

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 813**

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: **30.03.2015 PCT/IB2015/052326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15151009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2015 E 15718622 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3126011**

54 Título: **Extracto de fermentación de una cepa bacteriana para el aumento de los niveles de adiponectina**

30 Prioridad:

31.03.2014 EP 14382129

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

27.04.2021

73 Titular/es:

**LUBRIZOL ADVANCED MATERIALS, INC.
(100.0%)
9911 Brecksville Road
Cleveland, OH 44141-3247, US**

72 Inventor/es:

**ALMIÑANA DOMÈNECH, NÚRIA;
FERRER MONTIEL, ANTONIO;
LIDÓN MOYA, MARÍA DEL CARMEN;
SOLEY ASTALS, ALBERT y
GARCÍA SANZ, NÚRIA**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 821 813 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

Extracto de fermentación de una cepa bacteriana para el aumento de los niveles de adiponectina

5 Campo de la invención

La tecnología descrita se refiere a un extracto de fermentación de origen bacteriano, que aumenta los niveles de adiponectina. Dicho extracto de fermentación se secreta por una cepa de la especie *Bacillus pumilus*. Esta invención también se refiere a las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas que contienen dicho extracto de fermentación.

Antecedentes de la invención

15 La piel, las membranas mucosas, el cabello y/o las uñas constituyen una barrera física entre el organismo y su entorno. La piel está compuesta de dos tejidos: la epidermis y la dermis. Los adipocitos se encuentran en la capa más profunda de la dermis, la hipodermis, y se organizan en lóbulos, separados por tabiques de tejido conectivo que contienen vasos, nervios y ganglios linfáticos. La función principal de los adipocitos es el almacenamiento de grasa en las vacuolas, como triglicéridos.

20 El tejido adiposo desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis de los ácidos grasos de todo el cuerpo. En períodos de mucho calor abundancia calórica, almacena ácidos grasos libres (FFA) en forma de triglicéridos a través de su esterificación a glicerol y los libera nuevamente a la circulación en tiempos de escasez de energía. El tejido adiposo también actúa como un órgano endocrino capaz de secretar citocinas, llamadas adipocinas o proteínas derivadas del tejido adiposo.

25 Con la edad y la falta de actividad física adecuada se produce una deposición de tejido adiposo en diferentes partes del cuerpo y una disminución de la masa muscular. El ejercicio regular produce una disminución en la acumulación de grasa y un aumento en la resistencia muscular, lo que a su vez genera a un aspecto más firme de algunas áreas corporales y una mejor apariencia física. Se cree que los efectos beneficiosos del ejercicio están mediados en parte por los cambios en el perfil de adipocinas, es decir, al aumentar los niveles de citocinas antiinflamatorias, como la adiponectina [Golbidi S. y Laher I. "Exercise Induced Adipokine Changes and the Metabolic Syndrome", J. Diabetes Res., 2014; DOI 2014:726861; Petersen A. M. y Pedersen B. K., "The anti-inflammatory effect of exercise", J. Appl. Physiol., 2005, 98(4), 1154-1162; LaMonte M. J. y otros, "Physical activity and diabetes prevention", J. Appl. Physiol., 2005, 99, 1205-1213; Bruunsgaard H., "Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation", J. Leukoc. Biol., 2005, 78 (4), 819-835]. El efecto del ejercicio se ha descrito en los niveles de expresión génica, ligandos de proteínas y enlaces de receptores [Moldoveanu AI y otros, "The cytokine response to physical activity and training", Sports Med., 2001, 31(2), 115-144].

40 La adiponectina (también conocida como AdipoQ, ACDC, Acrp30, apM-1, APM1, GBP28, ADPN y ADIPQTL1) es una citocina secretada por el tejido adiposo durante la diferenciación de los adipocitos. La adiponectina humana consiste en 244 aminoácidos y tiene una estructura de dominio característico con un dominio similar al colágeno y un dominio similar al C1q globular, y circula en la sangre en al menos tres complejos homoméricos, es decir, trímero, hexámero y multímeros de orden superior. El nivel de adiponectina plasmática se correlaciona inversamente con el índice de masa corporal (IMC) y la grasa intraabdominal y, además, el nivel plasmático de adiponectina aumenta mediante el entrenamiento con ejercicios aeróbicos [Golbidi S. y Laher I. "Exercise Induced Adipokine Changes and the Metabolic Syndrome", J. Diabetes Res., 2014; DOI 2014:726861].

50 La adiponectina lleva a cabo su función mediante la activación de dos tipos de receptores, el receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) y el receptor de adiponectina 2 (AdipoR2). La adiponectina se une a AdipoR1 en las células del músculo esquelético y activa las vías de la 5' AMP proteína quinasa activada por AMP (AMPK) por fosforilación, iniciando una serie de respuestas moleculares que finalmente generan a la estimulación de la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos, la producción de ATP y la biogénesis mitocondrial [Kadowaki T. y Yamauchi T. "Adiponectin and adiponectin receptors", Endocr. Rev. 2005, 26: 439-451; Golbidi S. y Laher I. "Exercise Induced Adipokine Changes and the Metabolic Syndrome", J. Diabetes Res., 2014, 2014:726861]. Además, se ha revelado que el tratamiento de los miotubos humanos con adiponectina induce la biogénesis mitocondrial, la oxidación del palmitato y la actividad de la citrato sintasa [Civitarese AE y otros, "Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics." Cell Metab., 2006, 4(1):75-87, por lo tanto, induce un aumento de la fuerza y el tono de las fibras musculares similar al logrado por el ejercicio físico.

60 Los músculos esqueléticos están compuestos por miocitos que forman fibras musculares (miofibras). Las miofibras se forman a partir de la fusión de los mioblastos desarrollados (un tipo de célula progenitora embrionaria) en un proceso conocido como miogénesis. Hay dos tipos principales de fibras musculares que difieren en sus isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC) y su capacidad enzimática. Los músculos están compuestos por una mezcla de diferentes tipos de fibras musculares. Las fibras tipo I (contracción lenta) tienen actividad aeróbica, alta capacidad oxidativa debido al alto contenido de mitocondrias (se expresan enzimas que oxidan los ácidos grasos), son ricas en mioglobina con apariencia roja y expresan el marcador de proteína Miosina de cadena pesada 7 (MyH7), que es específico para

5 fibras tipo I [Couturier A. y otros "Carnitine supplementation to obese Zucker rats prevents obesity-induced type II to type I muscle fiber transition and favors an oxidative phenotype of skeletal muscle" *Nutrition & Metabolism*, 2013, 10:48]. Las fibras tipo II (contracción rápida) tienen actividad anaeróbica, baja capacidad oxidativa debido al bajo contenido de mitocondrias y dependen del metabolismo glucolítico para generar ATP (trifosfato de adenosina). La proporción de fibras Tipo I y Tipo II depende de la acción del músculo: las fibras Tipo I están involucradas principalmente en el ejercicio aeróbico, en comparación con las fibras Tipo II, que están involucradas principalmente en el ejercicio anaeróbico, es decir, cuanto mayor es el número de fibras Tipo I, mayor es la resistencia muscular. Las personas con alta densidad capilar del músculo esquelético y las personas con alta proporción de fibras Tipo I muestran altas concentraciones de adiponectina circulante [Ingelsson E. y otros, "Associations of Serum Adiponectin with Skeletal Muscle Morphology and Insulin Sensitivity", *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(3):953-957]. Por lo tanto, se espera que un aumento en el nivel de adiponectina circulante aumente la proporción de las fibras Tipo I y la resistencia muscular.

15 Además, se ha informado que la adiponectina induce o acelera el proceso de curación de heridas de la piel [EP1651161 B1] al promover la proliferación y migración de los queratinocitos [Shibata S. y otros "Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway", *J. Immunol.*, 2012, 189(6):3231-41]. También se ha informado que la adiponectina aumenta la síntesis del colágeno y aumenta la expresión del gen ácido hialurónico sintasa 2, lo que aumenta la síntesis de ácido hialurónico [Ezure T y otros. "Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts", *Biofactors*. 2007, 31 (3-4): 229-36; Yamane T. y otros Adiponectin promotes hyaluronan synthesis along with increases in hyaluronan synthase 2 transcripts through an AMP-activated protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor-
20 a-dependent pathway in human dermal fibroblasts", *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 2011, 415, 235-238]. También se ha demostrado en la técnica que varios extractos de *Bacillus pumilus* pueden favorecer la cicatrización de heridas, tienen acción antiinflamatoria, tienen acción antifatiga muscular y son adecuados para tratamientos reafirmantes y antienvjecimiento de la piel (ver por ejemplo CN 101 475 920 A; JP 2010 173991 A; CN 103 655 437 A).

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto que el extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* aumenta los niveles de adiponectina, la actividad mitocondrial en el músculo, los niveles de ATP en el músculo y en la resistencia muscular.

30 Resumen de la invención

La tecnología descrita proporciona una solución para el aumento del nivel de adiponectina en los adipocitos y la actividad mitocondrial en el músculo mediante un extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 que contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular de menos de 7000 Da.

Descripción de la invención

40 Esta invención se refiere al extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* para su uso para aumentar los niveles de adiponectina y las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas que comprenden el extracto de fermentación. Esta invención también se refiere al extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* para uso como se define en las reivindicaciones adjuntas y al uso del extracto fermentación como se define en las reivindicaciones adjuntas. Sorprendentemente, los inventores de esta invención también han encontrado
45 que el extracto de fermentación mencionado anteriormente aumenta la actividad mitocondrial en el músculo y la resistencia muscular.

Definiciones

50 Para facilitar la comprensión de esta invención, se incluyen los significados de algunos términos y expresiones tal como se usan en el contexto de la invención.

Como se usa en la presente descripción, el término de transición "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es inclusivo o abierto y no excluye elementos adicionales, o pasos del método que no se mencionan. Sin embargo, en cada mención de "que comprende" en la presente descripción, se pretende que el término también abarque, como modalidades alternativas, las frases "que consiste esencialmente en" y "que consiste en", donde "que consiste en" excluye cualquier elemento o paso que no se especifique y "que consiste esencialmente en" permite la inclusión de elementos o pasos adicionales que no se mencionan que no afectan materialmente las características novedosas esenciales o básicas de la composición o método en consideración.

60 En el contexto de esta invención, se entiende por "piel" las capas que la comprenden, desde la capa superior o estrato córneo hasta la capa inferior o hipodermis, ambas inclusive. Estas capas están compuestas por diferentes tipos de células, como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y/o adipocitos, entre otros. En el contexto de esta invención, el término "piel" incluye el cuero cabelludo.

- 5 El término "tratamiento", como se usa en el contexto de esta especificación cuando no está acompañado por las calificaciones "cosmético, no terapéutico", significa el suministro de un compuesto de acuerdo con la invención para aliviar o eliminar una enfermedad o trastorno o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados con esta enfermedad o trastorno. El término "tratamiento" también cubre la capacidad de aliviar o eliminar las consecuencias fisiológicas de la enfermedad o trastorno.
- 10 Cuando el término "tratamiento" se acompaña de las calificaciones "cosméticas, no terapéuticas", se refieren a la aplicación del compuesto en la piel con el objetivo de mejorar las cualidades cosméticas de la piel, tales como, y sin limitarse a, su nivel de hidratación, elasticidad, firmeza, brillo, tono o textura, entre otros. El término "cuidado" en esta invención se refiere al mantenimiento de las cualidades de la piel e incluye la higiene corporal y/o capilar. Estas cualidades están sujetas a mejoras y se mantienen a través de un tratamiento cosmético y/o cuidado de la piel, tanto en sujetos sanos como en aquellos que presentan enfermedades y/o trastornos de la piel, tales como, por ejemplo, úlceras y lesiones en la piel, psoriasis, dermatitis, acné o rosácea, entre otros.
- 15 El término "prevención", como se usa en esta invención, se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para prevenir, retrasar u obstaculizar la aparición o el desarrollo de una enfermedad o trastorno antes de su aparición.
- 20 En el contexto de esta invención, el término "envejecimiento" se refiere a los cambios experimentados por la piel con la edad (cronometraje) o por la exposición al sol (fotoenvejecimiento) o por agentes ambientales como el humo del tabaco, condiciones climáticas extremas de frío, calor o viento, contaminantes químicos u otros contaminantes, e incluye todos los cambios externos visibles y/o perceptibles a través del tacto, tales como y no solamente restringido a el desarrollo de discontinuidades en la piel como arrugas, líneas finas, surcos, irregularidades o asperezas, aumento del tamaño de los poros, pérdida de elasticidad, pérdida de firmeza, pérdida de suavidad, pérdida de la capacidad de recuperación de la deformación, flacidez de la piel, como las mejillas caídas, entre otros.
- 25 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* para su uso en el aumento del nivel de adiponectina o la estimulación de la cicatrización de heridas. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* para cosmético, el aumento no terapéutico de la actividad mitocondrial en el músculo, el aumento de la resistencia muscular y/o la reepitelización de la piel. En una modalidad, el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo es un aumento del nivel de actividad de ATP y/o de la actividad de la citrato sintasa en el músculo. En otra modalidad, el nivel de adiponectina es el nivel de adiponectina circulante. En otras modalidades, el aumento de la resistencia muscular es un aumento de la resistencia aeróbica. En otra modalidad, el aumento de la resistencia aeróbica es un aumento en la proporción de las fibras Tipo I en el músculo.
- 30 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* para la cosmética, el aumento no terapéutico del nivel de adiponectina en los adipocitos, cosméticos, estimulación no terapéutica de la síntesis del colágeno, y/o la síntesis de ácido hialurónico en la piel cosmético, tratamiento no terapéutico y/o prevención de arrugas de la piel, cosmético, tratamiento cosmético, tratamiento no terapéutico de reafirmación de la piel y/o para el cosmético, prevención no terapéutica de la pérdida de firmeza de la piel.
- 35 En una modalidad, el tratamiento de la piel se lleva a cabo mediante aplicación tópica o transdérmica.
- 40 En otra modalidad, el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo, el aumento de la resistencia muscular, la estimulación de la cicatrización de heridas y/o la reepitelización de la piel son consecuencia del aumento del nivel de adiponectina.
- 45 La cepa de *Bacillus pumilus* es una cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202. Dicha cepa se depositó el 11 de marzo de 2014 en la Colección Coordinada de Microorganismos de Bélgica (BCCM) / Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriëverzameling (LMG) (BCCM / LMG) (Universidad de Gante, KL Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, Bélgica) como institución legalmente reconocida para dicho fin de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos el 28 de abril de 1977.
- 50 El extracto de fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular inferior a 7000 Da y, en una modalidad, inferior a 5000 Da. En otra modalidad, el extracto de fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* no contiene aminas secundarias. En otra modalidad, el extracto de fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* no contiene compuestos fenólicos.
- 55 En otra modalidad, el extracto de fermentación de la cepa de especie *Bacillus pumilus* tiene un tiempo de residencia entre 9 y 20 minutos, entre 10 y 15 minutos en un análisis cromatográfico de por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), con una columna cromatográfica TSKGel G2000SWXL, 5m, 125 Å 7,8 mm x 30 mm (TOSOH Bioscience) y agua con pH 0,1 M = 6,70 + tampón fosfato 0,1 M + sulfato sódico 0,1 M como eluyente.
- 60 En otra modalidad, el extracto se obtiene por fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* en un medio de cultivo adecuado, convencionalmente agitado y aireado para sintetizar y secretar dicho producto al medio de cultivo
- 65

seguido de la purificación posterior. La fermentación para producir el extracto de esta invención puede llevarse a cabo en un medio agitado y aireado a una temperatura entre 10 °C y 40 °C, o entre 20 °C y 35 °C, en un medio con un pH entre 6,5 y 9, o alrededor de 7,0, ajustándolo durante la fermentación si es necesario. La duración de la fermentación es de entre 12 y 120 horas, o entre 24 y 72 horas.

