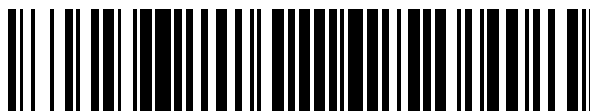


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 947 484**

51 Int. Cl.:

A61K 8/99	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)
A61P 17/16	(2006.01)
A61P 17/18	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2020 PCT/IB2020/055326**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2020 WO20245797**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2020 E 20736427 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3979982**

54 Título: **Composiciones que comprenden una cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* y ácido hialurónico y uso de las mismas para el tratamiento de la piel**

30 Prioridad:

05.06.2019 IT 201900008097

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

10.08.2023

73 Titular/es:

**LAC2BIOME S.R.L. (100.0%)
Via Ceresio 7
20154 Milano, IT**

72 Inventor/es:

BIFFI, ANDREA

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 947 484 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

Composiciones que comprenden una cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* y ácido hialurónico y uso de las mismas para el tratamiento de la piel

5 La presente invención versa sobre una composición que comprende probióticos (cepas bacterianas vivas y viables o inactivadas) y ácido hialurónico o una sal del mismo para su uso en la prevención, en el tratamiento (terapéutico o cosmético curativo) o en la atenuación de al menos un signo o síntoma asociado o provocado por un envejecimiento de la piel o por una reducción en las defensas inmunológicas de la piel o por una inflamación/infección de la piel, tal como una inflamación inducida o provocada por rayos UV.

Estado de la técnica

10 La piel es el revestimiento más externo del cuerpo humano y constituye la primera línea de defensa del cuerpo contra agresiones externas, dado que actúa como una barrera anatómica contra patógenos potenciales y posibles agentes dañinos. Los cambios de la piel pueden facilitar la aparición de enfermedades cutáneas, en particular provocadas por patógenos. Por ejemplo, según envejece la piel, la piel se vuelve más delgada y más frágil, siendo esto debido al hecho de que la regeneración celular se vuelve más lenta y pasa desde las normales 3-4 semanas hasta 4 o incluso
15 6 semanas. La piel experimenta cambios estructurales con el paso del tiempo, provocados por varios factores de distinto origen, que determinan la pérdida de la hidratación cutánea, la aparición de microarrugas, la pérdida de elasticidad, la hiperqueratosis y la formación de puntos hiperpigmentados. Además, el microbioma rico que coloniza la piel humana, llevando a cabo funciones importantes y útiles para combatir la adhesión y el desarrollo de patógenos cutáneos, tales como, a título de ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, puede enfrentarse a desequilibrios o disbiosis debidos a diversos factores.
20

Cuando se produce una disbiosis en la piel, los probióticos pueden actuar como moduladores, restaurando el equilibrio a nivel de la microbiota de la piel. Durante la última década, el uso de nuevas tecnologías ha facilitado el análisis taxonómico de la microbiota de la piel, cuya población bacteriana puede llegar a aproximadamente 1010 especies de microorganismos, pertenecientes a más de 25 filos, entre los cuales los más representados son *Actinobacteria*,
25 *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Se han relacionado diversas enfermedades cutáneas con alteraciones del microbioma de la piel, por ejemplo se considera *P. acnes* la bacteria patógena asociada con el acné cutáneo. Por lo tanto, mantener una situación de homeostasia de la microbiota de la piel o restaurar dicha homeostasia después de una disbiosis de la microbiota es fundamental para prevenir o tratar enfermedades cutáneas, en particular infecciones o inflamaciones cutáneas, aún más en particular infecciones o inflamaciones debidas a agentes patógenos, tales como bacterias o virus, así como debidas a la irradiación de la piel con rayos UV o debidas a una exposición de la piel a condiciones desfavorables.
30

Normalmente, estos problemas se abordan con el uso de agentes antibacterianos, es decir, utilizando desinfectantes y antibióticos tópicos. Por una parte, aunque indudablemente eficaces, además de eliminar las bacterias beneficiosas, los antibióticos suponen un riesgo de sensibilización y de eventos adversos potenciales, en particular con el uso
35 prolongado de antibióticos de amplio espectro.

Además, un planteamiento convencional para la prevención de problemas de daño o de envejecimiento de la piel debido a la irradiación de la piel con rayos UV es el uso de cremas o productos cutáneos que reflejan o absorben los rayos UV, denominados habitualmente filtros solares. Los ingredientes activos en los denominados filtros solares "químicos" (salicilatos, cinamatos, oxibenzona, octilcrileno y otros), gracias a su estructura, son capaces de absorber
40 luz UV. Por otra parte, el dióxido de titanio y el óxido de cinc son sustancias minerales inertes con gran poder de recubrimiento, que reflejan físicamente la luz solar y que, por lo tanto, están incluidas entre lo que se denomina filtros físicos.

Sin embargo, dichos filtros solares solo permiten prevenir la interacción de los rayos UV con la piel, a la vez que no estimulan el mantenimiento de la homeostasia de la microbiota de la piel, ni restauran dicha homeostasia en el caso
45 de una disbiosis o infecciones o inflamaciones provocadas por dichos rayos UV, que pueden no ser completamente repelidos por los filtros solares.

Tras una intensa actividad de investigación y de desarrollo, el solicitante ha abordado y solucionado los problemas técnicos mencionados anteriormente proporcionando composiciones innovadoras (sucintamente, composición/es de la invención) que comprenden una mezcla (sucintamente, mezcla de la invención) que comprende o, alternativamente,
50 que consta de una cepa bacteriana viva y viable o inactivada, que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* identificada como *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo (sucintamente, AH).

Sumario de la invención

55 Un primer aspecto de la presente invención versa acerca del uso de una composición que comprende probióticos y ácido hialurónico o una sal del mismo para prevenir, atenuar o tratar un envejecimiento de la piel natural o un envejecimiento de la piel provocado por la exposición a factores externos, tales como, por ejemplo, rayos UV.

Un segundo aspecto de la presente invención versa acerca del uso de una composición que comprende probióticos y ácido hialurónico o una sal del mismo para prevenir, atenuar o tratar al menos un signo o síntoma asociado o provocado por una reducción en las defensas inmunológicas de la piel.

5 Un tercer aspecto de la presente invención versa acerca del uso de una composición que comprende probióticos y ácido hialurónico o una sal del mismo para prevenir, atenuar o tratar al menos un signo o síntoma asociado o provocado por una inflamación/infección de la piel.

Los probióticos particularmente útiles para el fin de la invención son bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*, preferiblemente a la especie *Lactobacillus paracasei*, tal como la cepa *L paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

10 De hecho, el solicitante descubrió que una composición que comprende probióticos, preferiblemente bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*, y ácido hialurónico es capaz de potenciar las defensas inmunológicas favoreciendo la liberación de péptidos antimicrobianos y quimiocinas de la piel, potenciando el proceso normal de diferenciación y la sustitución celular de la epidermis y reforzando la estructura de la dermis.

15 Además, el solicitante descubrió que el uso de una composición que comprende ácido hialurónico y probióticos, preferiblemente bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, es capaz de llevar a cabo una acción antiinflamatoria y prevenir la activación de la inflamación inducida o provocada por los rayos UV.

En particular, las composiciones y las mezclas de la presente invención son capaces de:

- inducir mecanismos para la defensa y/o la cicatrización de la piel, en particular mecanismos inmunomoduladores;
- 20 - prevenir y/o tratar afecciones cutáneas inflamatorias o infecciosas, en particular aquellas inducidas por la radiación UV, tanto UV-A como UV-B;
- combatir la proliferación de bacterias patógenas en la piel;
- 25 - mantener o restaurar una condición de homeostasia de la piel y/o un equilibrio de la microbiota de la piel;
- favorecer, facilitar, promover y/o acelerar los procesos de cicatrización de heridas y/o los procesos de reepitelización y/o de cicatrización;
- combatir y/o ralentizar el envejecimiento de la piel.

30 Además, las composiciones de la invención son capaces de inducir y/o de promover dichos efectos positivos tanto a corto plazo como a largo plazo.

Además, las mezclas y composiciones de la invención no tienen efectos adversos significativos y pueden ser administradas a todos los sujetos, en particular a sujetos pediátricos y a mujeres embarazadas o lactantes.

En último lugar, las mezclas y/o composiciones de la invención son sencillas de preparar y rentables.

35 Se logran estos y otros objetos, que serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, mediante las mezclas y composiciones (que contienen dichas mezclas) de la presente invención gracias a las características técnicas reivindicadas en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

40 La presente invención será descrita en detalle y ejemplificada a continuación con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra una imagen de ampliación 20x y 40x de secciones de tejidos histológicos tratados, respectivamente, con una solución salina (A) y con una composición que comprende la cepa LPC-S01 (B), marcada con una tinción tricrómica de Masson;

45 la Figura 2 muestra una imagen de ampliación 20x y 40x de secciones de tejidos histológicos marcados con una tinción tricrómica de Masson, tratados, respectivamente, con una composición que comprende ácido hialurónico (A) y con una composición que comprende la cepa LPC-S01 + ácido hialurónico (B);

50 la Figura 3 muestra la cuantificación de translocaciones nucleares de NFκB en tejidos expuestos a radiación UV y tratados con una composición que comprende la cepa LPC-S01 (P1), con una composición que comprende la cepa LPC-S01 + ácido hialurónico (P2) y con una composición que comprende ácido hialurónico (P3);

la Figura 4 muestra una imagen de ampliación 20x de secciones de tejidos histológicos tratados, respectivamente, con una solución salina (A), con una composición que comprende la cepa LPC-S01 (B), con una composición que

comprende ácido hialurónico (C) y con una composición que comprende la cepa LPC-S01 y ácido hialurónico (D), 4 horas después del ataque con rayos UV, marcados con una tinción con hematoxilina y eosina;

5 la Figura 5 muestra una imagen de ampliación 20x de secciones de tejidos histológicos tratados, respectivamente, con una solución salina (A), con una composición que comprende la cepa LPC-S01 (B), con una composición que comprende ácido hialurónico (C) y con una composición que comprende la cepa LPC-S01 y ácido hialurónico (D), tras 24 horas de ataque con rayos UV, marcados con una tinción con hematoxilina y eosina.

10 Figuras 6a, 6b, 6c, 6d: imágenes adquiridas con el microscopio del análisis histomorfológico mediante tinción con hematoxilina y eosina en un modelo de homeostasia a las 24 horas (6a: CN a las 24 horas, 6b: P3-i a las 24 horas) y a las 48 horas (6c: CN a las 48 horas, 6d: P3-i a las 48 horas).

15 Figura 7: resultados de expresión génica (qRT-PCR) a las 24 horas (cuantificación relativa, RQ por sus siglas en inglés, calculada con CN a las 24 horas = 1; $RQ < 0,5$ desregulación, $RQ > 2$ regulación al alza) en un modelo de homeostasia para los productos P1-i, P2-i, P3-i.

Figura 8: protocolo de pretratamiento con respecto a la irradiación con rayos UV sobre tejido “raspado” con composiciones de la invención que comprenden la cepa inactivada.

20 Figura 9: protocolo de postratamiento con respecto a la irradiación con rayos UV sobre tejido “raspado” con composiciones de la invención que comprenden la cepa inactivada.

25 Las Figuras 10 y 11 muestran la reducción en la viabilidad del patógeno *C. acnes* DMS1897 expresada en Log₁₀ UFC en insertos cutáneos *in vitro* en las condiciones experimentales: modelo de exclusión y modelo de competición, respectivamente.

Definiciones

30 En el contexto de la presente invención, se utiliza el término “piel” para indicar la primera línea de defensa con respecto al entorno externo; en particular, la defensa es ejercida mediante la acción de queratinocitos dispersos en la capa cutánea externa (epidermis), en la que pueden inducir la secreción de citoquinas y quimiocinas para transportar el mensaje de aviso a las capas más profundas de la piel, generando la respuesta inflamatoria.

