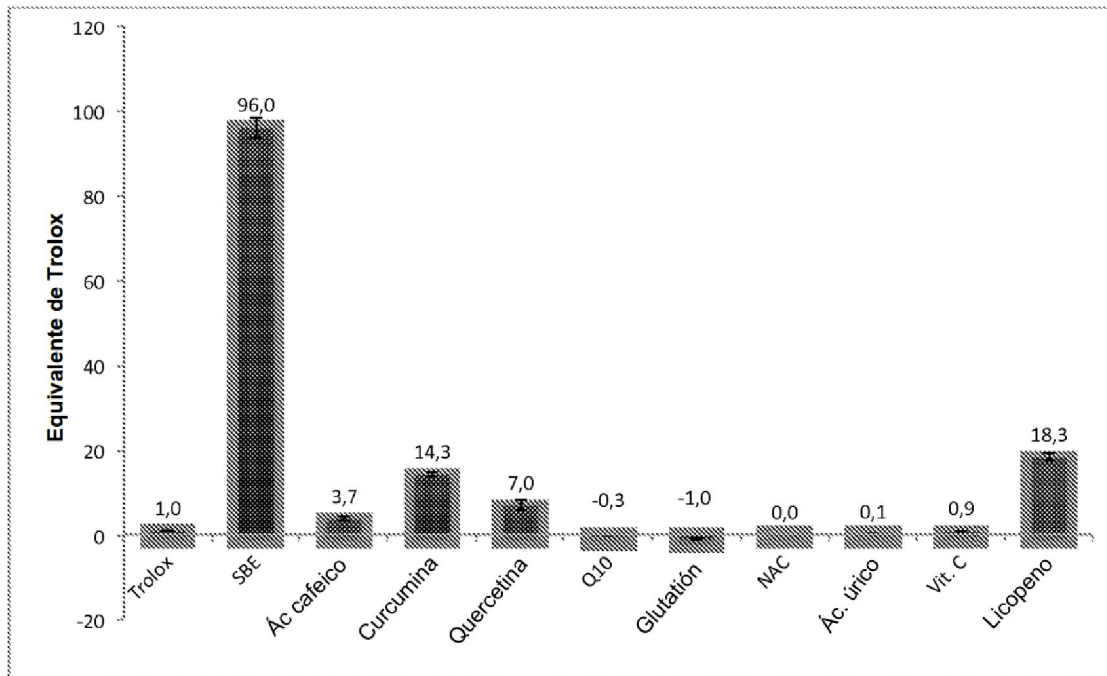
**Figura 1**



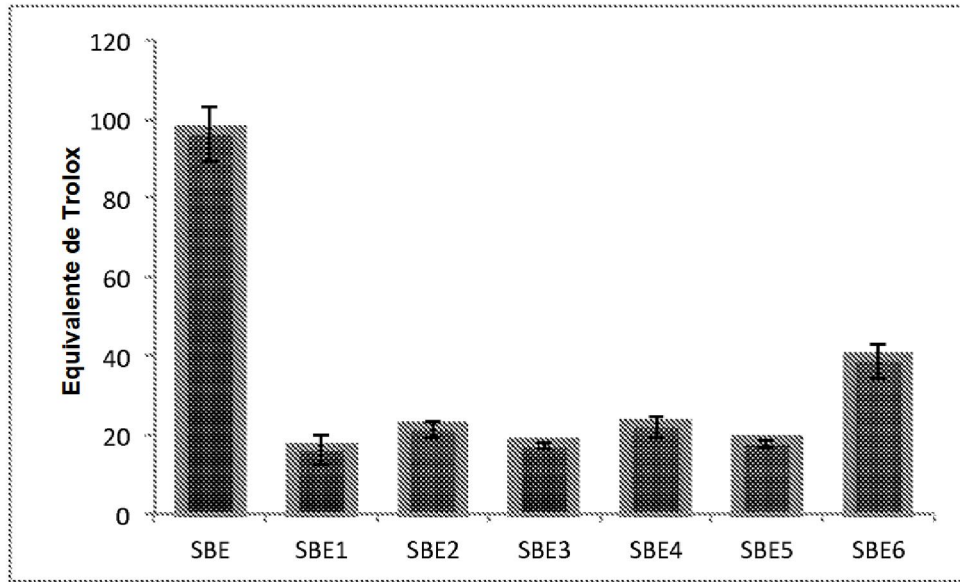
**Figura 2**



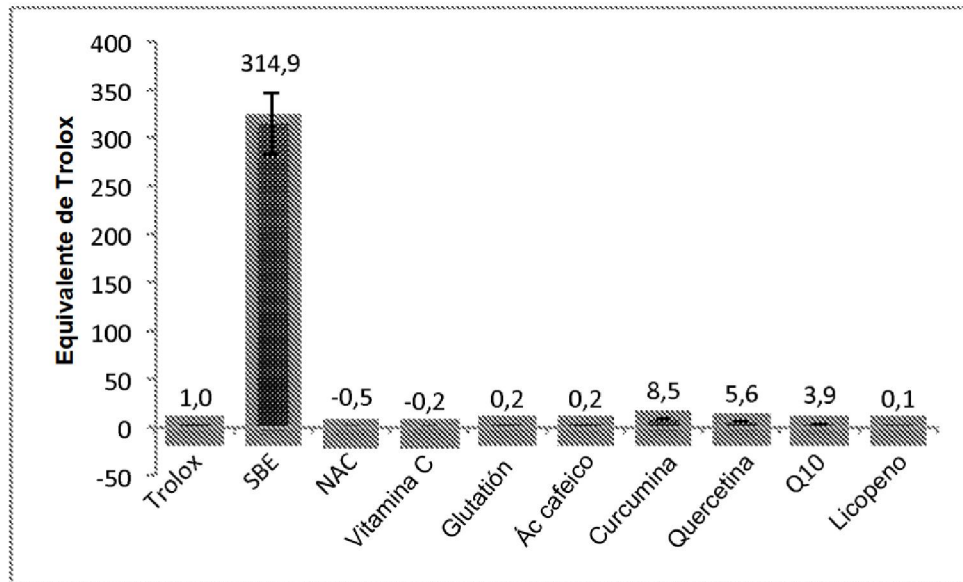