El medio de cultivo en la fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* contiene fuentes de nitrógeno y/o carbono tales como extractos de levadura, extractos de malta y/o peptonas, con concentraciones de cada uno de estos componentes de 0,1 a 20 g/L, o de 0,5 a 10 g/L. El medio de cultivo en la fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* también contiene sales marinas a una concentración entre 5 y 40 g/L, o entre 25 y 35 g/L.

En otra modalidad, el medio de cultivo en la fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus* contiene azúcares exógenos, tales como, entre otros, galactosa, glucosa, manosa, amigdalina, celobiosa, maltosa, almidón, glucógeno, lactosa, mezclas de los mismos y/o extractos que contienen mezclas de estos azúcares pueden usarse como fuente de carbono adicional en el medio de cultivo de fermentación. En una modalidad, se proporciona un suplemento exógeno de glucosa de 0,5 a 40g/L, o de 5 a 25 g/ L al medio de cultivo de fermentación. En otra modalidad, el medio de cultivo de fermentación está libre de fuentes adicionales de nitrógeno o carbono adicionales.

En otra modalidad, además de las sales marinas, también se proporcionan sales minerales adicionales al medio de cultivo de fermentación de la cepa de especies de *Bacillus pumilus*. Estas sales se eligen entre las sales que proporcionan los iones Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, PO₄³⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, F⁻, I⁻, CO₃²⁻, NO₃⁻, citratos u oligoelementos como Cu, Mn, Mo, Fe, Sr, B, Br, Si, Al, Li y Zn.

En otra modalidad, el método de aislamiento y purificación del extracto de fermentación se lleva a cabo mediante los métodos conocidos por el experto en la materia, tales como centrifugación y filtración. En una modalidad, los pasos de centrifugación y filtración se dirigen a separar la cepa de la especie *Bacillus pumilus* del sobrenadante donde se encuentra el extracto de fermentación. La cepa de *Bacillus pumilus* es una cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

Otro aspecto de esta invención se refiere a una composición cosmética o dermofarmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz del extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* y al menos un excipiente y/o ingrediente cosmético y/o dermofarmacéuticamente aceptable. La cepa de *Bacillus pumilus* es una cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202. Dichas composiciones se preparan por los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica ["Harry's Cosmeticology", Séptima edición, (1982), Wilkinson J.B., Moore R.J., ed. Longman House, Essex, GB].

La cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz del extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* en la composición de la invención a administrar, así como su dosis, dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, el estado del paciente, la naturaleza o severidad de la afección o trastorno a tratar y/o cuidar, la ruta y frecuencia de administración y la naturaleza del extracto de fermentación a usar.

Se entiende que "cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz" es una cantidad no tóxica pero suficiente de un ingrediente para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* se usa en concentraciones cosméticas o dermofarmacéuticas para lograr el efecto deseado; es decir, con respecto al peso total de la composición, entre 0,0000000001% (en peso) y 20% (en peso); entre 0,00000001% (en peso) y 10 % (en peso), entre 0,000001% (en peso) y 5 % (en peso) o entre 0,0001 % (en peso) y 5 % (en peso).

En una modalidad, el extracto de fermentación de la invención también puede incorporarse en sistemas de suministro cosmético o dermofarmacéutico y/o sistemas de liberación sostenida.

El término "sistemas de suministro" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, portador o aditivo con el que se administra el extracto de fermentación de la invención. Estos portadores cosméticos o dermofarmacéuticos pueden ser líquidos, como agua, aceites o surfactantes, incluidos los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como y no restringidos a, el aceite de maní, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y el aceite de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitán, sulfatos de éter, sulfatos, betaínas, glucósidos, maltosidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares. Un experto en la materia conoce los diluyentes, adyuvantes o excipientes que pueden usarse en los diferentes sistemas de suministro en los que puede administrarse el compuesto de la invención.

El término "liberación sostenida" se usa en un sentido convencional relacionado con un sistema de suministro de un compuesto que proporciona la liberación gradual de este compuesto durante un período de tiempo. En una modalidad, la liberación gradual proporciona un nivel de liberación del compuesto relativamente constante durante un período de tiempo.

Los ejemplos de sistemas de suministro o liberación sostenida incluyen, sin limitación, liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas y nanopartículas lipídicas sólidas, soportes lipídicos nanoestructurados, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de surfactantes,

micelas mixtas de surfactantes fosfolipídicos, milisferas, microsferas y nanoesferas, lipoesferas, milicápsulas, microcápsulas y nanocápsulas, así como microemulsiones y nanoemulsiones, que pueden añadirse para lograr una mayor penetración del extracto de fermentación de la invención. En una modalidad, los sistemas de suministro o liberación sostenida son liposomas, micelas mixtas de surfactantes fosfolipídicos, microemulsiones, microemulsiones de aceite en agua con una estructura de micelas inversas internas y nanocápsulas que contienen microemulsiones. En una modalidad, los sistemas de suministro o liberación sostenida son liposomas, microemulsiones o liposomas que contienen microemulsiones.

Los sistemas de liberación sostenida pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica anterior, y las composiciones que los contienen pueden administrarse, por ejemplo, por administración tópica o transdérmica, incluyendo parches adhesivos, parches no adhesivos, parches oclusivos y parches microeléctricos, o por administración sistémica, por ejemplo y no restringido a, vía oral o parenteral, incluyendo implantación o inyección nasal, rectal o subcutánea, o implantación o inyección directa en una parte específica del cuerpo. En una modalidad, la liberación proporciona un nivel de liberación del compuesto relativamente constante durante un período de tiempo. La cantidad de extracto de fermentación contenido en el sistema de liberación sostenida dependerá, por ejemplo, de donde se administrará la composición, la cinética y la duración de la liberación del extracto de fermentación de la invención, así como la naturaleza de la condición y/o trastorno a tratar y/o a atender cuidar.

En una modalidad, la composición que contiene el extracto de fermentación de esta invención se adsorbe en polímeros orgánicos sólidos o soportes minerales sólidos, tales como, entre otros, talco, bentonita, sílice, almidón o maltodextrina entre otros.

En una modalidad, la composición que contiene el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* se incorpora en telas, telas no tejidas o dispositivos médicos que están en contacto directo con la piel, liberando así el extracto de fermentación de la invención ya sea por biodegradación del sistema de unión a la tela, tela no tejida o dispositivo médico, o debido a la fricción entre ellos y el cuerpo, debido a la humedad del cuerpo, el pH de la piel o la temperatura corporal. En otra modalidad, el extracto de fermentación de la invención se incorpora en telas y telas no tejidas usadas en la fabricación de prendas que están en contacto directo con el cuerpo. En una modalidad, las telas, telas no tejidas y los dispositivos médicos que contienen el extracto de fermentación de la invención se usan para el tratamiento y/o cuidado de las afecciones y/o trastornos que mejoran o se previenen mediante el aumento de los niveles de adiponectina, el aumento de la actividad mitocondrial, la estimulación de la cicatrización de heridas y/o reepitelización de la piel, o por estimulación de la síntesis de colágeno.

Ejemplos de telas, telas no tejidas, prendas de vestir, dispositivos médicos y medios para inmovilizar los compuestos a ellos, entre los que se encuentran los sistemas de suministro y/o los sistemas de liberación sostenida descritos anteriormente, pueden encontrarse en la literatura y se conocen en el estado del arte [Schaab C.K. (1986) HAPPI mayo de 1986; Nelson G., "Application of microencapsulation in textiles", (2002), Int. J. Pharm., 242(1-2), 55-62; "Biofunctional Textiles and the Skin" (2006) Curr. Probl. Dermatol v.33, Hipler UC y Elsner P., eds. S. Karger AG, Basel, Switzerland; Malcolm R.K. y otros, "Controlled release of a model antibacterial drug from a novel self-lubricating silicone biomaterial", (2004), J. Cont. Release, 97 (2), 313-320]. En una modalidad, las telas, telas no tejidas, prendas de vestir y dispositivos médicos son vendajes, gasas, camisetas, calcetines, medias, ropa interior, fajas, guantes, pañales, toallas sanitarias, vendajes, colchas, toallitas, parches adhesivos, no parches adhesivos, parches oclusivos, parches microeléctricos y/o máscaras faciales.

Las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas que contienen el extracto de fermentación de esta invención pueden usarse en diferentes tipos de composiciones de aplicación tópica o transdérmica, que incluyen opcionalmente excipientes cosméticamente y/o dermofarmacéuticamente aceptables necesarios para formular la forma de administración deseada.

En una modalidad, las composiciones de aplicación tópica o transdérmica se producen en cualquier formulación sólida, líquida o semisólida, tal como y sin restricción, cremas, emulsiones múltiples tales como y sin restricción, emulsiones de aceite y/o silicona en agua, emulsiones de aceite en agua y/o silicona, emulsiones de tipo agua/aceite/agua o agua/silicona/agua y emulsiones de tipo aceite/agua/aceite o silicona/agua/silicona, cristales líquidos, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, geles en crema, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, jabones, champús, acondicionadores, sueros, películas de polisacáridos, pomadas, espumas, pomadas, polvos, barras, lápices y aerosoles o aerosoles (aerosoles), incluidas las formulaciones para dejar y enjuagar. En otra modalidad, estas formulaciones de aplicación tópica o transdérmica se incorporan usando técnicas conocidas por la persona experta en la técnica en diferentes tipos de accesorios sólidos tales como vendajes, gasas, camisetas, calcetines, medias, ropa interior, fajas, guantes, pañales, toallas sanitarias, apósitos, colchas, toallitas, parches adhesivos, parches no adhesivos, parches oclusivos, parches microeléctricos o máscaras faciales, o se incorporan a diferentes productos de maquillaje, como bases de maquillaje, como bases fluidas y bases compactas, lociones desmaquillantes, leches desmaquillantes, correctores debajo de los ojos, sombras de ojos, lápices labiales, protectores labiales, brillo labial y polvos, entre otros.

En otra modalidad, la composición cosmética o dermofarmacéutica de la invención incluye agentes que aumentan la absorción percutánea del extracto de fermentación de esta invención, por ejemplo, y no se limitan a, dimetilsulfóxido,

dimetilacetamida, dimetilformamida, surfactantes, azona (1-dodecilazacloheptano-2 -onea), alcohol, urea, etoxidiglicol, acetona, propilenglicol o polietilenglicol, entre otros. En otra modalidad, la composición cosmética o dermofarmacéutica de esta invención se aplica en áreas locales a tratar por medio de iontoforesis, sonoforesis, electroporación, parches microeléctricos, presión mecánica, gradiente de presión osmótica, cura oclusiva, microinyecciones o inyecciones sin aguja por medios de presión, tal como inyecciones por presión de oxígeno, o cualquier combinación de las mismas, para lograr una mayor penetración del extracto de fermentación de la invención. El área de aplicación se determinará por la naturaleza de la afección y/o trastorno a tratar y/o su cuidado.