En el contexto de la presente invención, se utiliza la expresión “envejecimiento de la piel” para indicar un proceso evolutivo irreversible; se expresa en un conjunto de alteraciones fisiológicas que determinan la pérdida de hidratación de la piel, la aparición de microarrugas, la pérdida de elasticidad, la hiperqueratosis y la formación de puntos hiperpigmentados, denominados “peças seniles”.

35 En el contexto de la presente invención, se utiliza el término “probiótico” para indicar según la definición dada por la FAO y la OMS: “*Microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al anfitrión.* En otras palabras, los probióticos son microorganismos (cepas bacterianas) que demuestran ser capaces, una vez tomados en cantidades apropiadas, de ejercer funciones beneficiosas para el organismo.

40 En el contexto de la presente invención, se utiliza la expresión “ácido hialurónico” para indicar un glucosaminoglucano que consiste en unidades repetidas de glucosamina y ácido glucurónico, unidas entre sí, alternativamente, por enlaces glucosídicos $\beta 1 \rightarrow 4$ y $\beta 1 \rightarrow 3$, al igual que por enlaces intramoleculares de hidrógeno, que estabilizan las conformaciones de las mismas.

Descripción detallada de la invención

45 Un objeto de la presente invención es una composición (sucintamente, composición de la invención o composición) que comprende (I) una mezcla M que comprende, o alternativamente, consta de una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* identificada y depositada como *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (viva y viable o inactivada o un derivado de la misma) y ácido hialurónico o una sal del mismo; y (II) al menos un aditivo y/o excipiente de calidad farmacéutica o cosmética o alimentaria aceptable.

50 Un objeto de la presente invención son dichas composiciones o mezclas M de la invención, que comprenden o, alternativamente, constan de una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* identificada y depositada como la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo (según cualquiera de las realizaciones descritas), para su uso como medicamento.

55 Un primer aspecto de la presente invención versa acerca de una composición (composición de la invención) que comprende probióticos (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viable o inactivada o un derivado de la misma), preferiblemente bacterias probióticas, y ácido hialurónico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento (terapéutico o cosmético), en la prevención o atenuación de al menos un signo o síntoma asociado o provocado por un envejecimiento de la piel (envejecimiento intrínseco o envejecimiento extrínseco, según se definen a continuación).

Dicho signo o síntoma de envejecimiento de la piel está relacionado con una serie de modificaciones que, normalmente, dan lugar al adelgazamiento y/o a la distensión de la estructura cutánea.

Preferiblemente, dicho envejecimiento es un envejecimiento intrínseco, o cronológico, que depende sustancialmente de factores genéticos (o intrínsecos). El envejecimiento intrínseco, en principio, comienza normalmente tras los 25 años de edad. Preferiblemente, dicho signo o síntoma asociado o provocado por un envejecimiento de la piel intrínseco se selecciona entre: arrugas, laxitud de la piel, pérdida o reducción de la integridad de la piel, falta de elasticidad de la piel, falta de tono de la piel, piel más delgada, descamación de la piel y deshidratación de la piel, formación de puntos oscuros o hiperpigmentación de la piel, también denominada "manchas seniles".

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es el uso cosmético de las composiciones o mezclas M de la invención, que comprenden o, alternativamente, constan de una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* identificada y depositada como la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo y, opcionalmente, una primera sustancia y/o una segunda sustancia (según cualquiera de las realizaciones descritas), para el mantenimiento de la homeostasia de la piel, y/o como agente antienvjecimiento de la piel, por ejemplo para el tratamiento cosmético de arrugas, pérdida de elasticidad de la piel (elastosis solar), piel seca o deshidratada, piel áspera, fotoenvejecimiento, enrojecimiento de la piel, presencia de capilares dilatados en las mejillas, nariz y/u orejas, manchas solares, pigmentación o hiperpigmentación anormal o irregular de la piel, o para hacer que la piel sea más clara o más natural.

De forma alternativa, dicho envejecimiento de la piel es extrínseco, es decir provocado por factores medioambientales externos (factores extrínsecos). El envejecimiento extrínseco causado, por ejemplo, por la agresión de agentes externos y/o factores medioambientales tales como la radiación UV (responsable del fotoenvejecimiento), el consumo de cigarrillos, abuso del alcohol, contaminación, contacto continuo con irritantes, frío, viento y combinaciones de los mismos. El fotoenvejecimiento es de interés particular porque está relacionado con numerosas enfermedades o daños de la piel que también puede dar lugar a enfermedades graves, tales como tumores cutáneos.

Preferiblemente, se selecciona dicho signo o síntoma asociado o provocado por un envejecimiento de la piel extrínseco entre: eritema, pigmentación solar o puntos solares, queratosis, preferiblemente hiperqueratosis, enrojecimiento de la piel, eritemas solares, quemaduras, fotoenvejecimiento, elastosis solar, cataratas corticales, pterigión, reactivación de herpes labiales, daño de la piel de cualquier naturaleza (úlceras, herida o magulladura), preferiblemente daño labial y/o conjuntivo, melanoma cutáneo, carcinoma cutáneo escamoso, carcinoma basocelular (basaloma), carcinoma corneal o conjuntival de células escamosas.

El envejecimiento de la piel está relacionado con una alteración en la estructura de la piel, que inevitablemente da lugar a una mayor susceptibilidad a enfermedades y/o infecciones inflamatorias.

En una realización, se utiliza la composición o mezcla M de la invención que comprende probióticos (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viva y viable o inactivada o un derivado de la misma) y ácido hialurónico o una sal del mismo para tratar (método de tratamiento terapéutico), para prevenir o para atenuar al menos un signo o síntoma asociado o provocado por una reducción en el sistema inmunitario de la piel o enfermedades inflamatorias y/o infecciones cutáneas. En otras palabras, se utiliza la composición para potenciar las defensas inmunológicas de la piel.

Se selecciona dicho al menos un signo o síntoma asociado o provocado por una reducción en las defensas inmunológicas de la piel o por condiciones inflamatorias de la piel entre: dermatitis, preferiblemente asociada con irritación o excoriación, acné, dermatosis aguda o crónica (por ejemplo, rosácea o cuperosis), infección cutánea, inflamación cutánea, eritema, úlcera, psoriasis, dermatitis atópica, otitis, rágades, fístula y hemorroides.

Las afecciones o enfermedades cutáneas pueden estar asociadas con patógenos, o ser provocadas por los mismos. En este caso, los patógenos pueden ser bacterias, hongos, levaduras, virus y combinaciones de los mismos.

En una realización, se utiliza la composición o mezcla M de la invención que comprende probióticos (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viable o inactivada o un derivado de la misma) y ácido hialurónico o una sal del mismo para tratar (método de tratamiento terapéutico), para prevenir o para atenuar al menos un signo o síntoma asociado o provocado por una inflamación/infección cutánea, por ejemplo asociada con un agente patógeno, o provocada por el mismo.

Preferiblemente, dichos patógenos son bacterias, preferiblemente bacterias del género *Propionibacterium*, preferiblemente especie *acnes* (*Propionibacterium acnes* o *Cutibacterium acnes*, sucintamente *C. acnes*); *Staphylococcus*, preferiblemente especie *epidermidis*, *aureus*, *warneri*, *pyogenes*, *mitis*; *Corynebacterium ssp*; *Pseudomonas*, preferiblemente especie *aeruginosa*; *Acinetobacter*, preferiblemente especie *johnsonii*; *Streptococcus*, preferiblemente especie *pyogenes*; *Micrococcus ssp.*, *Brevibacterium ssp.*

Los datos experimentales preparados por el solicitante indican que la composición o mezcla M de la invención que comprende ácido hialurónico y probióticos (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viva y viable o inactivada o un derivado de la misma) es capaz de ejercer un efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador a nivel de los queratinocitos y, por lo tanto, de la piel.

Sin entrar en consideraciones teóricas, los usos de la composición son debidos a la capacidad antiinflamatoria, la inmunomodulación, la renovación de las células de la epidermis, la diferenciación de la epidermis y la potenciación de la estructura cutánea favorecidas por probióticos y por el ácido hialurónico contenidos en la composición.

5 En particular, el solicitante ha demostrado que cuando la piel es expuesta a la composición que comprende ácido hialurónico y probióticos es capaz de aumentar el proceso de diferenciación de la epidermis, en particular el estrato córneo se volvió más grueso. Además, se observó que las fibras de colágeno eran más densas y más compactas.

10 Además, la composición de la invención que comprende probióticos (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viable o inactivada o un derivado de la misma) y ácido hialurónico o una sal del mismo es capaz de ejercer un efecto inmunomodulador (o inmunoestimulante) del sistema inmunitario de la piel, como es evidente a partir de la evaluación de la expresión de genes codificantes de quimiocinas y defensinas. En particular, se ha observado un aumento en la expresión de defensiva $\beta 2$ tanto mediante probióticos como mediante la composición de la invención que comprende ácido hialurónico y probióticos.

15 En una realización de la presente invención, los probióticos (presentes en la composición de la invención junto con ácido hialurónico o una sal del mismo) se seleccionan, preferiblemente, entre: bacterias, hongos, levaduras y combinaciones de los mismos; preferiblemente bacterias, más preferiblemente la cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* e identificada como *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (viva, inactivada o un derivado de la misma).

Según un aspecto preferido de la invención, las bacterias que pertenecen a al menos un género seleccionado entre: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*.

20 Más preferiblemente, las bacterias pertenecen al género *Lactobacillus*.

Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Lactobacillus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranoferiens*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y combinaciones de las mismas.

30 Más preferiblemente, los lactobacilos son de la especie *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente la cepa *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 y/o la cepa *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760.

35 Ambas cepas fueron aisladas y depositadas por SOFAR S.p.A.; en particular, la cepa bacteriana *L. casei* DG[®] (marca registrada por Sofar, Italia) fue depositada por SOFAR S.p.A. el 5 de mayo de 1995 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur en París con el número de entrada CNCM I-1572. Inicialmente, a la cepa se le dio el nombre de *Lactobacillus casei* DG sub. casei (reclasificada como *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572).

40 La cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 fue depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 26760 el 15/05/2017 por SOFAR S.p.A. (fecha de solicitud para la conversión del depósito según el tratado de Budapest; fecha del depósito original 11/01/2013).

Las cepas de *Lactobacillus paracasei* fueron reclasificadas como *Lacticaseibacillus paracasei*.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 y ácido hialurónico o una sal del mismo.

45 Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Bifidobacterium* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subfile*, *B. thermacidophilum* *B. thermophilum* y *B. tsurumiense*; más preferiblemente seleccionadas entre:

50 *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium* *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolifus* y *Bacillus marinus*.

Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Propionibacterium* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* y *P. thoenii*.

- Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Streptococcus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus fetus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus zooepidemicus*.
- Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Lactococcus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* y *L. taiwanensis*.
- Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Aerococcus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaequi* y *A. urinaehominis*.
- Según un aspecto adicional preferido de la invención, las bacterias del género *Enterococcus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* y *Enterococcus solitarius*.
- Según un aspecto preferido adicional de la invención, las levaduras pertenecen al género *Saccharomyces*, más preferiblemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Saccharomyces boulardii*.
- En la mezcla o composición de la presente invención, los probióticos, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572 y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, son utilizados (junto con ácido hialurónico o una sal del mismo) vivos; es decir, son utilizadas como probióticos.
- De forma alternativa, dichos probióticos, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572, y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 están muertas y/o inactivadas y/o tinalizadas.
- Por ejemplo, las cepas bacterianas viables (probióticos) de la presente invención (por ejemplo, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) pueden ser inactivadas mediante calentamiento o tinalización o irradiación gamma o sonicación. Dicha inactivación mediante calentamiento o tinalización puede ser llevada a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo desde 50°C hasta 120°C, preferiblemente desde 65°C hasta 105°C, más preferiblemente desde 75°C hasta 95°C, por ejemplo aproximadamente 85°C, durante un tiempo comprendido en el intervalo desde 30 minutos hasta 120 minutos, preferiblemente desde 45 minutos hasta 85 minutos, por ejemplo aproximadamente 60 minutos; o, de forma alternativa, mediante tinalización. El procedimiento de calentamiento o de tinalización o de irradiación gamma o de sonicación es llevado a cabo según las técnicas, los procedimientos y aparatos conocidos por el experto en la técnica.
- Las bacterias sometidas a dicho procedimiento de inactivación mediante calentamiento o tinalización están muertas (control mediante un recuento en placa y/o citofluorimetría) mientras que la pared celular permanece intacta, preferiblemente a un % de bacterias comprendido en el intervalo desde 70% hasta 99,5%, preferiblemente desde 80% hasta 95%, con respecto al número total de bacterias sometidas a dichas técnicas de inactivación por calentamiento o tinalización.
- En una realización adicional, los probióticos, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572 y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, son utilizados (junto con ácido hialurónico o una sal del mismo) en forma de lisado y/o extracto, es decir, son utilizados como paraprobótico.
- De forma alternativa, dichos probióticos, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572 y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, son utilizados (junto con ácido hialurónico o una sal del mismo) en la forma de productos bacterianos seleccionados entre: sobrenadante, metabolitos, bioproductos metabólicos, postbióticos, pared celular y componentes de la misma, exopolisacárido, ribosomas y glucoproteínas, glucanos y otros polisacáridos, lipopolisacáridos y cualquier componente del sobrenadante.
- Sucintamente, en el contexto de la presente invención, el término “derivado/s” de una cepa bacteriana o de una cepa bacteriana viable o probióticos (por ejemplo, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) los paraprobóticos mencionados anteriormente (lisados o extractos) o cualquier derivado y/o componente de la cepa bacteriana (sobrenadante, metabolitos, bioproductos metabólicos, postbióticos, pared celular y componentes de la misma, exopolisacárido, ribosomas y glucoproteínas, glucanos y otros polisacáridos, lipopolisacáridos o cualquier componente del sobrenadante) que, si son administrados (mediante la vía oral o tópica) en cantidades apropiadas, confieren un beneficio al consumidor humano o animal.

En el contexto de la presente invención, el término “probióticos”, a no ser que se especifique lo contrario, indica y comprende cepas bacterianas (por ejemplo, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760), vivas e inactivadas, y derivados de dichas cepas bacterianas, según se ha definido anteriormente.

5 En general, dichos probióticos son microorganismos individuales o combinaciones de microorganismos, o consorcios, de cualquier especie microbiana enumerada en la lista de QPS de la EFSA.

Preferiblemente, la composición según se ha descrito anteriormente comprende una combinación de las cepas documentadas anteriormente con otros microorganismos según se ha descrito anteriormente, seleccionadas, preferiblemente, entre: bacterias, hongos, levaduras y combinaciones de los mismos.

10 Los probióticos, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572 y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, están presentes en la composición (junto con ácido hialurónico o una sal del mismo) con una cantidad mínima suficiente para permitir una colonización temporal de la piel, del intestino y/o de otras regiones del organismo. Preferiblemente, dicha cantidad varía a una concentración comprendida en el intervalo desde 1×10^6 UFC hasta 1×10^{12} UFC, preferiblemente entre 10^8 y 10^{12} unidades de microorganismos, más preferiblemente entre 10^9 y 10^{11} unidades de microorganismos, por ejemplo aproximadamente o por encima de 1×10^9 UFC (unidades formadoras de colonias), con respecto a la ingesta diaria (o dosis unitaria) de la composición de la invención.

15 Los probióticos de la presente invención, preferiblemente la cepa bacteriana *L. casei* DG® CNCM I-1572 y/o la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, son administrados, preferiblemente, en una cantidad variable entre 10^8 y 10^{12} unidades de microorganismos, más preferiblemente entre 10^9 y 10^{11} unidades de microorganismos, por cada ingesta.

20 Según un aspecto preferido, la ingesta de probióticos, preferiblemente bacterias, se lleva a cabo al menos 1-2 veces por día.

25 Según se ha descrito anteriormente, la composición o mezcla M de la invención comprende ácido hialurónico o una sal del mismo y combinaciones de los mismos. Dicho ácido hialurónico o una sal del mismo (sucintamente, AH), comprendido en la composición de la invención junto con la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y, opcionalmente, al menos una sustancia primera o segunda adicional (según cualquiera de las realizaciones descritas), tiene, preferiblemente, un peso molecular medio comprendido en el intervalo desde aproximadamente 10 kDa (kiloDalton = 1.000,00 Dalton o 10^3 Dalton) hasta 3.000 kDa, preferiblemente desde aproximadamente 800 kDa hasta 2.500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1.000 kDa hasta 2.000 kDa, por ejemplo aproximadamente 1.300 kDa, 1.400 kDa, 1.500 kDa, 1.600 kDa, 1.700 kDa, 1.800 kDa. En una realización, se selecciona la sal del ácido hialurónico (por ejemplo, hialuronato de metal alcalino o alcalinotérreo) entre: hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de cinc, hialuronato de cobalto y combinaciones de los mismos.

35 Además, en el contexto de la presente invención, se utiliza la expresión “ácido hialurónico o una sal del mismo” o “AH” o simplemente “ácido hialurónico” para indicar ácido hialurónico como tal, y ácido hialurónico hidrolizado (por ejemplo, obtenido mediante fermentación), al igual que una sal de ácido hialurónico (hialuronato) según se ha descrito anteriormente.

40 Cuando dicho ácido hialurónico de la invención es un ácido hialurónico hidrolizado biotecnológico obtenido mediante fermentación, puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 10 kDa. Cuando dicho ácido hialurónico de la invención es un hialuronato de sodio (por ejemplo, CAS N° 9067-32-7, Pm - *Peso molecular* 1.000-1.400 kDa o Pm 1.000-1.700 kDa) o hialuronato de potasio, puede tener un peso molecular medio comprendido en el intervalo desde aproximadamente 1.000 kDa hasta 2.000 kDa.

Además de *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 y AH, la composición de la invención comprende adicionalmente, de forma ventajosa, excipientes y/o sustancias adicionales (por ejemplo, una primera sustancia o una segunda sustancia, según se describen a continuación) y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

45 Además de *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 y AH y, opcionalmente, una segunda sustancia (definida a continuación), la composición de la presente invención comprende adicionalmente, preferiblemente, una primera sustancia seleccionada entre: plasma, PRP, sustancias cicatrizantes, sustancias reepitelizantes, humectantes, agentes hidratantes, agentes emolientes, agentes adsorbentes, analgésicos, flebotónicos, agentes antiinflamatorios, relajantes musculares, antibióticos, agentes antibacterianos, antimicóticos, antivirales, pesticidas, sustancias peptídicas y/o proteínicas y/o proteínas, tales como colágeno, sustancias que pertenecen a tejido conectivo tales como glucosaminoglicanos, preferiblemente sulfato de condroitina y/o combinaciones de los mismos.

55 En una realización de la presente invención, la composición se formula (por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida) para aplicaciones tópicas o tópicas cutáneas, preferiblemente en forma de crema, gel, aceite, emulsiones (o espuma), disoluciones, dispersiones (sólido-líquido o líquido-líquido), suspensiones, mezclas bifásicas, pulverizaciones (líquidos de nebulización), gasas, yesos, vendajes, lociones, espumas, mascarillas (mascarillas aplicables a la piel), pomadas o pastas.

En una realización de la presente invención, la composición se formula para una administración oral, preferiblemente como un comprimido, cápsula, barra, polvo granular, opérculo, gránulo soluble bucal, bolsita o píldora, suspensiones (por ejemplo, viales bebibles) o soluciones (monofásicas o bifásicas). De forma alternativa, la composición se prepara de forma extemporánea mezclando la composición con agua. De forma alternativa, la composición se prepara de forma extemporánea mezclando entre sí los dos componentes, probióticos (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760) y ácido hialurónico o una sal del mismo, por ejemplo para la preparación de mascarillas que han de ser aplicadas a la piel o suspensiones para un uso oral (viales bebibles). En particular, el dispositivo para la preparación extemporánea de la composición de la invención puede consistir en un vial que comprende una solución acuosa de ácido hialurónico o una sal del mismo y una porción en un extremo del frasco (por ejemplo, para sellar el vial, tal como un tapón) que comprende la cepa bacteriana (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, viable o inactivada o un derivado de la misma) en el mismo en forma sólida de polvo, gránulos o comprimido; la preparación extemporánea de la composición de la invención se produce liberando (por ejemplo, por presión) la cepa bacteriana en forma sólida de la porción en el extremo del vial a la solución de ácido hialurónico o una sal del mismo comprendida en el vial.

Según una realización preferida, además de *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 y AH y, opcionalmente, dicha primera sustancia, la composición de la invención comprende otras sustancias (segunda sustancia) seleccionadas entre: aminoácidos, suplementos, vitaminas, oligoelementos tales como cinc y selenio, macro y micronutrientes, enzimas y/o sustancias prebióticas tales como frustooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), inulina, goma guar o combinaciones de los mismos.

La composición de la invención, que comprende *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, AH y, opcionalmente, una sustancia primera o segunda, comprende, además, dicho (II) al menos un aditivo y/o excipiente de calidad farmacéutica o alimentaria o cosmética, es decir una sustancia carente de una actividad terapéutica adecuada para un uso farmacéutico o alimentario. En el contexto de la presente invención, los aditivos y/o excipientes aceptables para un uso farmacéutico o alimentario o cosmético comprenden todas las sustancias auxiliares conocidas por el experto en la técnica para la preparación de composiciones en forma sólida, semisólida o líquida, tales como, por ejemplo, diluyentes, disolventes (incluyendo agua, glicerina, alcohol etílico), solubilizantes, acidulantes, espesantes, edulcorantes, potenciadores del aroma, colorantes, lubricantes, tensioactivos, conservantes, tampones de estabilización del pH y mezclas de los mismos.

Las composiciones de la invención, que comprenden la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo y, opcionalmente, una sustancia primera y/o segunda, pueden ser composiciones farmacéuticas (o productos bioterapéuticos vivos), composiciones para dispositivos médicos, suplementos dietéticos, alimentos, alimentos novedosos, productos probióticos, composiciones para un alimento para fines médicos especiales (FSMP, por sus siglas en inglés) o composiciones cosméticas.

A continuación, se resumen realizaciones (FRn) de la presente invención:

FR1. Composición que comprende probióticos y ácido hialurónico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento, en la prevención o en la atenuación de al menos un signo o síntoma asociado con/provocado por un envejecimiento de la piel o en el tratamiento, en la prevención o en la atenuación de al menos un signo o síntoma asociado con/provocado por una reducción en el sistema inmunitario de la piel.

FR2. La composición para su uso según FR1, en donde se selecciona el envejecimiento de la piel entre un envejecimiento de la piel intrínseco y un envejecimiento de la piel extrínseco.

FR3. La composición según FR2, en la que se selecciona dicho al menos un signo o síntoma asociado con/provocado por un envejecimiento de la piel intrínseco entre: arrugas, laxitud de la piel, pérdida o reducción de la integridad de la piel, falta de elasticidad de la piel, falta de tono de la piel, piel más delgada, descamación de la piel y deshidratación de la piel.

FR4. La composición para su uso según FR2, en la que se selecciona el al menos un signo o síntoma asociado con/provocado por un envejecimiento de la piel extrínseco entre: eritema, pigmentación, queratosis, preferiblemente hiperqueratosis, enrojecimiento de la piel, quemaduras, cataratas corticales, pterigión, reactivación del herpes labial, daño cutáneo de cualquier naturaleza, preferiblemente daño a los labios y/o a la conjuntiva, melanoma cutáneo, carcinoma escamoso de la piel, carcinoma basocelular (basaloma), carcinoma corneal o conjuntival de células escamosas.