**Figura 3**



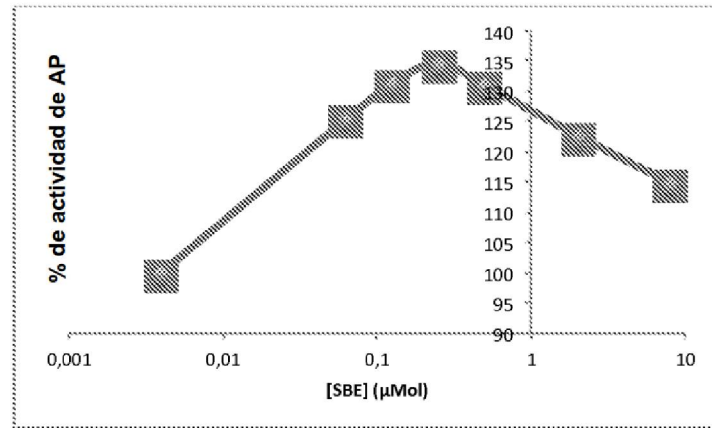
**Figura 4A**



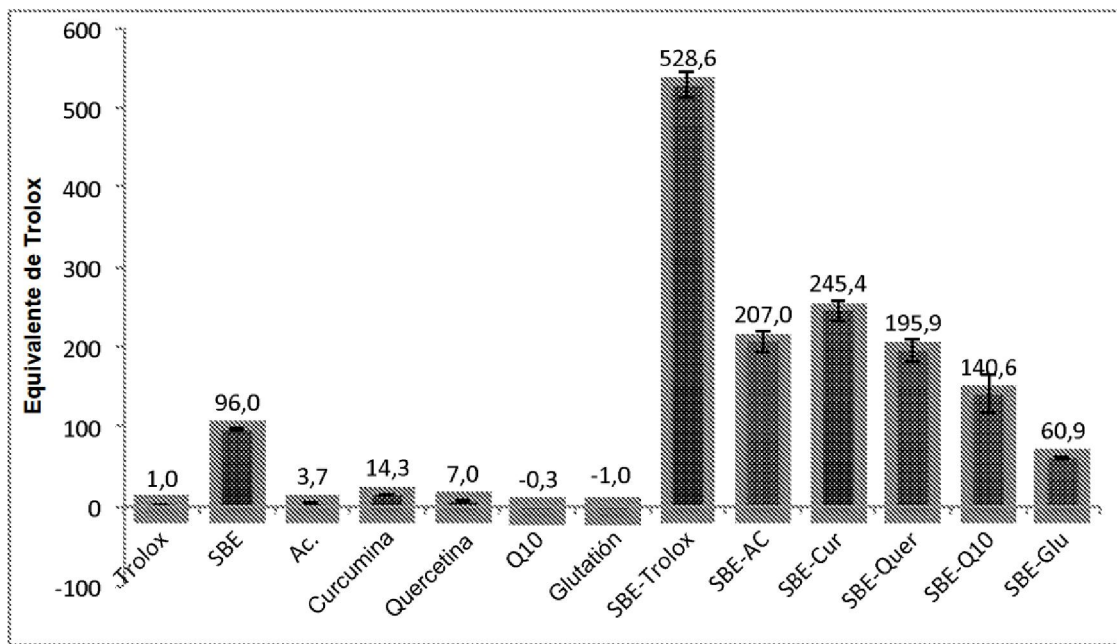
**Figura 4B**