Entre los excipientes y/o ingredientes cosméticamente o dermofarmacéuticamente aceptables contenidos en las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas descritas en esta invención, se encuentran ingredientes adicionales comúnmente usados en las composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas tales como, y no restringidos a, otros agentes que aumentan el nivel de adiponectina en los adipocitos, otros agentes que aumentan la actividad mitocondrial, otros agentes que aumentan el nivel de ATP en el músculo, otros agentes que estimulan la curación, otros agentes de curación coadyuvantes, otros agentes que estimulan la reepitelización, otros agentes de reepitelización coadyuvante, agentes que reducen el contenido de triglicéridos de los adipocitos, agentes que retrasan la diferenciación de adipocitos, agentes que reducen la cantidad de nocturnina, agentes que inhiben la expresión de nocturnina, agentes lipolíticos o agentes que estimulan la lipólisis, agentes venotónicos, agentes moduladores de la expresión de PGC-1 α expresión, agentes que inhiben la actividad de PPAR γ , agentes anticelulíticos, agentes que disminuyen la producción de sebo, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o capaces de inhibir o prevenir su degradación, agentes estimulantes de la síntesis de colágeno, agentes estimulantes de la síntesis de elastina, agentes estimulantes de la síntesis de decorina , agentes estimuladores de la síntesis de laminina, agentes estimulantes de la síntesis de defensina, agentes estimulantes de la síntesis de chaperonas, agentes estimuladores de la síntesis de cAMP, agentes que modulan AQP-3, agentes que modulan la síntesis de aquaporina, proteínas de la familia de las aquaporinas, agentes estimulantes de la síntesis de ácido hialurónico , agentes estimuladores de la síntesis de glicosaminoglicanos, agentes estimulantes de la síntesis de fibronectina, agentes estimulantes de la síntesis de sirtuina, proteínas de choque térmico, agentes estimulantes de la síntesis de proteínas de choque térmico, agentes que inhiben la exocitosis neuronal, agentes anticolinérgicos, agentes que inhiben la contracción muscular, agentes antienvjecimiento , agentes antiarrugas, agentes antitranspirantes, agentes antiinflamatorios y/o analgésicos, agentes antiprurito, agentes calmantes, agentes anestésicos, inhibidores de los grupos de receptores de acetilcolina, agentes que inhiben la acetilcolinesterasa, agentes relajantes de la piel, agentes estimulantes o inhibidores de la síntesis de melanina, agentes aclarantes o despigmentantes, agentes de propagación agentes curtientes, agentes inhibidores de la NO-sintasa, 5 α agentes inhibidores de la reductasa, agentes inhibidores de la lisil y/o prolil hidroxilasa, antioxidantes, captadores de radicales libres y/o agentes contra la contaminación atmosférica, captadores reactivos de especies de carbonilo, agentes antiglicación, agentes antihistamínicos, agentes antivirales, agentes antiparasitarios, emulsificantes, emolientes, solventes orgánicos, propelentes líquidos, acondicionadores de la piel, humectantes, sustancias que retienen la humedad, ácidos hidroxil alfa hidroxil, beta hidroxilácidos, humectantes, enzimas hidrolíticas epidérmicas, vitaminas, aminoácidos, proteínas, pigmentos o colorantes, colorantes, biopolímeros, polímeros gelificantes, espesantes, surfactantes, agentes suavizantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes capaces de reducir o tratar las bolsas debajo de los ojos, agentes exfoliantes , agentes queratolíticos, agentes descamadores, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, agentes fungistáticos, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes que estimulan la síntesis de componentes del estrato córneo, ceramidas, ácidos grasos, agentes que inhiben la degradación del colágeno, agentes que inhiben las metaloproteinasas de la matriz, agentes que inhiben la degradación de la elastina, agentes que inhiben la serina proteasas tales como calicreínas, elastasa de leucocitos o catepsina G, agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos, agentes que estimulan la proliferación de queratinocitos, agentes que estimulan la proliferación de melanocitos, agentes que estimulan la diferenciación de queratinocitos, agentes antihiperqueratosis, agentes comedolíticos, agentes antipsoriasis, agentes de reparación del ADN, agentes protectores del ADN, agentes protectores del ADN agentes protectores de células madre, estabilizadores, agentes para el tratamiento y/o cuidado de la piel sensible, agentes reafirmantes, agentes antiestrías, agentes astringentes, agentes que inhiben la actividad de PAR-2, citocinas, factores de crecimiento, agentes que actúan sobre la circulación capilar y/o microcirculación, agentes que estimulan la angiogénesis, agentes que inhiben la permeabilidad vascular, agentes que actúan sobre el metabolismo celular, agentes para mejorar la unión dérmica-epidérmica, agentes que inducen el crecimiento del cabello, agentes inhibidores o retardadores del crecimiento del cabello, agentes retardadores de la pérdida del cabello, conservantes, perfumes, desodorantes cosméticos y/o absorbentes y/o para enmascarar olores corporales, agentes quelantes, extractos vegetales, aceites esenciales, extractos marinos, agentes obtenidos de un proceso biotecnológico, sales minerales, extractos celulares, protectores solares y agentes fotoprotectores orgánicos o minerales activos contra los rayos ultravioleta A y/o B y/o rayos infrarrojos A, o mezclas de los mismos, siempre que sean física y químicamente compatibles con el resto de componentes de la composición y con el extracto de fermentación producido por una cepa de especies de *Bacillus pumilus* . Asimismo, la naturaleza de estos ingredientes adicionales no debería alterar inaceptablemente los beneficios del extracto de fermentación de esta invención. La naturaleza de estos ingredientes adicionales puede ser sintética o natural, como extractos de plantas, o proceder de un procedimiento biotecnológico, o de una combinación de un procedimiento sintético y un procedimiento biotecnológico. Pueden encontrarse ejemplos adicionales en CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary & Handbook, 12va Edición (2008). En el contexto de esta invención, se entiende por procedimiento biotecnológico cualquier procedimiento para producir el ingrediente activo, o parte de él, en un organismo, o en parte.

En una modalidad, el agente que reduce el contenido de triglicéridos de los adipocitos, agente que retrasa la diferenciación de adipocitos, agente anticelulítico, agente lipolítico, agente venotónico, agente inhibidor de PGC-1 α expresión o agente que inhibe la actividad de PPAR γ se elige, por ejemplo, y no se limita a, extractos o extractos hidrolizados de *Alchemilla vulgaris*, *Angelica sinensis*, *Armeniacea sp.*, *Arnica montana L.*, *Atractylodis platycodon*,
5 bamboo, *Betula alba*, *Bupleurum chinensis*, *Calendula officinalis*, cangzhu, *Cecropia obtusifolia*, *Celosia cristata*,
Centella asiatica, *Chenopodium quinoa*, *Chrysanthellum indicum*, *Cimifuga racemosa*, *Citrus aurantium amara*, *Cnicus benedictus*,
Coffea arabica, *Cola nipida*, *Coleus barbatus*, *Coleus blumei*, *Coleus esquirolii*, *Coleus forskohlii*, *Coleus scutellaroides*,
Coleus sp., *Coleus xanthantus*, *Commiphora myrrha*, *Crithmum maritimum*, *Cuminum cyminum*,
10 *Dioscorea colettii*, *Dioscorea villosa*, *Eugenia caryophyllus*, *Filipendula ulmaria L.*, *Foeniculum vulgare*, *Fucus vesiculosus*,
Gelidium Cartilagineum, *Ginkgo biloba*, ginkgo biloba, *Glycine max*, *Glycyrrhiza glabra*, *Hedera helix* (ivy extract),
Hibiscus sabdariffa, *Hordeum vulgare*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Ilex paraguariensis*, *Kigelia africana*,
Laminaria digitata, *Lupinus perennis*, *Nelumbium speciosum*, *Orthosiphon stamineus benth*, *Panax ginseng*,
Paullinia cupana, *Peumus boldus*, *Phyllacantha fibrosa*, *Piper methysticum*, *Piper nigrum*, *Prunella vulgaris*, *Prunus amygdalus dulcis*,
15 *Rosmarinus officinalis*, *Rubus idaeus*, *Ruscus aculeatus* (extract of Butcher's broom), *Salvia officinalis L.*, *Sambucus nigra*,
Serenoa repens, *Smilax aristolochiaefolia*, *Spirulina platensis algae*, *Taraxacum erythrospermum*, *Taraxacum officinale*,
green tea, *Ulmus rubra*, *Uncaria tomentosa*, *Verbena officinalis*, *Vitex agnus-castus*, *Dysmorphococcus globosus*, entre otros, alverina citrato de alverina, dihidromiricetina, coenzima A, lipasa, cerulenina, rutina, glaucina, esculina, visnadina, cafeína, teofilina, teobromina, aminofilina, xantina, carnitina, forskolina, escina, ruscogenina, hederina, yoduro de trietanolamina, agentes de inducción de síntesis de AMPc,
20 Lanachrys® [INCI: Extracto de Chrysanthellum Indicum] comercializado por Atrium/Unipex, Slim-Excess™ [INCI: Agua, Butilenglicol, Cloruro de sodio, Hidrolizado de Carragenano, Goma Xantana], Sveltine™ [INCI: Agua, Butilenglicol, Carnitina, Lecitina, Cafeína, Carbómero, Ácido Salicílico, Atelocolágeno, Extracto de Centella Asiatica, Esculina, Condroitín Sulfato de Sodio], Extracto de Liana de Perú [INCI: Extracto de Uncaria Tomentosa] o Flavenger™ [INCI: Triglicérido Caprílico/Cáprico, Dimetil Sililato de Sílice, Oleato de Glicerilo, Quercetina Caprilato]
25 comercializado por BASF, Scoparlane [INCI: Sphacelaria Scoparia], Phyco R75 [INCI: Laminaria Digitata], Pheoslim [INCI: Extracto de *Phyllacantha Fibrosa*] Buckwheat Wax [INCI: Polygonum fagopyrum] Actiporina 8.G [Glicerina, Agua, extracto de Jania rubens] comercializado por Codif, Factor adelgazante Karkade™ [INCI: Hibiscus Sabdariffa] comercializado por Cosmetochem, Liposuctionina [INCI propuesto: Acetil Hexapéptido] comercializado por Infinitec Activos Xantalgosil C® [INCI: Manuronato de Metilsilanol Acefilina], Teofillililane C® [INCI: Alginato de Metilsilanol Carboximetil Teofilina], Glutrapeptide® [INCI: Piirrolglutamilamidoetil Indol] o Cafeisilano C [INCI: Siloxanetriol Alginato, Cafeína, Butilenglicol] comercializado por Exsymol, Timiline® [INCI: Ácido poliglucurónico] comercializado por Greentech, Visnadine [INCI: Visnadín] o Fitosoma de Flavonoides Diméricos de Ginkgo Biloba [INCI: Fosfolípidos, Extracto de Hoja de Ginkgo Biloba] comercializado por Indena, Slimfit® LS 9509 [INCI: Extracto de Corteza de Cecropia Obtusifolia] comercializado por Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF, Silusine™ [INCI: Aceite de Soja (Glycine soja), Sesquioleato de Sorbitán, Isohexadecano, Hialuronato de Sodio, Laurildimónio Hidroxipropil Proteína de Soja Hidrolizada, Acetil Hexapéptido-39] o Liporeductyl® [INCI: Agua, Glicerina, Lecitina, Cafeína, Extracto de Raíz de Butcherbroom (*Ruscus Aculeatus*), Maltodextrina, Sílice, Té-Hidroyoduro, Propilenglicol, Extracto de Hiedra (*Hedera Helix*), Carnitina, Escina, Tripéptido-1, Goma Xantana, Carragenano (*Chondrus Crispus*), EDTA disódico] comercializado por Lipotec/Lubrizol, Complejo Iso-Slim [INCI: Isoflavonas de soja, Cafeína, Carnitina, Extracto de Spirulina Platensis, Polisorbato 80, Alcohol, Fenoxietanol, Agua], Happybelle-PE [INCI: Lecitina, Extracto de Vitex Agnus Castus, Glicerina, Ascorbil Tetraisopalmitato, Tocoferol, Triglicérido Caprílico/Cáprico, Ciclodextrina, Alcohol, Agua] o AmaraShape [INCI: Lecitina, Cafeína, Extracto de Citrus Aurantium Amara, Pentilenglicol, Alcohol, Agua] comercializado por Mibelle Biochemistry, Regu®-Slim [INCI: Maltodextrina, Cafeína, Extracto de Semilla de Paullinia Cupana, Carnitina, Celulosa Microcristalina, Ácido Cisteico, Sulfonato de Panteína o Regu®-Shape [INCI: Ácido Linoleico Isomerizado, Lecitina, Glicerina, Polisorbato 80] comercializado por Pentapharm/DSM Provislim™ [INCI: Propanodiol, Agua (Aqua), Fisetina, Cetona de frambuesa], Miricelina [INCI: Dihidromiricetina] o Drenalip [INCI: Extracto de Raíz de *Aculeatus Ruscus*, Extracto de Citrus Medica Limonum Peel, Extracto de Solidago Virgaurea, Extracto de Raíz Membranosa *Astragalus*] comercializado por Provital, Actisculpt [INCI: Extracto de Cominfora Mirra, Extracto de Raíz de *Coleus Forskohlii*] comercializado por Givaudan, Perfeline® [INCI: Agua, Carnitina, Cafeína, Extracto de *Ruscus Aculeatus* o CellActive® Shape [INCI: Fermento de la proteína de *Clorella Vulgaris*/Lupinus Albus, *Coleus Forskohlii*, cafeína] comercializado por Rahn, ProContour™ [INCI: Agua, Alcohol, Lecitina, Cafeína, Carnitina, Extracto de Hoja de Centella Asiatica, Fosfato de Potasio, Extracto de Raíz de *Coleus Forskohlii*] comercializado por Rovi Cosmetics, Unislim™ [INCI: *Ilex Paraguariensis* (extracto de hoja), Agua, Butilenglicol, *Coffea Arabica* (café), Extracto de Semilla (Frijol), Glicéridos de almendra PEG-60, Glicerina, Cetil Hidroxietilcelulosa], Redulite™ [INCI: Glicerina, Agua, Etoxidiglicol, *Sambucus Nigra*, Poliacrilato de sodio], Pleurimincyl™ [INCI: Cafeína, extracto de *Bupleurum Chinensis*], Phytototal™ SL [INCI: Glicerina, Extracto de *Verbena Officinalis*, Butilenglicol, Extracto de flor de *Sambucus Nigra*, Extracto de flor de *Eugenia Caryophyllus* (clavo), Lecitina], Phytosonic™ [INCI: Agua, Extracto de *Euglena Gracilis*, Cafeína, Extracto de hojas de *Glaucium Flavum*], Ovaliss™ [INCI: Alicerina, Agua, Coco-Glucósido, Caprylyl Glicol, Alcohol, Glaucina] Lipocare™ [INCI: Cafeína, Coenzima A, Extracto de *Bupleurum Chinensis*], Cyclolipase™ [INCI: Polimetacrilato de Glicerilo, Agua, Cafeína, Lipasa, Fosfato de Adenosina], Coaxel™ [INCI: Cafeína, Coenzima A, Carnitina, Agua, Glicerina] Bodyfit™ [INCI: Glicerina, Agua (Aqua), Coco-Glucósido, Caprililglicol, Alcohol, Glaucina] o Vexel [INCI: Agua, Propilenglicol, Lecitina, Cafeína, Palmitoil Carnitina] producidos por Sederma/Croda, Voluform [INCI: Palmitoil Isoleucina], Adipoless [INCI: Butilenglicol, Extracto de Semilla de *Chenopodium Quinoa*] producidas por Seppic, Slimactive® [INCI: Leaf Extracto de hojas de *Peumus Boldus*] Remoduline® [INCI: Extracto de flor de Citrus Aurantium Amara] Pro-Sveltyl [INCI: Extracto de la Especie *Nelumbium*] Biosculptine® [INCI: Extracto Hidrolizado de la flor/semilla de *Celosia Cristata*, Extracto Hidrolizado de *Prunella*