FR5. La composición para su uso según FR1, en la que se selecciona el al menos un signo o síntoma asociado con/provocado por una reducción en el sistema inmunitario de la piel entre: dermatitis, preferiblemente asociada con irritación o exoriación, acné, infección, inflamación de la piel, eritema, úlcera, psoriasis, dermatitis atópica, otitis, rágades, fistula y hemorroides.

FR6. La composición para su uso según una cualquiera de las FR1-5, en la que se seleccionan dichos probióticos, preferiblemente, entre: bacterias, hongos, levaduras y combinaciones de los mismos, preferiblemente son bacterias que pertenecen a al menos un género seleccionado entre: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*.

FR7. La composición para su uso según FR6, en la que las bacterias del género *Lactobacillus* pertenecen a al menos una de las especies seleccionadas entre: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amyolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y combinaciones de las mismas.

FR8. La composición para su uso según FR6 o FR7, en la que las bacterias son de la especie *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente la cepa *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 y/o la cepa *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FR9. La composición para su uso según una cualquiera de las FR precedentes, en la que se selecciona la sal del ácido hialurónico entre: hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de cinc, hialuronato de cobalto y combinaciones de los mismos.

FR10. La composición para su uso según una cualquiera de las FR precedentes, en la que dichos probióticos están vivos y/o muertos y/o inactivados y/o tinalizados, y/o en forma de lisado y/o de extracto, y/o en forma de productos bacterianos seleccionados entre: sobrenadante, metabolitos, bioproductos metabólicos, postbióticos, pared celular y sus componentes, exopolisacárido, ribosomas y glucoproteínas, glucanos y otros polisacáridos, lipopolisacáridos y cualquier componente del sobrenadante.

FR11. La composición para su uso según una cualquiera de las FR precedentes, en la que dichos probióticos están presentes en una cantidad variable entre 10^8 y 10^{12} unidades de microorganismos, preferiblemente entre 10^9 y 10^{11} unidades de microorganismos.

FR12. La composición para su uso según cualquiera de las FR precedentes en forma de crema, gel, aceite, emulsiones, pulverizaciones, gasas, yesos, vendajes, lociones, espumas, mascarillas, pomadas, pastas o formulaciones líquidas para una preparación extemporánea.

En el contexto de la presente invención, se utiliza la expresión “tratamiento” o “tratamiento terapéutico” o “método de tratamiento” para indicar una intervención sobre un sujeto necesitado, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición o mezcla M de la invención, con el fin de la eliminación, la reducción/disminución o prevención de una patología o enfermedad y de los síntomas o trastornos de la misma.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a la cantidad de compuesto activo y/o de cepa bacteriana que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, mamífero o ser humano que es buscada y definida por un individuo, investigador, veterinario, médico u otro clínico o profesional de la salud.

En el contexto de la presente invención, se utiliza el término “sujetos” para indicar sujetos humanos o sujetos animales (por ejemplo, mascotas, tales como perros o gatos u otros mamíferos). Preferiblemente, las composiciones de la invención son para su uso en métodos de tratamiento médico o para un uso cosmético en sujetos humanos.

En el contexto de la presente invención, se utiliza la expresión “dispositivo médico” con el significado según el Decreto Legislativo nº 46 fechado el 24 de febrero de 1997, o según el nuevo Reglamento de Dispositivos Médicos (EU) 2017/745 (MDR, por sus siglas en inglés).

En el contexto de la presente invención, la expresión “alimento novedoso” con el significado según el Reglamento EC 258 fechado en 1997.

A no ser que se especifique lo contrario, se utiliza la expresión composición o mezcla u otro que comprende un componente en una cantidad “comprendida en un intervalo desde x hasta y” para indicar que dicho componente puede estar presente en la composición o mezcla o extracto u otro en todas las cantidades presentes en dichos extremos de intervalo, aunque ello no se especifique, del intervalo comprendido.

Ejemplos

Ejemplo-A

Crema según la invención que comprende la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo: para preparar dicha crema, se disolvió la cepa LPC-S01 DSM 26760 (viable o inactivada) —liofilizada en forma de polvo o cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC)— en 13 ml de una crema a base de ácido hialurónico (sucintamente, crema de AH).

Ejemplo de la composición de la crema de AH (% peso/peso):

- agua (disolvente) q.s. al 100%;
- sustancias funcionales: octocrileno (filtro UV-B) 2-8% (4,5%), BMDBM encapsulado estabilizado con octocrileno (filtro UV-B) 0,1-5% (2%), manteca orgánica de karité (*Butyrospermum parkii* = karité) (CAS N° 194043-92-0) 0,1-4% (1%), complejo de colágeno y pantenol 0,1-4% (1%), butil metoxidibenzoilmetano (filtro UV-A) 0,1-4% (1%), vitamina E 0,01-1% (0,3%), tallos de *Gardenia jasminoides* 0,01-1% (0,1%), ácido hialurónico de bajo peso molecular (por ejemplo, CAS N° 9004-61-9) 0,005-1% (0,05%), ácido hialurónico de peso molecular medio/elevado (por ejemplo, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,02%);
- excipientes y aditivos (2-10% p/p, según requisitos técnicos conocidos por el experto en la técnica): antioxidantes (por ejemplo, acetato de tocoferol), conservantes (por ejemplo, fenoxietanol, sorbato de potasio), tensioactivos-emulsionantes (por ejemplo, glucósido de cetearilo, alcohol cetílico), estabilizante de emulsión (por ejemplo, carbómero), disolventes (por ejemplo, 1,2-hexanodiol), abrasivos (por ejemplo, sílice), aglutinante (por ejemplo, PVP), humectante (por ejemplo, glicerina) y/o agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, dimeticona, goma xantana, tropolona).

Ejemplo-B

Mascarilla según la invención que comprende la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico o una sal del mismo: para preparar dicha mascarilla, se disolvió la cepa LPC-S01 DSM 26760 (viable o inactivada, preferiblemente viable) —liofilizada en forma de un polvo o cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC)— en una solución acuosa de ácido hialurónico o una sal del mismo, por ejemplo, una solución que tiene los componentes documentados en la Tabla A, en la que hay presentes ácido hialurónico (por ejemplo, CAS N° 9004-61-9) 0,01-2% (0,1%) y ácido hialurónico de peso molecular medio/elevado (por ejemplo, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,05%) con un % en peso/peso (con respecto al peso total de dicha solución acuosa de ácido hialurónico).

Tabla A

Ingrediente	CAS N°
agua	7732-18-5
propanodiol	504-63-2
hialuronato de sodio	9067-32-7
fenoxietanol	122-99-6
1,2-hexanodiol	6920-22-5
caprililglicol	1117-86-8
ácido hialurónico hidrolizado	9004-61-9
Hidróxido de sodio	1310-73-2
aditivos/excipientes	-

- cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 inactivada mediante calentamiento:

Parte experimental - (1)

MODELO Episkin T-Skin™ (modelo de piel tridimensional)

Episkin T-Skin™ (sucintamente, T-Skin o “Piel de grosor completo” o piel tridimensional) es un modelo de piel tridimensional reconstruido *in vitro*, que incluye la dermis y la epidermis (modelo de piel de grosor completo).

- Episkin T-Skin™ es una piel reconstruida *in vitro* que consiste en un equivalente de piel con fibroblastos humanos superpuestos en una epidermis estratificada bien diferenciada derivada de queratinocitos humanos normales cultivados en un filtro de policarbonato inerte.

Los modelos de piel humana reconstruida *in vitro* son más parecidos —en términos de morfología (epitelio de múltiples capas), propiedades bioquímicas y fisiológicas— a tejidos humanos *in vivo* y son ahora la alternativa más prometedora a animales, a explantes *ex vivo* y a monocapas celulares sumergidas para la evaluación de la eficacia y de la seguridad de una aplicación tópica de productos (Gordon et al. 2015, Zuang V. 2016).

La relevancia biológica y la predictividad de estos modelos se derivan de la presencia de un tejido organizado con distintas capas de células vivas que permiten evaluar productos aplicados tópicamente a dosis clínicas y condiciones de exposición realistas. El tratamiento de la piel humana con productos aplicados localmente, tales como cosméticos, da lugar a una respuesta genómica que tiene una vía dinámica y representa la primera señal celular, al nivel de transcripción, responsable de una cascada de eventos. Los tejidos humanos tridimensionales son sistemas relevantes de ensayo para estudiar el mecanismo de acción y evaluar la eficacia de un producto teniendo en cuenta tanto la respuesta genómica directa como los resultados de la comunicación celular y cruzada mediante mediadores solubles y la expresión de biomarcadores específicos.

- I. Modelo homeostático (no inflamatorio) en el modelo Episkin T-Skin™

En el presente estudio *in vitro* del modelo homeostático en el modelo Episkin T-Skin™, se evaluó la eficacia en términos de beneficios para la homeostasia de la piel de composiciones según la invención que comprenden ácido hialurónico (AH) y una cepa bacteriana LPC-S01 DSM 26760 viable o inactivada para explorar su aplicación potencial y su eficacia para el cuidado de la piel.

5 El fin del estudio es estudiar el perfil de tolerancia de la piel a composiciones según la invención tras una exposición a concentraciones elevadas y evaluar su eficacia en:

- la potenciación de la autodefensa de la piel mediante la inducción de péptidos antimicrobianos,
- la estimulación de la respuesta inmunitaria innata de queratinocitos, renovación y diferenciación epidérmicas,
- la inducción de una renovación positiva de los compartimentos epidérmico y dérmico, actuando como agente antienvjecimiento.

1.1. Cepa bacteriana VIABLE - MODELO HOMEOSTÁTICO

1.1.1. Productos objeto de análisis y control

- Control negativo (CN): solución de NaCl al salina 0,9%.
- P1: cepa viable LPC-S01 DSM 26760 resuspendida en solución salina;
- P2: solución acuosa a base de ácido hialurónico (como en el Ejemplo-B (mascarilla) documentada anteriormente);
- P3: cepa viable LPC-S01 DSM 26760 resuspendida en solución acuosa a base de ácido hialurónico.

Para preparar P3, se disolvió el contenido de una cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC) de la cepa LPC-S01 DSM 26760 viable liofilizada en 13 ml de una solución acuosa a base de ácido hialurónico.

Para preparar P1 (solo la cepa), se resuspendió el contenido de una cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC) de una cepa LPC-S01 DSM 26760 viable liofilizada en 13 ml de solución salina.

1.1.2. Evaluación metodológica del aumento en la autodefensa y de la capacidad de renovación celular

Se evaluó el aumento en la autodefensa y de la capacidad de renovación celular de la cepa probiótica LPC-S01 (*Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, viable; P1), de la cepa probiótica LPC-S01 (viable) + ácido hialurónico (P3) y ácido hialurónico (P2) en un modelo de piel tridimensional reconstruido *in vitro* que reproduce los compartimentos de la dermis y de la epidermis y, por lo tanto, permite estudiar las modificaciones de la matriz extracelular de la dermis y la diferenciación de capas cutáneas viables (modelo de "piel de grosor completo").

El estudio se centró en la evaluación del efecto de la cepa LPC-S01 DSM 26760, ácido hialurónico y una composición que comprende la cepa LPC-S01 + ácido hialurónico sobre la activación de una respuesta inmunitaria, la diferenciación celular de la epidermis y la renovación celular de la dermis. Se aplicaron (30 μ l) la cepa LPC-S01 DSM 26760, ácido hialurónico y la composición que comprende la cepa LPC-S01 probiótica + ácido hialurónico directamente a la superficie del modelo de piel tridimensional, incubadas durante 8 horas y luego enjuagadas utilizando solución salina para eliminar el producto sobrante. Se cultivaron los tejidos durante 16 horas adicionales antes del análisis, para imitar una exposición realista de una mascarilla facial durante 24 horas.