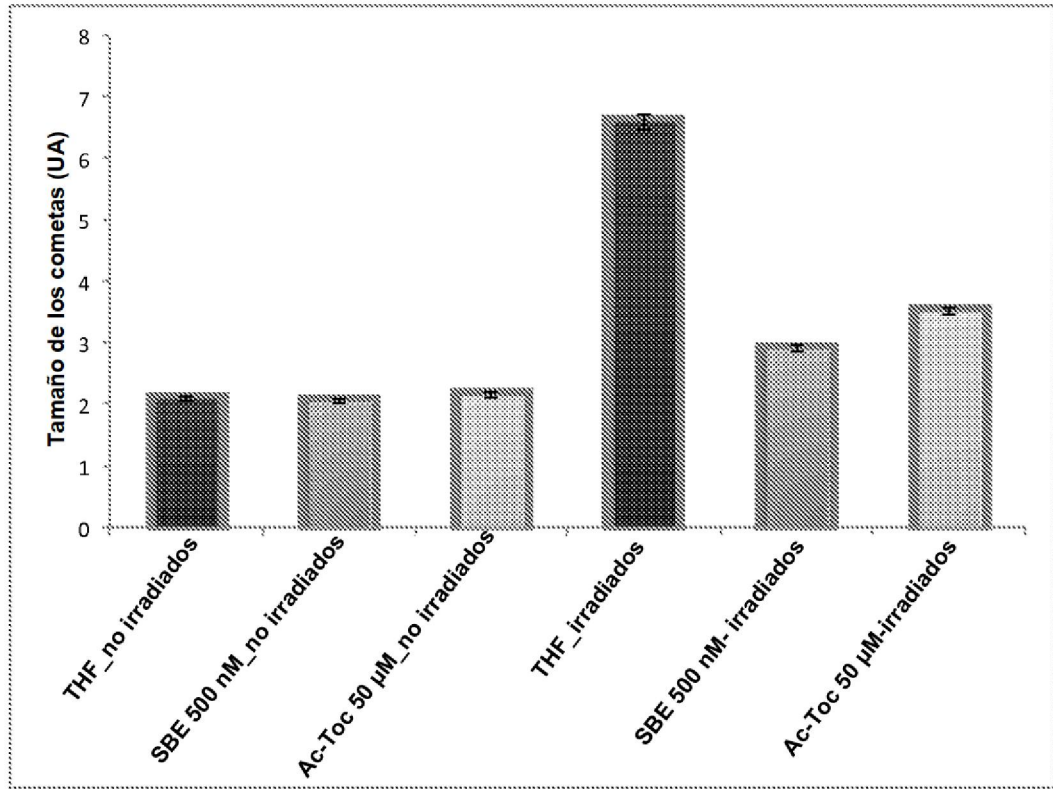
**Figura 5**



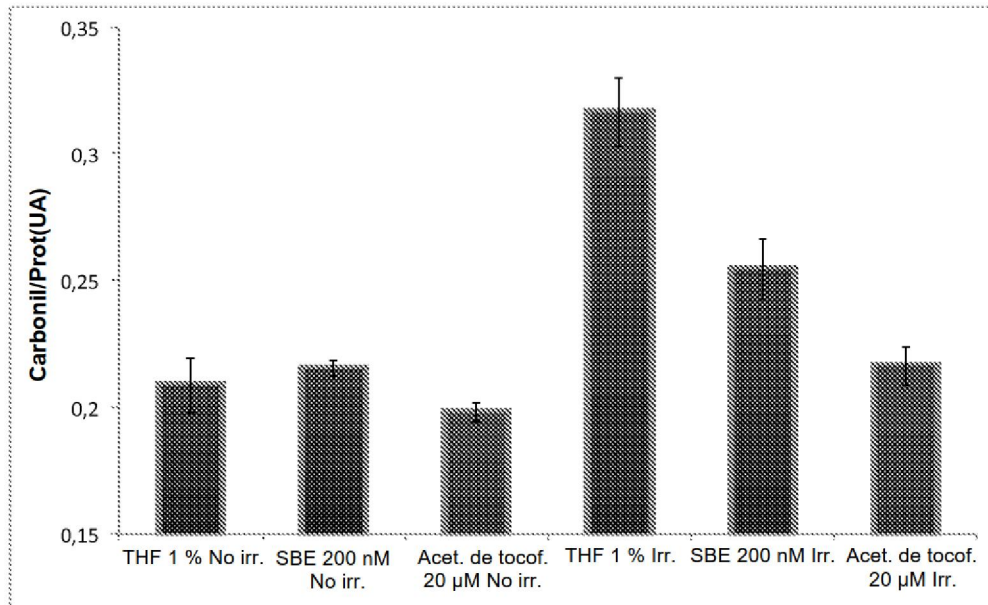
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**