Vulgaris] Affiness® [INCI: Extracto Hidrolizado de Fruta de Coriandrum Sativum, Extracto de Fruta Citrico Dulce (Naranja)] o Stemsvelt [INCI: Agua, Butilenglicol, Extracto de Silybum marinum] Delipidol [INCI: Punicato de Tiroсило], Guaraslim® [INCI: Butilenglicol, Agua, Cafeína, Extracto de Semilla de Paullinia Cupana, Extracto de Corteza de Ptychopetalum Olacoides] o Caobromine® [INCI: Extracto de Cáscara de Theobroma Cacao] comercializado por Solabia, Abdoliance [INCI: Palmitato de Sacarosa, Polisorbato 20, Linolenato de Glicerilo, Extracto de Semilla de Paullinia Cupana, Maltodextrina, Aceite de Prunus Amygdalus Dulcis (Almendra Dulce), Lecitina, Agua, Extracto de Cáscara de Cítricos Aurantium Amara (Naranja Amarga), Fenoxietanol, Tocoferol], Betafrolina [INCI: Extracto de Semilla de Tephrosia Purpurea] o PRO-DG [INCI: Agua, Extracto de Plancton] comercializado por Soliance, UCPeptide™ V [INCI: Agua, Butilenglicol, Pentapéptido] o ATPeptide™ IS [INCI: Tripéptido-3] comercializado por Vincience/ISP entre otros, o mezclas de los mismos.

En una modalidad, el agente reafirmante y/o redensificante y/o reestructurante se elige, por ejemplo y no se limita a, del grupo formado por extractos de *Malpighia punicitolia*, *Cynara scolymus*, *Gossypium herbaceum*, *Aloe Barbadosensis*, *Panicum miliaceum*, *Morus nigra*, *Sesamum indicum*, *Glycine soja*, *Triticum vulgare*, Pronalen® Refirming HSC [INCI: Triticum Vulgare, Silybum Marianum, Glycine soja, Equisetum Arvense, Alchemilla Vulgaris, Medicago Sativa, Raphanus Sativus] o Polyplant® Refirming [INCI: INCI: Flor cónica, Centella Asiatica, Fucus, Fenogreco] comercializado por Provital, Lanablue® [INCI: Sorbitol, Extracto de Algas] comercializado por Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations, Pepha®-Nutrix [INCI: Factor de Nutrición Natural] comercializado por Pentapharm/DSM, extractos de plantas que contienen isoflavonas, Biopéptido EL™ [INCI: Palmitoil Oligopéptido], Biopéptido CL™ [INCI: Palmitoil Oligopéptido], Vexel® [INCI: Agua (Aqua), Propilenglicol, Lecitina, Cafeína, Palmitoil Carnitina], Matrixyl® [INCI: Palmitoil Pentapéptido-3], Matrixyl® 3000 [INCI: Palmitoil Tetrapéptido-3, Palmitoil Oligopéptido] o Bio-Bustyl™ [INCI: Polimetacrilato de Glicerilo, Fermento de la proteína de Soja Rahnella, Agua (Aqua), Propilenglicol, Glicerina, PEG-8, Palmitoil Oligopéptido] comercializado por Sederma / Croda, Dermosacarides® HC [INCI: Glicerina, Agua (Aqua), Glicosaminoglicanos, Glicógeno], Aglycal® [INCI: Manitol, Ciclodextrina, Glicógeno, Extracto de la hoja de Aratostaphylos Uva Ursi], Cytokinol® LS [INCI : Hidrolizado de Caseína, Hidrolizado de Proteína de Levadura, Lisina HCl] o Firmiderm® LS9120 [INCI: Extracto de Hoja de Terminalia Catappa, Extracto de Flor de Sambucus Negra, PVP, Acido Tánico] comercializado por Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF, Lifline® [INCI: Proteína de Trigo Hidrolizada], Raffermine® [INCI: Harina de Soja Hidrolizada] o Ridulisse C® [Proteína de Soja Hidrolizada] comercializado por Silab, Serilesine® [INCI: Hexapéptido-10], Decorinyl™ [INCI: Tripéptido-10 Citrulina], Trylagen® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas, Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-10 Citrulina, Tripéptido-1], Silusyne™ [INCI: Aceite de Soja (Glycine soja), Sesquioleato de Sorbitán, Isohexadecano, Hialuronato de Sodio, Laurildimonio Hidroxipropil Proteína de Soja Hidrolizada, Acetil Hexapéptido-39], Uplevity™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-2] o Adifyline™ [INCI: Acetil Hexapéptido-38] comercializado por Lipotec/Lubrizon, Ursolisome® [INCI: Lecitina, Ácido Ursólico, Atelocolágeno, Goma Xantana, Sulfato de Condroitina de Sodio] o Collalift® [INCI: Extracto de Malta Hidrolizada] comercializado por Coletica/Engelhard/BASF, Syn®-Coll [INCI: Palmitoil Tripéptido-5] comercializado por Pentapharm/DSM, Hydriame® [INCI: Agua (Aqua), Glicosaminoglicanos, Goma de Esclerocio] comercializado por Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations o IP2000 [INCI: Dextrano, Trifluoroacetil Tripéptido-2] comercializado por Institut Europeen de Biologie Cellulaire/Unipex Innovations, entre otros.

En una modalidad, el agente que estimula la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas se selecciona, por ejemplo y no se limita a, del grupo formado por agentes estimulantes de la síntesis de colágeno, agentes estimulantes de la síntesis de elastina, agentes estimulantes de la síntesis de decorina, agentes estimulantes de síntesis de laminina, agentes estimulantes de la síntesis de chaperonas, agentes estimulantes de la síntesis de sirtuina, agentes activadores de sirtuina, agentes moduladores de la síntesis de aquaporina, agente estimulante de la síntesis de fibronectina, agentes que inhiben la degradación del colágeno, agentes que inhiben la degradación de la elastina, agentes que inhiben las serina proteasas como calicreínas, elastasa de leucocitos o catepsina G, agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos, y agentes de reparación de ADN y/o agentes protectores de ADN, tales como, y no solo restringidos a estos, extractos de *Centella asiatica*, *Saccharomyces cervisiae*, *Solanum tuberosum*, *Rosmarinus officinalis*, *Vaccinium angustifolium*, extracto de algas *Macrocystis pyrifera*, *Padina pavonica*, extracto de soja, malta, lino, salvia, trébol rojo, kakkon, plantas de lupino blanco, extracto de avellana, extracto de maíz, extracto de levadura, extractos de brotes de haya, extracto de semilla leguminosa, extracto de hormona vegetal como giberelinas, auxinas o citoquininas, entre otros, o extracto de zooplancton Salina, el producto de fermentación de la leche con *Lactobacillus Bulgaricus*, asiaticosidos y sus derivados, vitamina C y sus derivados, ácido cinámico y sus derivados, Matrixyl® [INCI: Palmitoil Pentapéptido-3], Matrixyl® 3000 [INCI: Palmitoil Tetrapéptido-3, Palmitoil Oligopéptido] o Biopeptido CL™ [INCI: Polimetacrilato de Glicerilo, Propilenglicol, Palmitoil Oligopéptido] comercializado por Sederma/Croda, Antarcticine® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas], Decorinyl® [INCI: Tripéptido-10 Citrulina, Serilesine® [INCI: Hexapéptido-10], Lipéptido [INCI: Hidrolizado de Proteína Vegetal], Aldenine® [INCI: Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-1], Relistase™ [INCI: Acetilarginiltriptofil Difencilglicina], Thermostressine™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-22], Péptido AC29 [INCI: Acetil Tripéptido-30 Citrulina], Diffuporine™ [INCI: Acetil Hexapéptido-37], Silusyne™ [INCI: Aceite de Soja (Glycine soja), Sesquioleato de Sorbitán, Isohexadecano, Hialuronato de sodio, Laurildimonio Hidroxipropil Proteína de Soja Hidrolizada, Acetil Hexapéptido-39], Uplevity™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-2] o Adifyline™ [INCI: Acetil Hexapéptido-38] comercializado por Lipotec/Lubrizon, Drieline® PF [INCI: Betaglucano de levadura] comercializado por Alban Muller, Phytovityl C® [INCI: Agua, Extracto de Zea Mays] comercializado por Solabia, Collalift® [INCI: Extracto de Malta Hidrolizada] comercializado por Coletica/Engelhard/BASF, Phytocohesine PSP™ [INCI: Sulfato Sódico de Beta-

Sitosterol] comercializado por Vincience/ ISP/Ashland, minerales como calcio, entre otros, retinoides y sus derivados, isoflavonoides, carotenoides, en particular licopeno, pseudodipéptidos, retinoides y sus derivados como retinol o palmitato de retinilo, entre otros, o heparinoides, entre otros.

- 5 En una modalidad, el agente antiarrugas y/o antienvjecimiento se selecciona, por ejemplo, y no se limita al grupo formado por los extractos o extractos hidrolizados de *Vitis vinifera*, *Rosa canina*, *Curcuma longa*, *Theobroma cacao*, *Ginkgo biloba*, *Leontopodium alpinum* o *Dunaliella salina* entre otros, Matrixyl® [INCI: Palmitoil Pentapéptido-4], Matrixyl® 3000® [INCI: Palmitoil Tetrapéptido-7, Palmitoil Oligopéptido], Matrixyl® Synthe'6™ [INCI: Glicerina, Agua, Hidroxipropilciclodextrina, Palmitoil Tripéptido-38], Essenskin™ [INCI: hidroximetionina cálcica], Renovage [INCI: teprenona], Resistem™ [INCI: Fermento de *Globularia Cordifolia*] o Dermaxyl® [INCI: Palmitoil Oligopéptido] comercializado por Sederma/Croda, Vialox® [INCI: Pentapéptido-3], Syn® Ake® [INCI: Dipéptido Diaminobutiroil Bencilamida Diacetato], Syn®-Coll [INCI: Palmitoil Tripéptido-5], Phytaluronate [INCI: Goma de Algarrobo (*Ceratonía siliqua*)] o Preregen® [INCI: Proteína de *Glycine soja* (*soja*), Oxido Reductasas] comercializado por Pentaphar m/DSM, Myoxinol™ [INCI: Extracto Hidrolizado de *Hibiscus esculentus*], Syniorage™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-11], Dermican™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-9] o DN AGE™ LS [INCI: extracto de hoja de *Cassia alata*] comercializado por Laboratoires Sérobiologiques/Cognis/BASF, Algisum C® [INCI: Manuronato de Metilsilanol] o Hydroxyprosililane CN® [INCI: Aspartato de Metilsilanol Hidroxiprolina] comercializado por Exsymol, Argireline® [INCI: Acetil Hexapéptido-8], SNAP-7 [Acetil Heptapéptido-4], SNAP-8 [INCI: Acetil Octapéptido-3], Leuphasyl® [INCI: Pentapéptido-18], Inyline™ [INCI: Acetil Hexapéptido-30], Aldenine® [INCI: Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-1], Preventhelia™ [INCI: Diaminopropionoil Tripéptido-33], Decorinyl® [INCI: Tripéptido-10 Citrulina], Decorinol® [INCI: Tripéptido-9 Citrulina], Trylagen® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas, Trigo Hidrolizado Proteína, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-10 Citrulina, Tripéptido-1], Eyeseryl® [INCI: Acetil Tetrapéptido-5], péptido AC29 [INCI: Acetil Tripéptido-30 Citrulina], Relistase™ [INCI: Acetilarginiltriptofil Difenilglicina], Thermostressine® [INCI: Acetil Tetrapéptido-22], Lipochroman™ [INCI: Dimetilmetoxi Cromanol], Chromabright™ [INCI: Palmitato de Dimetilmetoxi Cromanilo], Antarcticine® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas], dGlyage™ [INCI: Lisina HCl, Lecitina, Tripéptido-9 Citrulina], Vilastene™ [INCI: Lisina HCl, Lecitina, Tripéptido-10 Citrulina], Hyadisine™ [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas], Hyanify™ [INCI: Isomerato de sacárido], Diffuporine™ [INCI: Acetil Hexapéptido-37], Silusyne™ [INCI: Aceite de soja (*Glycine soja*), Sesquieoato de Sorbitán, Isohexadecano, Hialuronato de sodio, Laurildimonio Hidroxipropil Proteína de Soja Hidrolizada, Acetil Hexapéptido-39], Adifyline™ [INCI: Acetil Hexapéptido-38], Uplevity™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-2] o Juvefoxo™ [INCI: Acetil Hexapéptido-51 amida] comercializado por Lipotec/Lubrizol, Kollaren® [INCI: tripéptido-1, Dextrano] comercializado por Institut Europeen de Biologie Cellulaire, Collaxyl® IS [INCI: hexapéptido-9], Laminixyl IS™ [INCI: heptapéptido], Orsirtine™ GL [INCI: Extracto de *Oryza sativa* (arroz)], D'Orientine™ IS [INCI: Extracto de Semilla de *Phoenix dactylifera* (Dátil)], Phytoquintescine™ [INCI: Extracto de Einkorn (*Triticum monococcum*)] o Quintescine™ IS [INCI: dipéptido-4] comercializado por Vincience/ISP/Ashland, BONT-L-péptido [INCI: Palmitoil Hexapéptido-19] comercializado por Infinitec Activos, Deepaline™ PVB [INCI: Palmitoil Proteína de Trigo Hidrolizada] o Sepilift® DPHP [INCI: Dipalmitoil Hidroxiprolina] comercializado por Seppic, Gatuline® Expression [INCI: Extracto de *Acmella oleracea*], Gatuline® In-Tense [INCI: Extracto de Flor de *Spilanthes acmella*] o Gatuline® Age Defense 2 [INCI: Extracto de Semilla de *Juglans regia* (Nuez)] comercializado por Gattefosse, Thalassine™ [INCI: Extracto de Algas] comercializado por Biotechmarine, Chronoline™ [INCI: Caprooil Tetrapéptido-3] o Thymulen-4 [INCI: Acetil Tetrapéptido-2] comercializado por Atrium/Unipex Innovations, EquiStat [INCI: Extracto de Fruta de *Pyrus malus*, Extracto de Semilla de *Glycine soja*] o Juvenesce [INCI: Etoxidiglicol y Triglicérido Caprílico, retinol, ácido ursólico, fitonadiona, ilomastato] comercializado por Coletica/Engelhard/BASF, Ameliox [INCI: Carnosina, Tocoferol, Extracto de Fruta de *Silybum marianum*] o PhytoCellTec Malus Domestica [INCI: Cultivo Celular de la Fruta de *Malus domestica*] comercializado por Mibelle Biochemistry, Bioxlift [INCI: Extracto de *Pimpinella anisum*] o SMS Anti-Wrinkle® [INCI: Extracto de Semilla de *Annona squamosa*] comercializado por Silab, antagonistas del canal Ca²⁺ como y no restringido a sales de alverina, manganeso o magnesio, ciertas aminas secundarias o terciarias, retinol y sus derivados, idebenona y sus derivados, coenzima Q10 y sus derivados, ácido boswélico y sus derivados, GHK y sus derivados y/o sales, carnosina y sus derivados, enzimas de reparación de ADN tales como, entre otras, fotoliasa o endonucleasa V T4, o agonistas de canales de cloruro, entre otros, y/o mezclas de los mismos.