Se utilizó una solución salina como el control negativo (CN).

Se analizaron los siguientes parámetros con respecto al control negativo (según procedimientos conocidos por el experto en la técnica):

- análisis histológico mediante tinción tricrómica de Masson;
- expresión génica (qRT-PCR) de los biomarcadores principales de defensa de la piel (HBD2 y CCL27), respuesta inmunitaria innata (TLR2), diferenciación epidérmica (KRT14, LOR e IVL), renovación epidérmica (HAS-2, CD44, Colágeno III, IV y XIII, KGF y EGF);
- daño celular cuantificando la liberación de adenilato quinasa (sucintamente AK, por sus siglas en inglés) (ensayo Toxilight).

Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado biológico.

I.1.2.1. Análisis histomorfológico mediante tinción tricrómica de Masson

Al final del tratamiento los tejidos fueron lavados con solución salina y fijados en formol al 10%. Las secciones de tejido fueron marcadas utilizando el *kit* tricrómico de Masson (Abcam 150686) según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra, se llevaron a cabo 3 adquisiciones microscópicas en 3 partes distintas de la sección. Se analizaron muestras histológicas con un microscopio óptico (ampliación de 20x y 40x) y se evaluaron las modificaciones morfológicas del tejido.

1.1.2.2. Análisis de PCR en tiempo real

Al final del tratamiento, se recogieron tejidos en tampón de lisis para una extracción de ARN y transcripción inversa de ADNc. Se evaluó la integridad del ARN cargando el ARN extraído en gel de agarosa al 1%: se detectaron bandas ribosomales 18S y 28S. Se utilizó GAPDH como un gen de control endógeno para normalizar las cantidades introducidas. El análisis de los datos obtenidos fue llevado a cabo utilizando procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

1.1.3. Resultados de la activación en la autodefensa y de la capacidad de renovación celular

1.1.3.1. Resultados del análisis histomorfológico mediante tinción tricrómica de Masson

Después de la incubación con la solución salina, el control negativo (Figura 1A) no mostró ningún cambio de morfología ni/o estructural, tanto en la epidermis como en la dermis. La distribución de fibras de colágeno estaba orientada y comprendía fibroblastos.

Un tratamiento con la cepa LPC-S01 DSM 26760 (viable) no indujo alteraciones significativas en la estructura de la epidermis y de la dermis. Las fibras de colágeno y su distribución mostraron un grosor reducido y una densidad reducida de las fibras con respecto al control negativo (Figura 1B).

Un tratamiento con ácido hialurónico no indujo alteraciones significativas en la estructura de la epidermis y de la dermis. Las fibras de colágeno mostraron una densidad reducida en comparación con el control negativo (Figura 2A).

El tratamiento con la cepa probiótica LPC-S01 DSM 26760 (viable) + ácido hialurónico fue capaz de modificar la morfología de la epidermis, en particular del estrato córneo que era más delgado, aumentando el proceso de diferenciación (Figura 2B).

1.1.3.2. Resultados de la PCR en tiempo real (qRT-PCR)

La Tabla 1 muestra la cuantificación relativa (RQ), con respecto al control negativo, de los valores obtenidos mediante PCR en tiempo real, de los tejidos tratados con LPC-S01 DSM 26760 (viable), ácido hialurónico y LPC-S01 DSM 26760 (viable) + ácido hialurónico.

Tabla 1

Compartimento	Función	Biomarcador	LPC-S01	Ácido hialurónico	Ácido hialurónico + LPC-S01
Epidermis	Defensa de la piel	Defensina humana β 2	5,80	0,59	2,18
		CCL27	1,12	0,87	0,96
	Respuesta inmunitaria innata	TLR2	1,94	0,93	1,38
	Diferenciación de la epidermis	Citoqueratina 14	1,11	0,96	1,23
		Loricrina	0,59	1,35	1,68
		Involucrina	1,50	0,98	1,30
	Estructura de la epidermis	Colágeno XIII	0,91	1,06	0,92
		KGF	0,61	1,08	0,37
EGF		0,95	1,09	1,61	
Dermis	Renovación celular, antienvjecimiento, matriz celular	HAS-2	0,53	1,08	0,53
		CD44	1,09	1,00	1,10
		Colágeno III	0,45	0,75	0,33
		Colágeno IV	1,00	1,01	0,12

Un tratamiento con probiótico LPC-S01 DSM 26760 induce un aumento en la defensina humana β 2 (HBD2) y TLR2. Estos datos son coherentes con las propiedades inmunomoduladoras del probiótico e indican su capacidad para activar las defensas de la piel y potenciar la respuesta inmunitaria innata de la piel.

Un tratamiento con ácido hialurónico + LPC-S01 DSM 26760 provoca un aumento en la expresión de HBD2 en comparación con el tratamiento con ácido hialurónico. Se observó una reducción en los valores de Colágeno III y de HAS-2 (como ya se observó en el tratamiento probiótico por sí solo), mientras que también se observó una reducción en el KGF.

En general, los resultados obtenidos indican que cuando se aplica por sí solo, el probiótico LPC-S01 DSM 26760 ejerce un efecto positivo sobre la piel reforzando su inmunidad innata (basada en TLR2 y HBD-2).

5 El ácido hialurónico aplicado por sí solo no ejerce un efecto positivo sobre la piel; al contrario, la LPC-S01 introducida en la misma formulación con ácido hialurónico es capaz de mantener su actividad principal en la potenciación de la defensa innata de la piel.

I.1.3.4. Resultado de la liberación de adenilato quinasa (ensayo Toxilight)

Los niveles de adenilato quinasa liberada por tejidos tratados con los productos objeto de estudio indican una buena biocompatibilidad de los productos tras 8 y 16 horas de incubación.

I.1.4. Conclusiones

10 Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con ácido hialurónico + LPC-S01 DSM 26760 (viva y viable) fue lo más prometedor, mostrando una eficacia positiva sobre la mejora del proceso de diferenciación de la piel, sobre la renovación de la piel y reforzando generalmente la estructura del compartimento dérmico aumentando la red de colágeno. La administración combinada de ácido hialurónico y el probiótico LPC-S01 DSM 26760 (P3) ha mostrado, por lo tanto, un efecto sinérgico en el refuerzo de la estructura de la dermis, interviniendo sobre factores clave de diferenciación y renovación celulares. Este efecto sinérgico no era predecible, dado que la administración de ácido hialurónico y del probiótico LPC-S01 DSM 26760 por separado no mostró un efecto significativo sobre la diferenciación de la piel.

I.2. Cepa bacteriana INACTIVADA - MODELO HOMEOSTÁTICO

I.2.1. Productos objeto de análisis y control

- 20 - control negativo (CN): solución salina de NaCl al 0,9%;
- P1-i.: cepa inactivada LPC-S01 DSM 26760 resuspendida en solución salina (10^9 células/tejido), utilizar una concentración de 2 g de LPC-S01/ml;
- 25 - P2-i.: crema a base de ácido hialurónico (como en el Ejemplo-A (crema) documentada anteriormente);
- P3-i.: cepa inactivada LPC-S01 DSM 26760 resuspendida en crema a base de ácido hialurónico (similar a P2-i.) (10^9 células/tejido), utilizar una concentración de 2 g de células/ml.

30 Para preparar P3-i., se disolvió el contenido de una cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC) de la cepa LPC-S01 DSM 26760 inactivada liofilizada en una crema a base de ácido hialurónico.

Para preparar P1-i. (solo la cepa), se resuspendió el contenido de una cápsula de polvo (aproximadamente 8×10^9 UFC) de una cepa LPC-S01 DSM 26760 inactivada liofilizada en una solución salina.

I.2.2. Inactivación de la cepa bacteriana objeto de análisis

35 Material de partida: células bacterianas viables de la cepa LPC-S01 DSM 26760 en forma liofilizada con un recuento de células viables de 2×10^{11} células/g de polvo.

El día antes del tratamiento, se pesaron y resuspendieron 2 g de polvo en 4 ml de solución salina para obtener una suspensión de 10^{11} células bacterianas/ml de solución salina. Se utilizaron 30 μ l de esta suspensión para verificar la carga bacteriana eficaz mediante un recuento sobre el agar MRS.

40 El día del tratamiento, se inactivó por calor la suspensión de cepas bacterianas preparada en solución salina incubando la suspensión bacteriana a 85°C durante 1 hora. Tras este periodo, se dividieron las bacterias en 4 tubos *Eppendorf* de ensayo (cada uno de 1 ml, correspondiente a 10^{11} células bacterianas) y fueron centrifugados. Entonces, se resuspendió el sedimento en:

- 1 ml de solución salina, obteniendo P1-i.
- 45 - 1 ml de crema a base de ácido hialurónico, obteniendo P3-i.

I.2.3. Metodología

Se aplicaron los productos que están siendo analizados y en un control negativo (P1-i., P2-i., P3-i., CN: 15 μ l) directamente sobre la superficie de los tejidos del modelo T-Skin durante 24 horas y 48 horas en condiciones de homeostasia. Al aplicar 15 μ l de suspensiones de P1-i y P3-i., se aplicaron 10^9 bacterias/tejido.

50 Se analizaron los siguientes parámetros con respecto al control no tratado (control negativo, CN):

- análisis histomorfológico con tinción con H y E (hematoxilina y eosina);
- expresión génica (mediante RT-qPCR) de los biomarcadores principales de defensa de la piel (defensina humana $\beta 2$ (DEFB4)), respuesta inmunitaria innata (TLR2, TNF α), diferenciación y renovación epidérmica (TGMS-1, CCND1, TGF- $\beta 1$).

Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado biológico.

1.2.4. Resultados

1.2.4.1. Resultados del análisis histomorfológico con hematoxilina y eosina a las 24 horas y 48 horas

Se preparan tres secciones de tejido vertical (que consisten en 3 réplicas) en cada portaobjetos histológico; se llevaron a cabo 5 adquisiciones microscópicas en la sección seleccionada. Para cada réplica biológica, se documenta la adquisición más representativa de la sección vertical seleccionada. Se calculó el grosor medio en 5 adquisiciones microscópicas.

Se documentan los resultados a continuación:

CN a las 24 horas (Figura 6a):

- epidermis: completamente viable y con una estructura laminar SC (*estrato córneo*) normal;
- unión dermoepidérmica: se observa la integridad de la estructura;
- distribución de fibras y colágeno: orientadas y comprenden muchos fibroblastos.

P1-i. a las 24 horas (no mostrada en la figura):

- epidermis: se observan diferencias en la misma réplica, probablemente relacionadas con una distribución no homogénea; hay visibles muchas células que muestran una activación y proliferación metabólicas; pocos núcleos picnóticos; la estructura laminar SC no parece estar modificada de forma significativa;

P3-i. a las 24 horas (Figura 6b):

- epidermis: se observan diferencias en la misma réplica, probablemente relacionadas con una distribución no homogénea; hay visibles muchas células que muestran una activación y proliferación metabólicas; pocos núcleos picnóticos; la estructura laminar SC (*estrato córneo*) parece modificada de forma significativa;
- unión dermoepidérmica: se observa la integridad de la estructura;
- distribución de fibras y colágeno: orientadas, densas, compactas e incluyen muchos fibroblastos.

CN a las 48 horas (Figura 6c):

- epidermis: completamente viable y con una estructura laminar SC (*estrato córneo*) normal;
- unión dermoepidérmica: observado un desprendimiento y una pérdida de integridad (fragilidad intrínseca de tejidos);
- distribución de fibras y colágeno: orientadas y comprenden muchos fibroblastos.

P1-i. a las 48 horas (no mostrada en la figura):

- epidermis: se observa una epidermis completamente diferenciada; el tejido muestra un SC modificado —en términos de estructura y grosor— debido a una proliferación y una diferenciación mayores.