- En una modalidad, el agente que estimula la curación, el agente de curación coadyuvante, el agente que estimula la reepitelización, el agente de reepitelización coadyuvante, se selecciona, por ejemplo y no se limita a, del grupo formado por extractos o extractos hidrolizados de *Aristolochia clematis*, *Centella asiatica*, *Rosa moschata*, *Echinacea angustifolia*, *Symphytum officinal*, *Equisetum arvense*, *Hypericum perforatum*, *Mimosa tenuiflora*, *Persea gratissima*, *Prunus africanum*, *Tormentilla erecta*, *Aloe vera*, Polyplant® Epithelizing [INCI: Calendula officinalis, Hypericum perforatum, Chamomalus recutita, Chamomarrus recutita] LS 9028 [INCI: Caseína hidrolizada, Proteína de levadura hidrolizada, Lisina HCl] comercializado por Laboratoires Sérobiologiques/Cognis o Deliner® [INCI: Extracto de grano de *Zea mays* (maíz)] comercializado por Coletica/Engelhard, alantoína, cadherinas, integrinas, selectinas, receptores de ácido hialurónico, inmunoglobulinas, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento del tejido conectivo, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento del endotelio vascular, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de estimulación de colonias, factor de crecimiento transformante beta, factor de necrosis tumoral alfa, interferones, interleucinas, metaloproteinasas de matriz, receptores de la proteína tirosina fosfatasa, Antarcticine® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas], Bodyfensine® [INCI: Acetil Dipéptido-3 Amino hexanoato] o Decorinyl™ [INCI: Tripéptido-10 Citrulina], Trylagen® [INCI: Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas, Hidrolizado Proteína

de soja, tripéptido 10 citrulina, tripéptido-1], Xpertmoist™ [INCI: Glicerina, Extracto de fermentación de Pseudoalteromonas, Goma Xantana, prolina, alanina, serina, etilhexilglicerina, caprililglicol], Serilesine® [INCI: Hexapéptido-10], Delisens™ [INCI: Acetil Hexapéptido-49] o Thermostressine™ [INCI: Acetil Tetrapéptido-22], comercializado por Lipotec/Lubrizol, entre otros, y/o mezclas de los mismos.

5

Aplicaciones

También se describe el uso del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* en la preparación de composiciones cosméticas o dermofarmacéuticas para aumentar los niveles de adiponectina, aumentar la actividad mitocondrial en el músculo, aumentar la resistencia muscular, estimular la cicatrización de heridas y/o la reepitelización de piel, síntesis estimulante de colágeno y/o síntesis de ácido hialurónico, tratamiento y/o prevención del envejecimiento cutáneo, tratamiento y/o prevención de arrugas de la piel, tratamiento de reafirmación de la piel y/o prevención de pérdida de firmeza de la piel. En una modalidad, el nivel de adiponectina es el nivel de adiponectina circulante. En otra modalidad, el nivel de adiponectina es el nivel de adiponectina en los adipocitos. En una modalidad, el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo es un aumento del nivel de actividad de ATP y/o de la actividad de la citrato sintasa en el músculo. En otras modalidades, el aumento de la resistencia muscular es un aumento de la resistencia aeróbica. En otra modalidad, el aumento de la resistencia aeróbica es un aumento en la proporción de fibras de Tipo I en el músculo. La cepa de *Bacillus pumilus* es una cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

20

Un aspecto adicional de esta invención se refiere a un método no terapéutico para aumentar la actividad mitocondrial en el músculo, aumentar la resistencia muscular, estimular la reepitelización de la piel, estimular la síntesis de colágeno y/o la síntesis de ácido hialurónico, el tratamiento y/o la prevención del envejecimiento de la piel, el tratamiento y/o la prevención de arrugas de la piel, el tratamiento de reafirmación de la piel y/o la prevención de pérdida de firmeza de la piel que comprende la administración de una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus*. También se describe un método para aumentar los niveles de adiponectina, estimulando la cicatrización de heridas de la piel que comprende la administración de una cantidad cosmética o dermofarmacéuticamente eficaz del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus*. En una modalidad, el nivel de adiponectina es el nivel de adiponectina circulante. En otra modalidad, el nivel de adiponectina es el nivel de adiponectina en los adipocitos. En una modalidad, el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo es un aumento del nivel de actividad de ATP y/o de la actividad de la citrato sintasa en el músculo. En otra modalidad, el aumento de la resistencia muscular es un aumento de la resistencia aeróbica. En otra modalidad, el aumento de la resistencia aeróbica es un aumento en la proporción de fibras de Tipo I en el músculo. La cepa de *Bacillus pumilus* es una cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202. En otra modalidad, el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo, el aumento de la resistencia muscular, la estimulación de la cicatrización de heridas y/o la reepitelización de la piel son una consecuencia del aumento del nivel de adiponectina. En otra modalidad, el tratamiento y/o la prevención del envejecimiento de la piel, el tratamiento y/o la prevención de las arrugas de la piel, el tratamiento de la reafirmación de la piel y/o la prevención de la pérdida de firmeza de la piel son una consecuencia de la estimulación de la síntesis de colágeno.

40

En una modalidad, el aumento de los niveles de adiponectina provoca un aumento de la actividad mitocondrial en el músculo, aumento de la resistencia muscular, estimulación de la cicatrización de heridas y/o reepitelización de la piel, estimulación de la síntesis de colágeno y/o síntesis de ácido hialurónico, el tratamiento y/o la prevención del envejecimiento de la piel, el tratamiento y/o la prevención de arrugas de la piel, el tratamiento de reafirmación de la piel y/o la prevención de pérdida de firmeza de la piel.

45

En otro aspecto, el extracto de fermentación producido por una cepa de especies de *Bacillus pumilus* se administra por cualquier medio que provoque su contacto con el sitio de acción en el ser humano y, a menudo, en forma de una composición que lo contiene. La administración del extracto de fermentación producido por una cepa de especies de *Bacillus pumilus* se realiza por vía tópica o transdérmica. En una modalidad, la aplicación tópica o transdérmica se lleva a cabo mediante iontoforesis, sonoforesis, electroporación, presión mecánica, gradiente de presión osmótica, cura oclusiva, microinyecciones, mediante inyecciones sin aguja mediante presión, parches microeléctricos, mascarillas o cualquier combinación del mismo.

50

La frecuencia de la aplicación o administración puede variar ampliamente, dependiendo de las necesidades de cada sujeto, lo que sugiere un intervalo de aplicación o administración de una vez por mes a 10 veces por día, de una vez por semana a 4 veces por día, de tres veces por semana a tres veces por día, o una vez por día.

55

Depósito de material biológico

60

La cepa de la especie *Bacillus pumilus* se depositó en la Colección Coordinada de Microorganismos de Bélgica (BCCM) / Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriëverzameling (LMG) (Universidad de Gante, KL Ledeganckstraat 35, 9000 Gante, Bélgica) bajo las condiciones del Tratado de Budapest. El depósito se hizo el 11 de marzo, 2014 y el número de depósito fue LMG P-28202.

65

Ejemplos

Cada uno de los documentos a los que se hace referencia anteriormente se incorpora aquí como referencia, incluidas las solicitudes anteriores, incluidas o no específicamente mencionadas anteriormente, de las cuales se reivindica la prioridad. La mención de cualquier documento no es una admisión de que dicho documento califica como técnica anterior o constituye el conocimiento general de la persona experta en cualquier jurisdicción. Excepto en los Ejemplos, o donde se indique explícitamente lo contrario, todas las cantidades numéricas en esta descripción que especifican cantidades de materiales, condiciones de reacción, pesos moleculares, número de átomos de carbono y similares, deben entenderse como aproximadas, es decir, sujetas a una variabilidad de $\pm 5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$ o $\pm 0,01\%$ sobre el valor indicado. Debe entenderse que los límites superior e inferior de cantidad, intervalo y relación que se establecen en la presente descripción pueden combinarse independientemente. De manera similar, los intervalos y cantidades para cada elemento de la tecnología descrita en la presente descripción pueden usarse junto con intervalos o cantidades para cualquiera de los otros elementos.

15 Ejemplo 1: Obtención del extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

A) Proceso de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

20 La cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 se cultiva en un biorreactor, a 25 °C y un pH de 8,0, en un medio de cultivo que contiene agua, 1 g /L de extracto de levadura y 4 g /L de peptona como carbono y fuentes de nitrógeno, 20 g /L de glucosa como fuente adicional de carbono y sales marinas a una concentración de 31 g /L. Se inocula a partir de un precultivo de crecimiento exponencial a una densidad óptica de 0,2 UA a una longitud de onda de 600 nm. La fermentación se extiende a 72 horas de cultivo. La concentración de oxígeno disuelto se controla al 30% de aire saturado y la agitación se mantiene a valores de alrededor de 200 rpm.

B) Purificación del extracto de fermentación obtenido de la cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

30 Las bacterias se separan del caldo de fermentación resultante descrito en el ejemplo 1a) que contiene el extracto de fermentación por centrifugación continua con una centrífuga Westfalia CSA-1, trabajando a 10 000 rpm. La eliminación de bacterias se completa por filtración a un tamaño de poro final de 0,2µm. Posteriormente, el sobrenadante resultante que contiene el extracto de fermentación se liofiliza.

35 Ejemplo 2: Caracterización fisicoquímica del extracto de fermentación de la cepa *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

40 Para la caracterización fisicoquímica del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202, obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, se realizan ensayos de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), aminas primarias (prueba de Ninhidrina), aminas secundarias (ensayo de cloranilo) carbohidratos (Fehling) y fenol (Folin-Ciocalteau).

Análisis cromatográfico SE-HPLC-UV

45 Se prepara una solución del extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en agua: glicerina (9:95) a 7 mg /ml y se analiza por HPLC-UV. Se realiza una dilución 1: 5 con agua previamente y se filtra a través de 0,22 µm filtro de acetato de celulosa. 100 µL se inyecta en una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) LC20A SHIMADZU. La columna cromatográfica usada es TSKGel G2000SWXL, 5 m, 125A, 7,8 mm x 30 mm (TOSOH Bioscience) y agua con 0,1 M pH = 6,70 + 0,1 M buffer fosfato + 0,1 M sulfato de sodio como eluyente.

50 En estas condiciones, el cromatograma del producto muestra picos entre 10 y 15 minutos, con un pico medio a los 11 minutos, entre los tiempos de retención del ácido aminobenzoico estándar (MW = 137 Da) y la ribonucleasa A del páncreas bovino (MW = 13700 Da).

55 Aminas primarias (ensayo de ninhidrina)

60 Reactivos: Reactivo Ninhidrina A: 40 g de fenol se disuelven en 10 ml de etanol absoluto. Paralelamente, se disuelven 65 mg de KCN en 100 ml de agua. Se disuelven 2 ml de esta solución en 100 ml de piridina destilada a través de ninhidrina. Ambas soluciones se mezclan con 4 g de Amberlite MB-3 durante 45 minutos. Finalmente, la solución se filtra a través de papel y luego se mezcla. Reactivo Ninhidrina B: se disuelven 2,5 mg de ninhidrina en 50 ml de etanol absoluto.

65 Método: se vierten 0,5 ml de una solución acuosa de 1 mg /ml del extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en un tubo de 2 ml. Luego se añaden al tubo 3 gotitas de reactivo de ninhidrina A y 1 gotita de reactivo de ninhidrina B y se mezclan. Luego, se mantiene a 110 °C durante 2 minutos. El producto analizado muestra un color amarillo, lo que indica que no se detectan aminas primarias. Después de la hidrólisis ácida durante 4 horas con solución

de TFA 4 M, se repite la prueba de Ninhidrina, obteniendo un resultado positivo, que indica que el extracto de fermentación contiene aminoácidos en forma peptídica.

Aminas secundarias (ensayo de cloranilo)

5 Reactivos: Reacción de acetona y cloranil Reactivo: 0,75 g de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) se disuelven en 25 ml de tolueno para obtener una solución saturada.

10 Método: se añaden 4 gotas de acetona a 20 mg de un extracto de fermentación liofilizada obtenido de acuerdo con el ejemplo 1. Luego, se añade 1 gota de reactivo de reacción de cloranilo. Esta mezcla se agita y se mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos. El producto analizado no desarrolló una coloración verde-azul, lo que indica que no se detectaron aminas secundarias en el extracto de fermentación.

Análisis de carbohidratos (ensayo de Fehling)

15 Reactivos: Fehling A: 48,3 g de sulfato de cobre (II) en 1 L de agua con 1 ml de ácido sulfúrico al 96%. Fehling B: 90 g de hidróxido de sodio con 300 g de tartrato de sodio y potasio en 1 L de agua.

20 Método: se añaden 1 ml de reactivo Fehling A y 1 ml de reactivo Fehling B a 10 mg del extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, y la muestra se calienta a 60 °C durante 45-60 min. Un precipitado sólido rojo indica la presencia de carbohidratos reductores en el extracto de fermentación.

Ensayo de fenol (ensayo de Folin-Ciocalteu)

25 Reactivos: reactivo Folin-Ciocalteu (de Sigma-Aldrich; Ref. 47641); Na₂CO₃ (de Panreac) y metanol (de Scharlab).

30 Método: en un tubo de 10 ml se añaden los siguientes reactivos: 0,5 ml de 1 mg /ml de una solución de agua del extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu, 1,5 ml de Na₂CO₃ 20% y 7 ml de metanol: agua (1: 1). Esta solución se mantiene en la oscuridad durante 1 hora. La misma solución se prepara como un blanco sin el extracto de fermentación (reemplazado con agua). Resultado negativo, la solución incolora indica que no se detectan fenoles en el extracto de fermentación.

Ejemplo 3: Preparación de una composición de crema cosmética que comprende el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

35 En un recipiente apropiado, se mezclan y agitan el agua [INCI: AGUA (AQUA)], el sorbato de potasio [INCI: SORBATO DE POTASIO] y el EDTA disódico [INCI: EDTA DISÓDICO] hasta que se logra la solubilización. A continuación, se añade Carbopol Ultrez 20 [INCI: CARBÓMERO] y se agita hasta la dispersión total. Posteriormente, se añade Goma Xantana [INCI: GOMA XANTANA] y también se agita hasta la dispersión total. Esta mezcla de ingredientes constituye la fase A.

Los ingredientes de la fase B Hydrolite-5 2/016020 [INCI: PENTILENGLICOL], Zemea [INCI: PROPANEDIOL] y fenoxietanol [INCI: FENOXIETANOL], se añaden, uno por uno, a la mezcla de la fase A, bajo agitación.

45 La fase C, que comprende ciclohexasiloxano BRB CM60 [INCI: CICLOHEXASILOXANO] se añade a la mezcla de fase A y fase B, agitando hasta homogeneización

El ingrediente de la fase D Schercemol 1818 [INCI: ISOESTEARATO DE ISOSTEARILO] se añade a la mezcla previa bajo agitación, hasta que se incorpora por completo a la mezcla.

50 La fase E comprende el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 de la cepa de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202, glicerina [INCI: GLICERINA], agua [INCI: AGUA (AQUA)]. Esta fase se añade a la mezcla de ingredientes de las fases A, B, C y D con agitación hasta la solubilización.

55 Asimismo, el ingrediente de la fase F Difuporina [INCI: ACETIL HEXAPÉPTIDO-37, BUTILENGLICOL, AGUA (AQUA)] se añade a la mezcla anterior hasta la solubilización.

El ingrediente de fase G alcohol etílico [INCI: ALCOHOL DESNATURALIZADO] se añade bajo agitación.

60 Posteriormente, el perfume Vitamin Cocktail [INCI: FRAGANCIA (PERFUME)] (fase H) se añade bajo agitación.

El pH se ajusta a 6,0 -6.5 mediante la adición de hidróxido de sodio [INCI: HIDRÓXIDO DE SODIO] (cantidad suficiente para ajustarse a este pH) bajo agitación (fase I), obteniendo una composición cosmética con las proporciones que se muestran en la tabla 1.

65

Tabla 1

	INGREDIENTE	% de peso
	A AGUA (AQUA)	68,050
5	A CARBÓMERO	0,550
	A EDTA DISÓDICO	0,200
	A SORBATO DE POTASIO	0,100
	A GOMA XANTANA	0,050
	B PROPANEDIOL	10,00
10	B PENTILENGLICOL	2,500
	B FENOXIETANOL	0,350
	C CICLOHEXASILOXANO	4,000
	D ISOSTEARIL ISOSTEARATO	2,000
	E Extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1	0,004
15	E AGUA (AQUA)	0,246
	E GLICERINA	4,750
	F BUTILENGLICOL	1,000
	F AGUA (AQUA)	0,999
	F ACETIL HEXAPEPTIDO-37	0,001
20	G ALCOHOL DESNATURALIZADO	5,000
	H FRAGANCIA (PERFUME)	0,200
	I HIDRÓXIDO DE SODIO 20 %	q.s.

25 Ejemplo 4: Preparación de una composición de crema cosmética que comprende el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

En un recipiente apropiado, agua [INCI: AGUA (AQUA)], Hydrolite-5 [INCI: PENTILENGLICOL], glicerina [INCI: GLICERINA], Betain BP [INCI: BETAÍNA] y Microcare BNA [INCI: ALCOHOL BENCÍLICO] se mezclan y agitan hasta la solubilización. Posteriormente, se añade Carbopol Ultrez 10 [INCI: CARBÓMERO] y se agita hasta la dispersión. 30 Luego, se añade Arlatone MAP 160K [INCI: CETIL FOSFATO POTÁSICO] y se agita hasta su dispersión total. Esta mezcla de ingredientes constituye la fase A.

A continuación, los ingredientes de la fase B alcohol cetílico [INCI: ALCOHOL CETÍLICO], Finsolv TN [INCI: C12-C15 BENZOATO DE ALQUILO], Massocare HD [INCI: ISOHEXADECANO], Polisorbato 20 [INCI: POLISORBATO 20], 35 ácido esteárico [INCI: ACIDO ESTEARICO] y fenoxietanol [INCI: FENOXIETANOL] se mezclan y calientan a 70 ° C.

Las fases A y B se mezclan a 70 ° C bajo agitación.

40 Luego, la mezcla de A y B se enfría a 40°C, y el ingrediente del fluido de silicona C 345 de fase C [INCI: CICLOMETICONA] se añade a esta temperatura y se agita hasta la homogeneización total de la mezcla.

El ingrediente de fase D, comprende el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con el número de depósito LMG P-28202 obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, glicerina [INCI: GLICERINA] y agua [INCI: 45 AGUA (AQUA)], se añaden bajo agitación. hasta la homogeneización.

Posteriormente, el perfume [INCI: FRAGANCIA (PERFUME)] (fase E) se añade bajo agitación. El pH se ajusta a 6,0-6,5 mediante la adición de hidróxido de sodio [INCI: HIDRÓXIDO DE SODIO] (cantidad suficiente para ajustar a este pH) bajo agitación (fase F), obteniendo una composición cosmética con las proporciones que se muestran en la tabla 2. 50

Tabla 2

	INGREDIENTE	% de peso
	A AGUA (AQUA)	75,335
55	A PENTILENGLICOL	4,750
	A GLICERINA	2,850
	A BETAÍNA	2,850
	A ALCOHOL BENCÍLICO	0,380
	A CARBÓMERO	0,285
60	A CETIL FOSFATO POTÁSICO	0,380
	B ALCOHOL CETÍLICO	1,710
	B BENZOATO DE ALQUILO C12-C15	1,425
	B ISOHEXADECANO	0,950
	B POLISORBATO 20	0,760
65	B ÁCIDO ESTEARICO	0,475
	B FENOXIETANOL	0,855

Continuación

	INGREDIENTE	% de peso
	C Ciclometicona	1,900
5	D Extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1	0,004
	D AGUA (AQUA)	0,246
	D GLICERINA	4,750
	E FRAGANCIA (PERFUME)	0,095
	F HIDRÓXIDO DE SODIO 20 %	q.s.

10 Ejemplo 5: Preparación de una microemulsión que comprende el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202.

15 En un recipiente apropiado, se mezclan el Docusato de sodio USP [INCI: DIETILHEXIL SULFOSUCCINATO DE SODIO] y el ácido isoesteárico [INCI: ACIDO ISOSTEARICO] (fase A).

20 En otro recipiente, una mezcla que comprende el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, glicerina [INCI: GLICERINA] y agua [INCI: AGUA (AQUA)], se disuelve en etanol [INCI: ALCOHOL] (fase B). Lentamente, la fase B se añade a la fase A bajo agitación. Ver tabla 3.

Tabla 3

	INGREDIENTE	% de peso
25	A DIETILHEXIL SULFOSUCCINATO DE SODIO	13,500
	A ÁCIDO ISOSTEÁRICO	76,500
	B GLICERINA	6,650
	B AGUA (AQUA)	0,345
	B Extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1	0,005
30	B ALCOHOL	3,000

Ejemplo 6: Preparación de una composición de nanopartículas lipídicas que comprende la microemulsión del ejemplo 5

35 Se añaden agua [INCI: AGUA (AQUA)], Amigel® [INCI: GOMA DE ESCLEROCIO], Zemea™ [INCI: PROPANEDIOL], ZEMEA [INCI: PROPANEDIOL] y fenoxietanol [INCI: FENOXIETANOL] (ingredientes de la fase A), en este orden a un recipiente apropiado y se agita hasta lograr homogeneidad.

40 La mezcla que comprende la microemulsión del ejemplo 5, aceite de soja refinado IP Ph. EUR. [INCI: ACEITE DE GLYCINE SOJA (SOJA)], Arlancel 83 [INCI: SESQUIOLEATO DE SORBITÁN] y Arlamol HD [INCI: ISOHEXADECANO] (ingredientes de la fase B) se añaden a otro recipiente.

45 Luego, la mezcla de los ingredientes de la fase B se añade a la mezcla de los ingredientes de la fase A con agitación de turbina hasta que se forme una emulsión. Posteriormente, la mezcla se homogeneiza con una sonda de titanio durante un minuto.

Luego, gota a gota y bajo agitación, se añade una suspensión de agua [INCI: AGUA (AQUA)] de SENSOMER CT-400 [INCI: CLORURO DE CASIA HIDROXIPROPILTRIMONIO] (ingredientes de la fase C). Ver tabla 4.

50 Tabla 4

	INGREDIENTE	% PESO
	A AGUA (AQUA)	q.s. 100
	A GOMA DE ESCLEROCIO	0,50
55	A PROPANEDIOL	5,00
	A FENOXIETANOL	2,6
	B Microemulsión del ejemplo 5	8,00
	B ACEITE DE GLICINA SOJA (SOJA)	12,00
	B SESQUIOLEATO SORBITÁN	4,30
60	B ISOHEXADECANO	5,50
	C AGUA (AQUA)	2,00
	C SENSOMETRO CT-400 (CLORURO DE CASIA HIDROXIPROPILTRIMONIO, AGUA (AQUA))	0,20

65

Ejemplo 7: Preparación de liposomas que comprenden el extracto de fermentación de la cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202

5 En un recipiente apropiado, se añade agua [INCI: AGUA (AQUA)], Zemea™ [INCI: PROPANEDIOL] y fenoxietanol [INCI: FENOXIETANOL] (fases B a D) a la mezcla de la fase A, que comprende el extracto de fermentación de la cepa de las especies de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, glicerina [INCI: GLICERINA] y agua [INCI: AGUA (AQUA)].

10 Cuando se disuelven todos los componentes anteriores, Leciflor 100 IP [INCI: LECITINA] (fase E) se añade poco a poco y bajo agitación intensa, hasta completar la solución. Luego, se añade Labrasol [INCI: GLICÉRIDOS CAPRÍLICO/CÁPRICO PEG-8] (fase F) y se agita durante 10-15 minutos para formar una emulsión. La composición finalmente obtenida se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

	INGREDIENTE	% de peso
15	A GLICERINA	9,500
	A AGUA (AQUA)	0,493
	A Extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1	0,007
20	B AGUA (AQUA)	q.s. 100
	C PROPANEDIOL	8,500
	D FENOXIETANOL	1,700
	E LECITINA	10,000
	F GLICÉRIDOS CAPRÍLICO/CÁPRICO PEG-8	4,000

25

La muestra se homogeneiza con una sonda de titanio durante 30 segundos.

Ejemplo 8: Preparación de liposomas del ejemplo 7 unidos a polímeros catiónicos

30 Los liposomas obtenidos en el ejemplo 7 se añaden a SENSOMER® CT-50 [INCI: AGUA (AQUA), CLORURO DE HIDROXIPROPILTRIMONIO DE ALMIDÓN, UREA, LACTATO DE SODIO, CLORURO DE SODIO, BENZOATO DE SODIO] en un liposoma: radio del polímero catiónico 95:5 con agitación lenta.

35 Ejemplo 9: Estudio del aumento relativo en el nivel de proteína adiponectina de preadipocitos subcutáneos humanos primarios mediante un ensayo ELISA colorimétrico (Ensayo inmunoenzimático)

40 El aumento relativo en el nivel de proteína de adiponectina se determina en adipocitos humanos primarios después del tratamiento con el extracto de fermentación de una cepa de especies de *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en Medio de Diferenciación de Adipocitos. Las células tratadas solo con el Medio de diferenciación de Adipocitos se usan como control basal.

45 Los preadipocitos humanos se siembran (10,000 células/pozo, 3 pozos por condición) en placas de 96 pocillos transparentes en Medio de Crecimiento de Preadipocitos y las células se incuban durante 24 horas a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 95% de aire y 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio se retira y las células se incuban con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a 5 µg/ml en Medio de Diferenciación de Adipocitos para inducir la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos (8 días a 37°C y 5% de CO₂). Luego, se recogen los sobrenadantes de cultivo, se determina la cantidad de adiponectina liberada por ELISA y se cuantifica el número total de células por pocillo mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Los resultados del ELISA se normalizan con el número total de células para la condición de tratamiento y el aumento relativo en el nivel de proteína adiponectina se calcula con respecto al control basal.