P3-i. a las 48 horas (Figura 6d):

- epidermis: se observan diferencias en la misma réplica, probablemente relacionadas con una distribución no homogénea; hay visibles muchas células que muestran una activación metabólica y prolifera; pocos núcleos picnóticos; la estructura laminar SC (*estrato córneo*) parece modificada debido a una mayor proliferación;
- unión dermoepidérmica: se observa la integridad de la estructura;
- distribución de fibras y colágeno: orientadas y comprenden muchos fibroblastos; más densas y compactas con respecto al control negativo.

Los datos documentados anteriormente demuestran que la composición P3-i. (cepa inactivada + AH) actúa en tiempos más breves y con mayor eficacia que la composición P1-i (únicamente cepa inactivada), dado que después de aplicar al tejido P3-i a las 24 horas la estructura laminar de SC (*estrato córneo*) parece modificada, mientras que después de aplicar P1-i. es necesario esperar 48 horas antes de observar una modificación de la estructura laminar del SC.

5 I.2.4.2. Resultados de PCR en tiempo real

I.2.4.2.1. Resultados de PCR en tiempo real a las 24 horas

La Figura 7 muestra los resultados de expresión génica (qRT-PCR) a las 24 horas (RQ calculada) con CN a las 24 horas = 1; RQ<0,5 desregulación, RQ>2 regulación al alza).

10 Los resultados de la cuantificación relativa (RQ, por sus siglas en inglés) de la expresión génica (qRT-PCR) obtenidos en tejidos tratados con las composiciones que están siendo analizadas (P1-i., P2-i., P3-i.) a las 24 horas se resumen en la Figura 7 a continuación. Los resultados se expresan con respecto al control negativo (CN a las 24 horas = 1; RQ<0,5 desregulación, RQ>2 regulación al alza).

Como una consideración general, la aplicación no completamente homogénea de las composiciones que están siendo analizadas condujo a una alta variabilidad biológica entre las tres réplicas.

15 Tras 24 horas de tratamiento:

- La cepa probiótica inactivada que está siendo analizada, por sí sola (P1-i) o incluida en la composición que comprende AH (P3-i), indujo la regulación al alza de la defensina humana $\beta 2$ (DEFB4). Estos datos son coherentes con las propiedades inmunomoduladoras de la cepa LPC-S01 DSM 26760 viable observada en la sección 1.1.3.1. e indican su capacidad para activar las defensas de la piel incluso en una condición no viable. Por lo tanto, la actividad inmunomoduladora puede correlacionarse con elementos expuestos de manera externa en la pared celular bacteriana.

- La composición que comprende AH únicamente (P2-i) no moduló la defensina humana $\beta 2$ (DEFB4): este resultado confirma que la regulación al alza de DEFB4 en P3-i. (cepa + AH) está relacionada exclusivamente con la presencia de la bacteria.

- La composición P3-i. (cepa + AH) indujo la regulación al alza de la defensina humana $\beta 2$ (DEFB4) a las 24 horas de una forma más elevada (aunque no significativa) en comparación con P1-i. (cepa únicamente). Se cuantificó una regulación significativa de TNF α , indicando la inducción de una respuesta inflamatoria, probablemente debida al reconocimiento inmunitario de las bacterias, por la superficie de la piel. Dado que no se observa este efecto en el tejido tratado con P2-i. (AH únicamente), este resultado puede estar relacionado con la dosis elevada de cepa LPC-S01 DSM 26760 incluida en la composición P3-i.

I.2.4.2.2. Resultados de la PCR en tiempo real a las 24 horas

35 Se confirma la inducción de la defensina humana $\beta 2$ (DEFB4) por la cepa bacteriana inactivada que está siendo analizada (tanto en P1-i. como en P3-i.), con valores superiores a los del instante de las 24 horas (sección I.2.4.2.1.), indicando una respuesta biológica estable y el refuerzo de las defensas de la piel, lo que tiene como resultado un mecanismo eficaz de protección.

I.2.5. Conclusiones

40 En el modelo homeostático (no inflamatorio), la composición según la invención P3-i. (cepa inactivada + AH), que comprende la combinación de una cepa bacteriana LPC-S01 DSM 26760 inactivada y ácido hialurónico, fue bien tolerada en el modelo de piel tridimensional y fue capaz de estimular las defensas del cuerpo y procesos de diferenciación celular en comparación con los componentes individuales y/o con el control negativo.

En particular, se alcanzan los niveles de eficacia de la composición de la invención P3-i. (cepa inactivada + AH) en tiempos más breves en comparación con la cepa bacteriana no en combinación con ácido hialurónico (P1-i.).

II. MODELO INFLAMATORIO en el modelo Episkin T-Skin™

45 Se evaluó la capacidad de las composiciones según la invención, que comprenden una cepa bacteriana LPC-S01 DSM 26760 (viable o inactivada) y ácido hialurónico, para reducir el daño provocado por la radiación UV en un modelo de piel tridimensional completa reconstruida *in vitro* que reproduce los compartimentos de la dermis y de la epidermis (modelo T-Skin™), permitiendo, por lo tanto, estudiar los cambios de la matriz extracelular de la dermis y la diferenciación de las capas viables (modelo de piel de grosor completo).

50 Dicha evaluación fue llevada a cabo según dos modelos, modelo inflamatorio A (pretratamiento en tejido no dañado) y modelo inflamatorio B (pre y postratamiento en tejido dañado), documentados a continuación.

II.A. MODELO INFLAMATORIO A para CEPA BACTERIANA VIABLE o INACTIVADA

II.A.1. Productos que están siendo analizados y controles

- P1: LPC-S01 DSM 26760 viable resuspendida en solución salina,
- 5 - P2: solución a base de ácido hialurónico (véase I.1.1. Mascarilla);
- P3: LPC-S01 DSM 26760 viable resuspendida en una solución a base de ácido hialurónico,
- P1-i.: LPC-S01 DSM 26760 inactivada y resuspendida en la solución salina,
- 10 - P2-i.: solución a base de ácido hialurónico (véase I.1.1. Mascarilla);
- P3-i.: LPC-S01 DSM 26760 inactivada resuspendida en una solución a base de ácido hialurónico,
- Control positivo (CP): tejido tratado con una solución salina de NaCl al 0,9%, abradido y expuesto a radiación UV.
- 15 - Control negativo (CN): tejido tratado con una solución salina de NaCl al 0,9% sin exposición a radiación UV.

Se prepararon P1 (cepa viable únicamente) y P3 (cepa viable + AH) resuspendiendo el contenido de una cápsula de cepa bacteriana liofilizada (8×10^9 UFC) en 13 ml de solución salina que comprende ácido hialurónico, respectivamente.

20 Se prepararon P1-i. (cepa inactivada únicamente) y P3-i. (cepa inactivada + AH) resuspendiendo el contenido de una cápsula de cepa bacteriana liofilizada (8×10^9 UFC) en una solución salina e incubada a 85°C durante 1 hora. Tras este periodo, se centrifugaron las bacterias y se suspendió el sedimento en 13 ml de solución salina (o crema) a base de ácido hialurónico, respectivamente.

II.A. Procedimiento de evaluación de la reducción del daño por rayos UV

25 Se evaluó la reducción del daño por rayos UV de la cepa probiótica LPC-S01 DSM 26760 (viva y viable o inactivada) en el modelo de "piel de grosor completo", según se ha descrito anteriormente. El estudio consideró el efecto de la cepa LPC-S01, ácido hialurónico y una composición que comprendía la cepa LPC-S01 DSM 26760 + ácido hialurónico sobre la morfología de tejidos marcados con hamatoxilina-eosina y sobre la activación del inflammasoma en respuesta a una irradiación UV. La cepa LPC-S01 DSM 26760, ácido hialurónico y la composición que comprende la cepa probiótica LPC-S01 DSM 26760 + ácido hialurónico fueron aplicadas directamente a la superficie del modelo de piel tridimensional, incubadas durante la noche y subsiguientemente enjuagadas utilizando solución salina para eliminar el producto sobrante (etapa de pretratamiento). El tejido fue abradido ligeramente y luego expuesto a 1 MED (dosis eritemogénica mínima, por sus siglas en inglés) de UV para imitar una exposición solar normal. La activación de la inflamación fue verificada 4 y 24 horas tras su exposición a rayos UV. Se utilizó un tejido tratado con solución salina y expuesto a rayos UV como un control positivo. Se utilizó un tejido tratado con una solución salina y no expuesto a rayos UV como control negativo.

Se analizó la evaluación de la eficacia de las composiciones que están siendo analizadas en la reducción del daño provocado por los rayos UV, según procedimientos conocidos por el experto en la técnica, mediante:

- Procedimiento de inmunotinción con NF κ B;
- 40 - Análisis histomorfológico con tinción con hematoxilina/eosina (H y E); y
- Procedimiento de cuantificación de IL-1 β (únicamente en la cepa viable).

II.A.3. Resultados de la reducción del daño por rayos UV (modelo inflamatorio A)

II.A.3.1. Resultados de inmunotinción con NF κ B

45 La Figura 3 resume los resultados de la cuantificación de la translocación de NF κ B tras 4 horas desde la exposición a los rayos UV (composiciones que están siendo analizadas que comprenden cepas viables). Cuatro horas tras la irradiación, el control positivo (CP) mostró un número elevado de translocaciones de NF κ B, en particular en la capa suprabasal de la epidermis.

50 Los tratamientos con LPC-S01 DSM 26760 (P1), con la cepa LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico (P2) y con ácido hialurónico (P3) inhiben la translocación nuclear de NF κ B significativamente con respecto al control positivo.

El tratamiento con probiótico LPC-S01 DSM 26760, LPC-S01 DSM 26760 + ácido hialurónico y ácido hialurónico ha mostrado, por lo tanto, una capacidad para prevenir la activación de la inflamación inhibiendo la translocación de NF κ B en el núcleo de células sometidas a un ataque con rayos UV.

55 Además, la Tabla 2 muestra los datos semicuantitativos de la translocación nuclear de NF κ B determinados para un tiempo de pretratamiento de 16 horas (a largo plazo) con las composiciones que están siendo analizadas que

comprenden las cepas viables (P3) o las cepas inactivadas (P3-i), y la evaluación de parámetros 4 horas tras una exposición a rayos UV, útil para evaluar el efecto del tratamiento a largo plazo.

5 La relevancia biológica y la reproducibilidad de dicho modelo de inflamasoma (exposición a rayos UV a 1 MED, dosis eritémica mínima, por sus siglas en inglés) fueron confirmadas por un aumento en la translocación de NFκB en el núcleo celular en las muestras irradiadas (control positivo) en comparación con las muestras no irradiadas (control negativo).

El aumento relativo en la translocación de NFκB (diferencia porcentual) en el estudio con la composición P3-i con cepas inactivadas (+ 70,7%, w = 0,01) es comparable al cuantificado en el estudio con la composición P3 con cepas viables (+83,7%, w = 0,01).

10 Tabla 2

		Translocación de NFκB (Media±desvt.típ.)	
Control negativo	CN	11,0±2,1	25,7±8,3
Control positivo	CP	18,8±4,8 (+70,7% w=0,01)	47,2±6,2 (+83,7 w=0,01)
Tratamiento		16h (ON)	
Cepa (viable) + AH	P3	-	29,6 ± 6,3 (-37,3% w=0,00)
Cepa (inactiva) + AH	P3-i	16,0±3,2 (+14,8)	-

Además, a las 24 horas P3 mostró una reducción en el contenido citoplasmático de NFκB en comparación con el control positivo (datos no medidos para P3-i).

II.A.3.2. Resultados histomorfológico con tinción con hematoxilina y eosina

15 Las Figuras 4 y 5 muestran los tejidos tratados con una solución salina (control positivo) (A), con el probiótico LPC-S01 DSM 26760 (B), con ácido hialurónico (C) y con LPC-S01 DSM 26760 (viable) + ácido hialurónico (D), respectivamente, 4 y 24 horas tras el ataque con rayos UV (histomorfológica con tinción con hematoxilina y eosina).

20 Como puede verse, en ambas figuras, el tratamiento con ácido hialurónico y el tratamiento con el probiótico LPC-S01 DSM 26760 no son capaces de reducir el daño inducido por los rayos UV. En particular, son visibles los signos de eritemas solares inducidos por rayos UV en la capa basal y en la capa espinosa de la epidermis. Además, la unión dermoepidérmica es dañada por los rayos UV y la epidermis no se adhiere completamente a la dermis, un signo de una estructura cutánea alterada (Figuras 4A, 4B, 5A y 5B).

25 El tratamiento con ácido hialurónico + probiótico LPC-S01 DSM 26760 es capaz de reducir el daño inducido por los rayos UV tras 4 y 24 horas desde la inducción del daño. En particular, la estructura tanto de la dermis como de la epidermis es más compacta en comparación con el tratamiento con ácido hialurónico y con el probiótico LPC-S01 DSM 26760 administrados individualmente. Además, la estructura de la unión dermoepidérmica se mantiene mejor, favoreciendo una mejor adherencia de la epidermis a la dermis (Figuras 4D y 5D).

30 Este efecto sinérgico de la administración conjunta de ácido hialurónico y de probiótico LPC-S01 DSM 26760 no era predecible, dado que ni el ácido hialurónico por sí solo ni el probiótico administrado por sí solo fueron capaces de reducir la "liberación" de la epidermis de la dermis y, por lo tanto, no podían mantener la estructura fisiológica de la piel.

II.A.3.3. Resultados de cuantificación de IL-1β

35 Se cuantificó la IL-1β a las 4 horas para la composición P3 según la invención, que comprende la cepa viable y ácido hialurónico, hacia un control negativo y el control positivo (Tabla 3). Los resultados no pueden ser considerados datos cuantitativos dado que la señal era inferior al límite de detección del *kit* (límite de 3,91 pg / ml). Los resultados se indican para proporcionar una tendencia global.

Tabla 3

	CN	CP	P3a
IL-1β (pg/ml)	2,12	2,74	1,84

II.A.4. Conclusiones

40 Se utilizó un modelo experimental en T-skin™ (piel de grosor completo) basado en vías inflamatorias inducidas por rayos UVA + UVB (dosis 1 MED) para evaluar la eficacia de las composiciones P3 y P3-i según la invención, que comprendían una cepa bacteriana LPC-S01 DSM 26760 (viable o inactivada, respectivamente) y ácido hialurónico, cuando se aplican antes de la inducción del estrés por inflamasomas (pretratamiento).

Las composiciones P3 (cepa viable + AH) y P3-i (cepa inactivada + AH) según la invención mostraron una buena eficacia en la reducción de la translocación de NFκB en un pretratamiento a largo plazo (16 horas).

Además, la composición según la invención P3 (cepa viable + AH) mostró una buena capacidad para proteger la estructura de la unión dermoepidérmica contra rayos UV en el estudio de histomorfológico con tinción con hematoxilina y eosina.

II.B. Modelo inflamatorio B para CEPA INACTIVADA

5 Se utilizó un modelo experimental en T-skin™ (piel de grosor completo) basado en vías inflamatorias inducidas por rayos UVA + UVB (dosis 1 MED) para evaluar la eficacia de la composición invención P3-i. según la, que comprendía una cepa bacteriana LPC-S01 DSM 26760 inactivada y ácido hialurónico, aplicada al tejido dañado antes o después de la inducción de estrés por inflamasomas (pretratamiento o postratamiento con respecto a la irradiación UV).

10 Las composiciones que están siendo analizadas (véase II.B.1) fueron evaluadas utilizando una concentración elevada de cepa bacteriana inactivada que está siendo analizada (10^7 o 10^9 células/tejido) con el objetivo de explorar su aplicación y eficacia potenciales en el modelo de inflamasomas de T-Skin según 2 protocolos:

15 B.I. PROTOCOLO DE PRETRATAMIENTO: T-skin abrasada mediante un esfuerzo mecánico en la superficie epidérmica y pretratada durante 45 minutos o 4 horas con las composiciones que están siendo examinadas, luego sometida a irradiación UVA y UVB (1 MED). 4 horas después de dicha irradiación (postincubación), se recogieron tejidos para su análisis.

B.II. PROTOCOLO DE POSTRATAMIENTO: T-skin abrasada mediante un esfuerzo mecánico en la superficie epidérmica y sometida a irradiación UVA y UVB (1 MED), luego tratada durante 45 minutos o 4 horas con las composiciones que están siendo examinadas e se recogieron tejidos inmediatamente para su análisis.

20 El fin del estudio fue estudiar la eficacia de la cepa bacteriana que está siendo analizada inactivada a dosis elevadas (por sí sola o mezclada con AH) para modular la activación y la translocación de NFκB en el núcleo.

II.B.1. Composiciones que están siendo analizadas y controles

- P3-i.- 10^9 : LPC-S01 DSM 26760 inactivada (10^9 células/tejido) resuspendida en una crema a base de ácido hialurónico (véase I.2.1.), correspondiente a un 30% de la composición final;
- 25 - P3-i.- 10^7 : LPC-S01 DSM 26760 inactivada (10^7 células/tejido) resuspendida en una crema a base de ácido hialurónico (véase I.2.1.), correspondiente a un 0,03% de la composición final;
- Control positivo (CP): tejido tratado con una solución salina de NaCl al 0,9%, abrasado y expuesto a radiación UV.
- 30 - Control negativo (CN): tejido tratado con una solución salina de NaCl al 0,9% sin exposición a radiación UV.

Se preparó P3-i. (cepa inactivada + AH) resuspendiendo el contenido de una cápsula de cepa bacteriana liofilizada (10^9 UFC) en una solución salina e incubado a 85°C durante 1 hora. Tras este periodo, se centrifugaron las bacterias y el sedimento fue suspendido en 13 ml de crema a base de ácido hialurónico.

II.B.2. Diseño del estudio

35 II.B.2.1. Preparación de las composiciones objeto de análisis

La cepa inactivada que está siendo analizada en forma liofilizada que tiene un número de células de $2 \cdot 10^{11}$ células/g de polvo; fue pesada y resuspendida en los debidos disolventes como sigue:

- 2 g en 4 ml de crema a base de AH (véase I.2.1.), obteniendo P3- 10^9 . Se aplicaron 10^9 bacterias/tejido aplicando 15 μl de suspensiones.
- 40 - 0,02 g en 4 ml de crema a base de AH (véase I.2.1.), obteniendo P3- 10^1 . Se aplicaron 10^7 bacterias/tejido aplicando 15 μl de suspensiones.

II.B.2.2. Inducción y tratamiento de inflamasomas en T-skin

II.B.2.2.1. Protocolo de pretratamiento

45 El diseño experimental se resume en la Figura 8: el día del experimento, se lesionaron los tejidos mediante un ligero esfuerzo mecánico (carreras de Algerbrush $n = 2$) y tratados con 15 μl de composiciones de análisis (P3-i.) que fueron aplicadas directa y uniformemente a los tejidos T-Skin™ e incubados durante 45 minutos o 4 horas.

50 Subsiguientemente, los tejidos fueron irradiados con 1 MED (equivalente a $0,025 \text{ J/cm}^2$), en PBS, utilizando el simulador solar Oriol 1KW con lámpara de arco de xenón y filtro eritémico WG320 [mW/cm^2] ($0,035 \text{ mW/cm}^2$, según el certificado de calibración nº 16121 expedido por Opto.Cal GmbH) contra la irradiación. Tras la inducción del inflamasma, los tejidos fueron postincubados en condiciones de homeostasia durante 4 horas y luego fijados en

formol e incorporados en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) para una inmunotinción de NFκB. También se recogieron tejidos para un análisis RT-qPCR adicional. Los vehículos fueron recogidos y almacenados a -20°C.

II.B.2.2.2. Protocolo de postratamiento

5 El diseño experimental se resume en la Figura 9: el día del experimento, se lesionaron los tejidos mediante un ligero esfuerzo mecánico (carreras de Algerbrush = 2) e irradiados con 1 MED (equivalente a 0,025 J/cm²), en PBS. Tras la inducción del inflammasoma, los tejidos fueron tratados con 15 µl de composiciones que estaban siendo analizadas e incubados durante 45 minutos o 4 horas. Inmediatamente tras el tratamiento, los tejidos fueron recogidos y fijados en formol para una inmunotinción de NFκB. También se recogieron tejidos para un análisis RT-qPCR adicional.

II.B.3. Resultados de la inmunotinción de NFκB

10 La siguiente Tabla 4 muestra los resultados de la translocación de NFκB (expresados como el número total de núcleos detectados en 3 réplicas biológicas) en el control negativo con respecto a los controles positivos de cada protocolo. Como se documenta en la Tabla 4, se confirmó la inducción del modelo de inflammasoma por un aumento en la translocación de NFκB en el núcleo celular en las muestras irradiadas con respecto al control negativo.

15 Sin embargo, en este lote de T-skin se observó tras la irradiación una activación de NFκB más temprana, aunque se observó una translocación en cada punto temporal. En particular, la máxima inducción de NFκB se observa 45 minutos después de la irradiación.

Los protocolos adoptados se basan en la lectura tras la irradiación con rayos UV en el modelo de postratamiento y en la lectura tras la postincubación en el modelo de pretratamiento, dado que el objetivo es evaluar la eficacia de los productos tras la recuperación del proceso inflamatorio agudo.

20 Tabla 4

Control negativo	0
Control positivo 45 min de pretratamiento + 4 horas de incubación tras la irradiación UV	7
Control positivo 4 horas de pretratamiento + 4 horas de incubación tras la irradiación UV	5
Control positivo 45 minutos tras irradiación UV	9
Control positivo 4 horas tras irradiación UV	4

A) Pretratamiento de 45 minutos

En la Tabla 5, se presenta el análisis semicuantitativo de la translocación nuclear de NFκB (expresado como el número total de núcleos detectados en todas las réplicas biológicas) para el pretratamiento de 45 minutos + 4 horas de incubación tras la irradiación UV.

25 Tabla 5. Composición según la invención

Control negativo	CN	0
Control positivo	CP	7
cepa inactivada 10 ⁹ + AH*	P3-i.(10 ⁹)	1
cepa inactivada 10 ⁷ + AH *	P3-i.(10 ⁷)	5

B) Pretratamiento de 4 horas

En la Tabla 6, se presenta el análisis semicuantitativo de la translocación nuclear de NFκB (expresado como el número total de núcleos detectados en todas las réplicas biológicas) para el pretratamiento de 4 horas + 4 horas de incubación tras la irradiación UV.

30 Tabla 6. Composición según la invención

Control negativo	CN	0
Control positivo	CP	5
cepa inactivada 10 ⁹ + AH*	P3-i.(10 ⁹)	1
cepa inactivada 10 ⁷ + AH *	P3-i.(10 ⁷)	2

Análisis de los resultados de las Tablas 5 y 6:

- Cuando se aplica como un pretratamiento, la composición P3-i., que comprende la cepa inactivada LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico, fue capaz de reducir la translocación de NFκB en el núcleo, indicando una eficacia preventiva en la protección de la piel contra el estrés inflamatorio inducido por rayos UV.

35

- A una concentración de 10^9 de la cepa, en el modelo de pretratamiento de 45 minutos, la composición P3-i. (cepa inactivada + AH) fue capaz de reducir mucho la translocación de NFκB en el núcleo indicando un efecto sinérgico y/o muy eficaz entre la cepa LPC-S01 DSM 26760 inactivada y el ácido hialurónico.