50

Cuantificación de los niveles de adiponectina por ELISA

55 Se usa un kit de ensayo ELISA de adiponectina siguiendo las instrucciones del fabricante (*R&D Systems*). Brevemente, los sobrenadantes de cultivo se incuban en una placa de microtitulación previamente recubierta con un anticuerpo de captura de adiponectina. Posteriormente, los pocillos se incuban con otro anticuerpo conjugado con biotina específico para la detección de adiponectina. Luego, se añade a la placa un conjugado Estreptavidina-peroxidasa Estreptavidin-HRP (enzima *Peroxidasa de rábano picante* conjugada con Estreptavidina). Finalmente, se añade el sustrato TMB (tetrametilbencidina) y se desarrolla un cambio de color, directamente proporcional a la cantidad de adiponectina presente en la dosis probada. La reacción se detiene con una solución de ácido sulfúrico y la absorbancia se lee en un lector de absorbancia de microplacas (Multiskan-Thermo Electro Corporation) a 450 nm con corrección de longitud de onda a 570 nm.

60

65

Determinación del número total de células mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta

Las placas que contienen células (después de que se recogen los sobrenadantes para el ensayo ELISA) se incuban con solución de Cristal Violeta. El ADN de las células se tiñe con una solución de Cristal Violeta. Luego, se elimina la solución de Cristal Violeta y los pozos se lavan con agua Milli-Q. La cantidad de Cristal Violeta que las células absorben es directamente proporcional al número de células en cada pocillo. Finalmente, cuando las células se secan, se añade una solución de HCl y se lee la absorbancia a 630 nm en un lector de Absorción de Microplacas (Multiskan-Thermo Electro Corporation). Los resultados de ELISA se normalizan con el número total de células para la dosis probada, y el aumento relativo en el nivel de proteína adiponectina se calcula con respecto al control basal, tabla 6.

Tabla 6

Tratamiento	Dosis probada	Nivel relativo de adiponectina con respecto al control basal
Extracto de fermentación de la cepa <i>Bacillus pumilus</i> del ejemplo 1	5 µg/mL	+68,34 % ± 5,32 %

El resultado muestra que el extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 aumenta el nivel relativo de adiponectina en cultivos celulares de adipocitos humanos a la dosis probada.

Ejemplo 10: Estudio del aumento relativo de la expresión de la proteína miosina en las células del músculo esquelético humano por inmunofluorescencia

La expresión de la Cadena Pesada de Miosina esquelética lenta 7 (MYH7) se estudia en células del músculo esquelético humano tratadas con sobrenadante de un cultivo de adipocitos después del tratamiento con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en Medio de Diferenciación de Adipocitos. Las células del músculo esquelético humano tratadas solo con sobrenadantes de un cultivo de adipocitos no tratados con extracto de fermentación de fermentación se usaron como control basal.

Las células del músculo esquelético humano se siembran (10.000 células/pocillo, 2 pocillos por cada dosis analizada) en una placa de 12 pocillos transparentes con cubreobjetos pre-recubiertos con una Matriz de recubrimiento en Medio de Crecimiento de Células Musculares y las células se incuban durante 48 h. Después de 24h, el proceso de diferenciación se inicia mediante la adición de Medio de Diferenciación de las Células Musculares.

Después de 10 días de diferenciación, el medio se elimina y las células se tratan durante 48 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ con los sobrenadantes de un cultivo de adipocitos tratado durante 8 días con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con ejemplo 1 (5 µg/mL en Medio de Diferenciación de Adipocitos). La cantidad de adiponectina en los sobrenadantes del cultivo de adipocitos se determina mediante una prueba ELISA que usa anticuerpos específicos.

Determinación de la expresión de la proteína miosina

Después del tratamiento, las células se lavan con Solución Salina Tamponada con fosfato (PBS) y se fijan con Paraformaldehído al 4% (PFA). Después de este paso, las células se incuban con un anticuerpo monoclonal primario de ratón contra el Anticuerpo de Cadena Pesada 7 de Miosina esquelética anti-lenta (MYH7) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavan con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG (H + L) de ratón Alexa Fluor® 594 anti-ratón de cabra (marcador de emisión de fluorescencia roja) con sus anticuerpos primarios durante 1 hora en la oscuridad. Luego, las células se tiñen con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y se montan en la oscuridad.

Las células se observan usando un microscopio de fluorescencia Zeiss y las imágenes se capturan usando el software Zen. Para verificar que el número de células en todas las dosis probadas es superponible, los núcleos se revelan con tinción DAPI y se recogen 10 imágenes representativas de cada dosis probada. De cada imagen de fluorescencia de miosina, se cuantifican los valores de DI (densidad integrada). Se usa el software ImageJ. Se realizan dos ensayos independientes por duplicado. El aumento relativo del nivel de miosina se normaliza con respecto al control basal, tabla 7.

Tabla 7

Tratamiento	Dosis probada	Inducción relativa del respeto de la proteína MYH7 al control basal
Extracto de fermentación de la cepa <i>Bacillus pumilus</i> del ejemplo 1	5 µg/mL	+69,78 ± 16,34 %

Los resultados obtenidos muestran que los sobrenadantes del cultivo de adipocitos que contienen altos niveles de adiponectina después del tratamiento con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 a 5 µg/mL pueden mejorar los niveles de expresión de la proteína Miosina hasta 69,78% con respecto al control basal.

5 Ejemplo 11: Estudio del aumento relativo de la actividad de la citrato sintasa en las células primarias del músculo esquelético humano tratadas con sobrenadantes de un cultivo de adipocitos que contiene adiponectina

10 El aumento relativo de la actividad de la citrato sintasa se determina en las células del músculo esquelético humano tratadas con sobrenadante de un cultivo de adipocitos después del tratamiento con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en Medio de Diferenciación de Adipocitos. Las células del músculo esquelético humano tratadas con un sobrenadante de un cultivo de adipocitos no tratados con el extracto de fermentación se usan como control basal.

15 Las células del músculo esquelético humano se siembran (200,000 células/pocillo, 2 pocillos por dosis probada) en placas de 6 pocillos transparentes en Medio de Crecimiento de Células Musculares y las células se incuban durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera saturada de agua del 95% aire de y 5% de CO₂. Luego, el proceso de diferenciación se inicia mediante la adición de Medio de Diferenciación de las Células Musculares. Después de 72 horas de diferenciación, el medio se elimina y las células se incuban con sobrenadantes de un cultivo de adipocitos que contiene un alto nivel de adiponectina, previamente determinado por ELISA, después de 8 días de tratamiento con extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 (5 µg/mL en medio de diferenciación de adipocitos). Después de 48 horas de tratamiento a 37 °C en una incubadora de CO₂, las células del músculo esquelético humano se lisan y su contenido de proteína total se determina mediante un ensayo BCA (Acido Bicinonínico). Todos los lisados se diluyen a la misma concentración final de proteína total determinada por el ensayo BCA, y el aumento relativo en la actividad de la citrato sintasa se cuantifica con respecto al control basal.

25 Determinación de proteínas totales por ensayo de BCA

30 Se usa un kit de análisis de BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (*Thermo Scientific*). La concentración de proteína total de los lisados de células del músculo esquelético humano se determina mediante una reacción colorimétrica usando un estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Brevemente, los estándares y las muestras se dispensan en una placa de 96 pocillos transparentes. Después de la incubación con el reactivo de trabajo, la absorbancia se mide a 570 nm en un Lector de Absorción de Microplacas (Multiskan-Thermo Electro Corporation).

35 Medición de la actividad de la citrato sintasa

40 Se usa un kit de ensayo de citrato sintasa siguiendo las instrucciones del fabricante (*Sigma*). Brevemente, los lisados celulares se incuban en una placa de 96 pocillos transparentes con una mezcla de reacción que contiene acetilcoenzima A y DTNB (ácido 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzoico)). Luego, se añade oxaloacetato, que es un sustrato de la citrato sintasa, y se desarrolla un cambio de color, directamente proporcional a la actividad de citrato sintasa en la dosis probada. La absorbancia se lee en un Lector de Absorbancia de Microplacas (Multiskan-Thermo Electro Corporation) a 405 nm. El aumento relativo de la actividad de la citrato sintasa se normaliza con respecto al control basal, Tabla 8.

45 Tabla 8

Tratamiento	Dosis probada	Nivel relativo de actividad de citrato sintasa con respecto al control basal
Extracto de fermentación de la cepa <i>Bacillus pumilus</i> del ejemplo 1	5 µg/mL	+ 47,85 % ± 3,35 %

50 Los resultados muestran que la sustancia extracelular bacteriana extracelular obtenida de la cepa de *Bacillus sp.* La cepa con número de depósito LMG P-28202 obtenida de acuerdo con el ejemplo 1 es capaz de aumentar la actividad relativa de la citrato sintasa en las células del músculo esquelético humano a la dosis probada.

55 Ejemplo 12: Estudio del aumento relativo en la producción de ATP en células primarias del músculo esquelético humano tratadas con sobrenadantes de un cultivo de adipocitos que contiene adiponectina

60 El aumento relativo en la producción de ATP se determina en células del músculo esquelético humano tratadas con sobrenadante de un cultivo de adipocitos después del tratamiento con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en Medio de Diferenciación de Adipocitos. Las células del músculo esquelético humano tratadas con un sobrenadante de un cultivo de adipocitos no tratados con el extracto de fermentación se usan como control basal.

65 Se siembran células del músculo esquelético humano (200,000 células/pocillo, 2 pocillos por dosis probada) en placas de 6 pocillos transparentes en Medio de Crecimiento de Células Musculares y las células se incuban durante 48 horas a 37° C en una atmósfera saturada de agua con 95% de aire y 5% de CO₂. Luego, el proceso de diferenciación se inicia mediante la adición de Medio de Diferenciación de las Células Musculares. Después de 72 horas de

diferenciación, el medio se elimina y las células se incuban con sobrenadantes de un cultivo de adipocitos que contiene un alto nivel de adiponectina, previamente determinado por ELISA, después de 8 días de tratamiento con extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 (5 µg /mL en medio de diferenciación de adipocitos). Después de 48 horas de tratamiento a 37° C en una incubadora de CO₂, las células del músculo esquelético humano se lisan y el ATP producido se cuantifica mediante un kit de ensayo específico y el contenido de proteína total se determina por BCA. Los resultados de ATP se normalizan con la concentración de proteína total para la dosis probada, y el aumento relativo en el ATP producido se cuantifica con respecto al control basal.

Medición de la producción de ATP

Se usa un kit de ensayo ATP siguiendo las instrucciones del fabricante (*Abcam*). Brevemente, los lisados celulares se incuban en una placa de 96 pocillos transparentes con una mezcla de reacción que contiene Sonda ATP, Convertidor ATP, Mezcla de Revelador y Tampón de Ensayo ATP para generar un producto que se cuantifica por fluorescencia con un Lector de Fluorescencia de placa Automatizado (Clariostar-BMG) configurado para excitación a 530 nm y detección a 590 nm.

Determinación de proteínas totales por ensayo de BCA

Se usa un kit de ensayo BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (*Thermo Scientific*). La concentración de proteína total de los lisados de células del músculo esquelético humano se determina mediante una reacción colorimétrica usando un estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Brevemente, los estándares y las muestras se dispensan en una placa de 96 pocillos transparentes. Después de la incubación con el reactivo de trabajo, la absorbancia se mide a 570 nm en un Lector de Absorbancia de Microplacas (Clariostar-BMG). Los resultados de ATP se normalizan con la concentración de proteína total para la dosis probada, y el aumento relativo en el ATP producido se cuantifica con respecto al control basal, Tabla 9.

Tabla 9

Tratamiento	Dosis probada	Nivel relativo de ATP producido con respecto al control basal
Extracto de fermentación de la cepa <i>Bacillus pumilus</i> del ejemplo 1	5 µg/mL	+ 136,00 % ± 5,45 %

Los resultados muestran que la sustancia extracelular bacteriana obtenida de la cepa *Bacillus sp.* con número de depósito LMG P-28202 obtenida de acuerdo con el ejemplo 1 puede aumentar la producción relativa de ATP en las células del músculo esquelético humano a la dosis probada.

Ejemplo 13: Estudio del perfil de la expresión genética de preadipocitos subcutáneos humanos primarios

Los preadipocitos subcutáneos humanos se siembran a una densidad de 130,000 células/pocillo en placas de 12 pocillos en PGM-2 (Medio Basal PBM-2 suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 2 mM y 100 unidades / mL de gentamicina /anfotericina) y las células se incuban durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con 95% de aire y 5% de CO₂.

Después de 24 h, se elimina el medio y las células se incuban durante 8 días a 37 °C en una incubadora de CO₂ con el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 en 14 µg/mL en medio de diferenciación PDM-2 (PGM-2 suplementado con insulina, dexametasona, indometacina e IBMX) o solo con PDM-2 (control basal). El extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 y el control basal se analizan en 4 repeticiones biológicas (pocillos).

Luego, las células se lisan y el ARN se extrae y purifica de cada réplica y cada dosis probada por medio del Mini kit RNeasyPlus de Qi-agen. Los lisados celulares se homogenizan y las RNasas se inactivan. El ADN genómico se elimina de las muestras usando columnas de centrifugación gDNA Eliminator del Mini kit RNeasyPlus. Luego, las muestras se pasan a través de columnas especiales de unión a ARN del Mini kit RNeasyPlus y después de varios lavados de microcentrifugación, el ARN purificado se eluye con 50 µ L de agua ultrapura.

La pureza, integridad y concentración del ARN obtenido se evalúan mediante espectrofotometría (Nanodrop) y con un bioanalizador (Agilent Bioanalyzer). Más tarde, las muestras se marcan y se hibridan en un microarray de expresión génica humana (ASurePrint G3, Agilent).

Los valores normalizados obtenidos para la dosis probada se comparan con los valores normalizados obtenidos para el control basal para determinar genes con expresión diferencial. A continuación, se realiza un análisis paramétrico de los datos mediante el software Bioconductor.

Los valores obtenidos se evalúan mediante GSEA (Enriquecimiento del análisis de conjuntos de genes) para agrupar los genes con expresión diferencial en términos de ontología génica y rutas biológicas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

5 Tabla 10

Genes implicados en el metabolismo de la glucosa regulados negativamente por el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1			
Símbolo	Nombre del gen	% de inducción por plegado	
10	ARF6	Factor 6 de ADP-ribosilación	-23,41
	CRK	homólogo de oncogén CT10 del virus del sarcoma aviar v-crk	-25,36
	FOS	FBJ homólogo oncogén viral del osteosarcoma murino	-28,28
	IRS1	sustrato receptor de insulina 1	-18,52
	IRS2	sustrato receptor de insulina 2	-20,65
15	MAP2K1	proteína quinasa activada por mitógeno 1	-39,58
	MAP3K1	proteína quinasa activada por mitógeno quinasa 1, proteína ligasa ubiquitina E3	-19,25
	ME1	enzima málica 1, NADP (+) - dependiente, citosólica	-27,66
20	ATP6V0E1	ATPasa, transporte H+, lisosomal 9kDa, subunidad V0 e1	-20,34
	ATP6V1A	ATPasa, transporte H+, lisosomal 70kDa, subunidad A V1	-19,81
	ATP6V1B2	ATPasa, transporte H+, lisosomal 56/58kDa, subunidad V1 B2	-21,33
	ATP6V1E1	ATPasa, transporte H+, lisosomal 31kDa, subunidad E1 V1	-27,67
	ATP6V1H	ATPasa, transporte H +, lisosomal 50/57kDa, V1 subunidad H	-26,05
25	ENO1	enolasa 1, (alfa)	-22,7
	HK3	hexoquinasa 3 (glóbulo blanco)	-21,03
	LDHA	lactato deshidrogenasa A	-36,14
	LDHB	lactato deshidrogenasa B	-18,19
	PGAM1	fosfoglicerato mutasa 1 (cerebro)	-20,16
30	PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	-19,38
	DLAT	dihidrolipoamida S-acetiltransferasa	-24,71
	FH	fumarato hidratasa	-26,03
	IDH1	isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), soluble	-27,61
	IDH2	isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial	-25,75
35	IDH3B	isocitrato deshidrogenasa 3 (NAD+) beta	-20,46
	SDHB	complejo succinato deshidrogenasa, subunidad B, azufre de hierro (lp)	-30,26
	SDHD	complejo succinato deshidrogenasa, subunidad D, proteína de membrana integral	-23,84
	SUCLA2	succinato-CoA ligasa, formadora de ADP, subunidad beta	-33,26
40	GFPT1	glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 1	-22,05
	PGD	fosfogluconato deshidrogenasa	-38,17
Genes mitocondriales regulados negativamente por el extracto de la fermentación de acuerdo con el ejemplo 1			
Símbolo	Nombre del gen	% de inducción por plegado	
45	ATP5A1	ATP sintasa, transporte de H+, complejo F1 mitocondrial, subunidad 1 alfa, músculo cardíaco	-33,39
	ATP5B	ATP sintasa, transporte de H+, complejo F1 mitocondrial, polipéptido beta	-29,47
	ATP5C1	ATP sintasa, transporte de H+, complejo F1 mitocondrial, polipéptido gamma 1	-22,99
50	COX4I1	citocromo c oxidasa subunidad IV isoforma 1	-20,03
	CYC1	citocromo c-1	-22,14
	CYCS	citocromo c, somático	-23,37
	HADH	hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	-20,05
55	HADHA	hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA tiolasa/enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad alfa	-26,12
	HADHB	hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA tiolasa /enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad beta	-17,67
60	SLC25A20	familia portadora de solutos 25 (carnitina/acilcarnitina translocasa), miembro 20	-19,94

65

Continuación

Genes implicados en el proceso de adipogénesis regulados negativamente por el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1			
5	Símbolo	Nombre del gen	% de inducción por plegado
	AGT	angiotensinógeno (inhibidor de la serpina peptidasa, clado A, miembro 8)	-17,35
	EGR2	respuesta de crecimiento temprano 2	-25,04
	IRS1	sustrato receptor de insulina 1	-18,52
10	IRS2	sustrato receptor de insulina 2	-20,65
	KLF5	Factor 5 similar a Kruppel (intestinal)	-18,13
	LPL	lipoproteína lipasa	-22,15
	NCOA3	receptor nuclear coactivador 3	-22,59
	PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	-19,38
15	PPARG	receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma	-19,86
	TNF	factor de necrosis tumoral	-17,63
Genes implicados en la síntesis de triglicéridos regulados negativamente por el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1			
20	Símbolo	Nombre del gen	% de inducción por plegado
	DGAT2	diacilglicerol O-aciltransferasa 2	-45,5
	LPL	lipoproteína lipasa	-22,15
	PPAP2A	ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2A	-23,3
	PPAP2B	ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2B	-30,62
Otros genes regulados negativamente por el extracto de fermentación obtenido de acuerdo con el ejemplo 1			
25	Símbolo	Nombre del gen	% de inducción por plegado
	SH2B1	SH2B adaptador de proteína 1	-23,43
30	SMPD1	esfingomielina fosfodiesterasa 1, ácido lisosomal	-19,42
	RETSAT	retinol saturasa (todo-trans-retinol 13,14-reductasa)	-26,24

Aunque se muestran ciertas modalidades y detalles representativos con el fin de ilustrar el objeto de la invención, para los expertos en esta técnica será evidente que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance del objeto de la invención. Con respecto a esto, el alcance de la invención se limita solo por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico con un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 10 2. Extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para uso como agente antiinflamatorio, en donde dicho uso implica el aumento del nivel de adiponectina y en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico de peso molecular inferior a 7000 Da.
- 15 3. Uso de un extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para la estimulación cosmética, no terapéutica de la síntesis de colágeno en la piel, tratamiento cosmético, no terapéutico y/o la prevención del envejecimiento cutáneo, cosmético, tratamiento no terapéutico y/o prevención de arrugas de la piel, cosmético, tratamiento no terapéutico de reafirmación de la piel y/o para la prevención cosmética, no terapéutica de la pérdida de firmeza de la piel, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 20 4. Uso de un extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para el aumento cosmético y no terapéutico de la actividad mitocondrial en el músculo y/o el aumento de la resistencia muscular, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 25 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el aumento de la actividad mitocondrial en el músculo es un aumento del nivel de ATP y/o la actividad de la citrato sintasa en el músculo.
- 30 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el aumento de la resistencia muscular es un aumento de la resistencia aeróbica y, preferiblemente, el aumento de la resistencia aeróbica es un aumento de la proporción de fibras de Tipo I en el músculo.
- 35 7. Uso del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para la estimulación cosmética y no terapéutica de la reepitelización de la piel, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico con un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 40 8. Uso del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para la disminución cosmética, no terapéutica de la acumulación de grasa, en donde dicho uso implica el aumento del nivel de adiponectina y dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 45 9. Uso del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para la disminución cosmética, no terapéutica del índice de masa corporal (IMC), en donde dicho uso implica el aumento del nivel de adiponectina y dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico con un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 50 10. Uso del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 para el aumento cosmético, no terapéutico de la fuerza y tono de las fibras musculares, en donde dicho uso implica el aumento del nivel de adiponectina y dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico con un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 55 11. Composición cosmética o dermofarmacéutica que comprende una cantidad cosmética o farmacéuticamente eficaz del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202 y al menos un excipiente y/o ingrediente cosmético y/o dermofarmacéuticamente aceptable, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico con un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 60 12. Composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el extracto de fermentación se incorpora a un sistema de suministro cosmético o dermofarmacéutico y/o sistema de liberación sostenida o se adsorbe sobre un polímero orgánico sólido o un soporte mineral sólido.
- 65 13. Composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la composición se presenta en una formulación elegida del grupo formado por cremas, emulsiones múltiples, soluciones, cristales líquidos, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, geles en crema, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, jabones, champús, acondicionadores, sueros, películas de polisacáridos, ungüentos, espumas, pomadas, polvos, barras, lápices, atomizaciones o aerosoles.

14. Composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que se incorpora en una tela, tela no tejida o dispositivo médico.
- 5 15. Composición cosmética o dermofarmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde el excipiente y/o ingrediente cosmético y/o dermofarmacéuticamente aceptable se elige del grupo formado por agentes que aumentan el nivel de adiponectina en los adipocitos, agentes que aumentan la actividad mitocondrial, agentes que aumentan el nivel de ATP en el músculo, otros agentes estimulantes de la cicatrización, agentes coadyuvantes de cicatrización, agentes estimulantes de la reepitelización, agentes coadyuvantes de reepitelización, agentes que reducen el contenido de triglicéridos de los adipocitos, agentes que retrasan la diferenciación de adipocitos, agentes que reducen la cantidad de nocturnina, agentes que inhiben la expresión de nocturnina, agentes lipolíticos o agentes estimulantes de la lipólisis, agentes venotónicos, agentes que modulan la expresión de PGC-1 α , agentes que inhiben la actividad de PPAR γ , agentes anticelulíticos, agentes que disminuyen la producción de sebo, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o capaces de inhibidor o prevenir su degradación, agentes estimulantes de la síntesis de colágeno, agentes estimulantes de la síntesis de elastina, agentes estimulantes de la síntesis de decorina, agentes estimulantes de la síntesis de laminina, agentes estimulantes de la síntesis de defensina, agentes estimulantes de la síntesis de chaperona, agentes estimulantes de la síntesis de AMPc, agentes que modulan AQP-3, agentes que modulan la síntesis de acuaporinas, proteínas de la familia de las acuaporinas, agentes estimulantes de la síntesis de ácido hialurónico, agentes estimulantes de la síntesis de glucosaminoglicanos, agentes estimulantes de la síntesis de fibronectina, agentes estimulantes de la síntesis de sirtuinas, proteínas de choque térmico, agentes estimulantes de las síntesis de proteínas de choque térmico, agentes que inhiben la exocitosis neuronal, agentes anticolinérgicos, agentes que inhiben la contracción muscular, agentes antienvjecimiento, agentes antiarrugas, agentes antitranspirantes, agentes antiinflamatorios y/o analgésicos, agentes antiprurito, agentes calmantes, anestésicos agentes, inhibidores de la agrupación de receptores de acetilcolina, agentes que inhiben la acetilcolinesterasa, agentes relajantes de la piel, agentes estimulantes o inhibidores de la síntesis de melanina, agentes aclarantes o despigmentantes, agentes propigmentantes, agentes autobronceadores, agentes inhibidores de la NO-sintasa, agentes inhibidores de la 5 α -reductasa, agentes inhibidores de lisil y/o prolil hidroxilasa, antioxidantes, captadores de radicales libres y/o agentes contra la contaminación atmosférica, captadores de especies reactivas de carbonilo, agentes antiglicación, agentes antihistamínicos, agentes antivirales, agentes antiparasitarios, emulsionantes, emolientes, disolventes orgánicos, propelentes líquidos, acondicionadores de la piel, humectantes, sustancias que retienen la humedad, alfa hidroxilácidos, beta hidroxilácidos, humectantes, enzimas hidrolíticas epidérmicas, vitaminas, aminoácidos, proteínas, pigmentos o colorantes, tintes, biopolímeros, polímeros gelificantes, espesantes, surfactantes, agentes suavizantes, aglutinantes, conservantes, agentes capaces de reducir o tratar las bolsas debajo de la ojos, agentes exfoliantes, agentes queratolíticos, agentes descamantes, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, agentes fungistáticos, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes estimulantes de la síntesis de componentes del estrato córneo, ceramidas, ácidos grasos, agentes que inhiben la degradación del colágeno, agentes que inhiben metaloproteinasas de matriz, agentes que inhiben la degradación de elastina, agentes que inhiben serina proteasas, agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos, agentes que estimulan la proliferación de queratinocitos, agentes que estimulan la proliferación de melanocitos, agentes que estimulan la diferenciación de queratinocitos, agentes antihiperqueratosis, agentes comedolíticos, agentes antipsoriasis, agentes reparadores del ADN, agentes protectores del ADN, agentes protectores de células madre, estabilizantes, agentes para el tratamiento y/o cuidado de pieles sensibles, agentes reafirmantes, agentes antiestrías, agentes astringentes, agentes que inhiben la actividad de PAR-2, citocinas, factores de crecimiento, agentes que actúan sobre la circulación capilar y/o microcirculación, agentes que estimulan la angiogénesis, agentes que inhiben la permeabilidad vascular, agentes que actúan sobre el metabolismo celular, agentes para mejorar la unión dermoepidérmica, agentes que inducen el crecimiento del cabello, agentes inhibidores o retardadores del crecimiento del cabello, agentes retardadores de la caída del cabello, conservantes, perfumes, desodorantes cosméticos y/o absorbentes y/o enmascaradores de olores corporales, agentes quelantes, extractos de plantas, aceites esenciales, extractos marinos, agentes obtenidos de un proceso biotecnológico, sales minerales, extractos celulares, protectores solares y agentes fotoprotectores orgánicos o minerales activos contra rayos ultravioleta A y/o B y/o rayos infrarrojos A, o mezclas de los mismos.
- 55 16. Un método no terapéutico para aumentar la actividad mitocondrial en el músculo, aumentar la resistencia muscular, estimular la reepitelización de la piel, estimular la síntesis de colágeno y/o la síntesis de ácido hialurónico, el tratamiento reafirmante de la piel y/o prevención de la pérdida de firmeza de la piel, tratamiento y/o prevención del envejecimiento de la piel, tratamiento y/o prevención de las arrugas de la piel que comprende administrar una cantidad cosméticamente eficaz del extracto de fermentación de una cepa de la especie *Bacillus pumilus* con número de depósito LMG P-28202, en donde dicho extracto de fermentación contiene material peptídico y glucídico que tiene un peso molecular inferior a 7000 Da.
- 60