5 - La respuesta del tejido al pretratamiento de las composiciones P3-i. (10^9) y P3-i. (10^7) a 2 concentraciones distintas de LPC-S1 DSM 26760 inactivada sugiere un mecanismo de dosis-respuesta: se detectaron menos núcleos NFκB positivos a concentraciones crecientes de cepas en la composición.

C) Postratamiento de 45 minutos

10 En la Tabla 7, se presenta el análisis semicuantitativo de la translocación nuclear de NFκB (expresado como el número total de núcleos detectados en todas las réplicas biológicas) para el pretratamiento de 45 minutos tras la irradiación UV.

Tabla 7. Composición según la invención

Control negativo	CN	0
Control positivo	CP	9
cepa inactivada 10^9 + AH*	P3-i. (10^9)	3
cepa inactivada 10^7 + AH *	P3-i. (10^7)	0

D) Postratamiento de 4 horas

15 En la Tabla 8, se presenta el análisis semicuantitativo de la translocación nuclear de NFκB (expresado como el número total de núcleos detectados en todas las réplicas biológicas) para el pretratamiento de 4 horas tras la irradiación con rayos UV.

Tabla 8. Composición según la invención

Control negativo	CN	0
Control positivo	CP	4
cepa inactivada 10^9 + AH*	P3-i. (10^9)	1
cepa inactivada 10^7 + AH *	P3-i. (10^7)	9

20 La composición P3 (cepa inactivada + AH) ha demostrado una recuperación rápida y eficaz de los niveles basales de NFκB, en particular a corto plazo (cuando la respuesta inflamatoria se encuentra a su nivel máximo), sugiriendo una mejor sinergia/efecto en la combinación de cepa LPC-S01 DSM 26760 inactivada + ácido hialurónico para restaurar la homeostasia de tejidos inflamados.

II.B.4. Conclusión

25 Estos resultados confirman que la composición P3-i que comprende la combinación de LPC-S01 DSM 26760 inactivada + ácido hialurónico es eficaz tanto en condiciones homeostáticas (véase la sección I.2.) como en condiciones de inflamación de la piel (por ejemplo, provocada por radiación UV), en particular en la fase aguda de inflamación dado que es particularmente eficaz a corto plazo en el desarrollo de la inflamación.

PARTE EXPERIMENTAL (2)

30 Evaluación de la adhesión de *Cutibacterium acnes* DSM 1897 al modelo tridimensional de “piel de grosor completo” en presencia de una composición según la invención (cepa *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y ácido hialurónico)

1. Objetivo del estudio.

35 El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de la cepa probiótica *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, por sí sola y/o en combinación con ácido hialurónico (AH), de combatir una adhesión *in vitro* de *C. acnes* a un modelo de “piel de grosor completo”.

Cutibacterium acnes (sucintamente, *C. acnes*, también conocido como *Propionibacterium acnes* o *P. acnes* (Douglas et Günter, 1946)) es una bacteria anaeróbica gram-positiva de crecimiento lento relacionada con ciertas enfermedades cutáneas, tales como acné; también puede ser la causa de blefaritis y endoftalmitis.

40 Para evaluar diversas posibles situaciones de infección, se implementaron un modelo de competición y un modelo de exclusión, en función de la adaptación del procedimiento descrito por Coman et al. en 2015.

2. Diseño experimental.

Se utilizó la cepa *C. acnes* DSM 1897 para simular una infección en un modelo tridimensional de “piel de grosor completo”, adquirido en Phenion (Henkel), para un total de 30 insertos.

Los ensayos fueron llevados a cabo considerando distintas condiciones de tratamiento, enumeradas a continuación:

- 1) sin tratamiento, para evaluar la capacidad adhesiva eficaz de *C. acnes* DSM 1897 en los 2 modelos de exclusión y de competición;
- 5 2) tratamiento preventivo o concomitante con *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 durante 24 horas;
- 3) tratamiento preventivo o concomitante con ácido hialurónico al 0,5% durante 24 horas (Sigma-Aldrich 41897);
- 10 4) tratamiento preventivo o concomitante con una mezcla homogénea de ácido hialurónico y *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 durante 24 horas;
- 5) tratamiento preventivo o concomitante con peróxido de benzoílo durante 24 horas (Benzac al 10%, control positivo).

Se preparó una suspensión de la cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 y se pusieron en contacto 50 µl de la suspensión con la superficie del inserto.

- 15 Se preparó una suspensión de ácido hialurónico al 0,5% y se pusieron en contacto 50 µl de la suspensión con los insertos.

Además, se mezclaron 50 µl de cepa *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 con 0,25 mg de ácido hialurónico para obtener una preparación combinada de probiótico + ácido hialurónico, a la misma concentración de ácido hialurónico (0,5%) y a la misma carga inicial utilizadas para ensayos con las sustancias individuales.

- 20 Se pusieron en contacto 50 µl de gel Benzac al 10% (peróxido de benzoílo) con los insertos como un control positivo.

Se sometieron a ensayo las 5 condiciones anteriores por duplicado y se incubaron los 10 insertos durante 24 horas a 37°C en presencia de CO₂.

2.a. Ejecución del ensayo de exclusión

- 25 El ensayo de exclusión permitió el pretratamiento de los insertos con la cepa probiótica (o con ácido hialurónico o con la mezcla de los dos), la infección subsiguiente con el patógeno y la verificación subsiguiente de la posible reducción de la adhesión porcentual del patógeno al inserto con respecto a la condición ideal de infección (modelo *in vitro* de tratamiento probiótico preventivo).

2.b. Ejecución del ensayo de competición

- 30 El ensayo de competición permitió el tratamiento concomitante de los insertos con la cepa probiótica (o con ácido hialurónico o con la mezcla de los dos) y con el patógeno y la verificación subsiguiente de la posible reducción de la adhesión porcentual del patógeno al inserto con respecto a la condición ideal de infección (modelo *in vitro* de tratamiento probiótico durante el curso de la infección).

3. Resultados

3.1 Ensayo de exclusión

- 35 La Figura 10 muestra la reducción en la viabilidad del patógeno *C. acnes* DSM 1897 expresada en Log₁₀ UFC, mientras que la Tabla 9 muestra la misma situación como una reducción porcentual (%) de la viabilidad del patógeno en las diversas condiciones sometidas a ensayo.

Tabla 9

Condición sometida a ensayo	Reducción porcentual del patógeno
LPC-S01	19,1
LPC-S01 + ácido hialurónico	19,5
Ácido hialurónico	0,8
Benzac	17,0

- 40 Como puede verse a partir de los resultados documentados, los tratamientos llevados a cabo con Benzac al 10%, LPC-S01 DSM 26760 y la combinación de LPC-S01 DSM 26760 en presencia de ácido hialurónico al 0,5% reducen el recuento de viabilidad de *C. acnes* DSM 1897 en aproximadamente 1,0-1,4 Log₁₀ UFC, correspondiente a aproximadamente un 20% de reducción en la viabilidad del patógeno. El tratamiento con ácido hialurónico al 0,5% por sí solo no parece ser capaz de reducir la viabilidad del patógeno en ningún grado.

3.2 Ensayo de competición

La Figura 11 y la Tabla 10 muestran los datos de los recuentos viables, expresados como una reducción logarítmica log₁₀ UFC de *C. acnes* DSM 1897 por inserto, de la media obtenida para la duplicación de cada condición sometida a ensayo y como reducción porcentual obtenida en el ensayo de competición.

Tabla 10

Condición sometida a ensayo	Reducción porcentual del patógeno
LPC-S01	18,0
LPC-S01 + ácido hialurónico	17,3
Ácido hialurónico	0,0
Benzac	15,3

- 5 En función de los datos presentados, se confirma que los tratamientos llevados a cabo con Benzac al 10%, LPC-S01 DSM 26760 y la combinación de LPC-S01 DSM 26760 en presencia de ácido hialurónico al 0,5% reducen el recuento de viabilidad de *C. acnes* DSM 1897 en 1,0-1,3 Log₁₀ UFC. Como con el ensayo de exclusión, el tratamiento con ácido hialurónico al 0,5% por sí solo no parece ser capaz de reducir la viabilidad del patógeno.

4. Conclusión

- 10 Todos los ensayos *in vitro* llevados a cabo demostraron la eficacia del control positivo de Benzac al 10% en la contención de la infección por *C. acnes*, con una reducción porcentual en la viabilidad de la población de patógenos desde un 15% hasta un 23%.

- 15 Los ensayos de exclusión y de competición han mostrado que los tratamientos llevados a cabo con la combinación de LPC-S01 + ácido hialurónico al 0,5% (composiciones según la invención) reducen la infección por *C. acnes* DSM 1897 en aproximadamente un 18-19%.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - una mezcla M que comprende o, de forma alternativa, consiste en:
 - (I) una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* identificada como *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 y depositada en *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) con el número de acceso DSM 26760, y
 - (II) ácido hialurónico o una sal del mismo;
- 5 y, opcionalmente, dicha composición comprende
 - al menos un aditivo y/o excipiente de calidad farmacéutica o cosmética o alimentaria aceptable.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 es una cepa bacteriana viable.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 es una cepa bacteriana inactivada térmicamente o tinalizada o sonicada o irradiada con rayos gamma; preferiblemente inactivada térmicamente.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición se formula para un uso cutáneo tópico, preferiblemente una crema o una mascarilla.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición se formula para un uso oral, preferiblemente una suspensión o una preparación para la formación de una suspensión extemporánea.
- 25 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como medicamento.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un procedimiento para un tratamiento preventivo y/o curativo de una inflamación y/o una infección de la piel, o una enfermedad o un síntoma asociado, comprendiendo dicho tratamiento la administración de la composición a un sujeto necesitado.
- 30 8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha inflamación y/o la infección de la piel son inducidas por rayos UV.
9. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha inflamación y/o la infección de la piel son inducidas por agentes patógenos, preferiblemente por *Cutibacterium acnes* o *Propionibacterium acnes*.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un procedimiento para un tratamiento preventivo y/o curativo de un daño provocado o inducido a la piel por:
 - radiación UV; y/o
 - condiciones meteorológicas adversas para la piel, preferiblemente rayos de sol, frío o viento; y/o
 - estilos de vida perjudiciales para la piel, preferiblemente la contaminación, el uso de tabaco o el consumo de alcohol; y/o de una enfermedad o un síntoma asociado, comprendiendo dicho tratamiento la administración de la composición a un sujeto necesitado.
- 35 11. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que se seleccionan dicha inflamación y/o dicha infección de la piel o dicho daño inducido a la piel, o dichas enfermedades o dichos síntomas asociados, entre el grupo que comprende o, de forma alternativa, consiste en:

inflamación aguda o crónica de la piel o infección de la piel, infección bacteriana o viral o fúngica de la piel, absceso, apostema, empiema, flemón, panadizo, forúnculo, ragadía, hidradenitis supurativa, erisipelas, psoriasis, dermatitis atópica, acné, dermatosis aguda o crónica, rosácea, cuperosis, eritema, enrojecimiento de la piel, quemadura, eritema solar, reactivación del herpes oral, úlceras por decúbito, úlceras, rágades, fístula, llaga, herida, magulladura, abrasión, equimosis, hematoma, excoriación, queratosis, hiperqueratosis, queuloide.
- 40 12. Un uso cosmético tópico de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho uso es:
 - para el mantenimiento de la homeostasia de la piel, y/o
 - como un agente antienvjecimiento de la piel.
- 50

13. Un uso cosmético según la reivindicación 12, en el que dicha composición es para un uso cosmético tópico en el tratamiento de: arrugas, pérdida de elasticidad de la piel o elastosis solar, piel seca, piel áspera, fotoenvejecimiento, enrojecimiento de la piel, presencia de capilares dilatados en las mejillas, nariz y/u orejas, manchas solares, pigmentación anormal o irregular o hiperpigmentación de la piel.

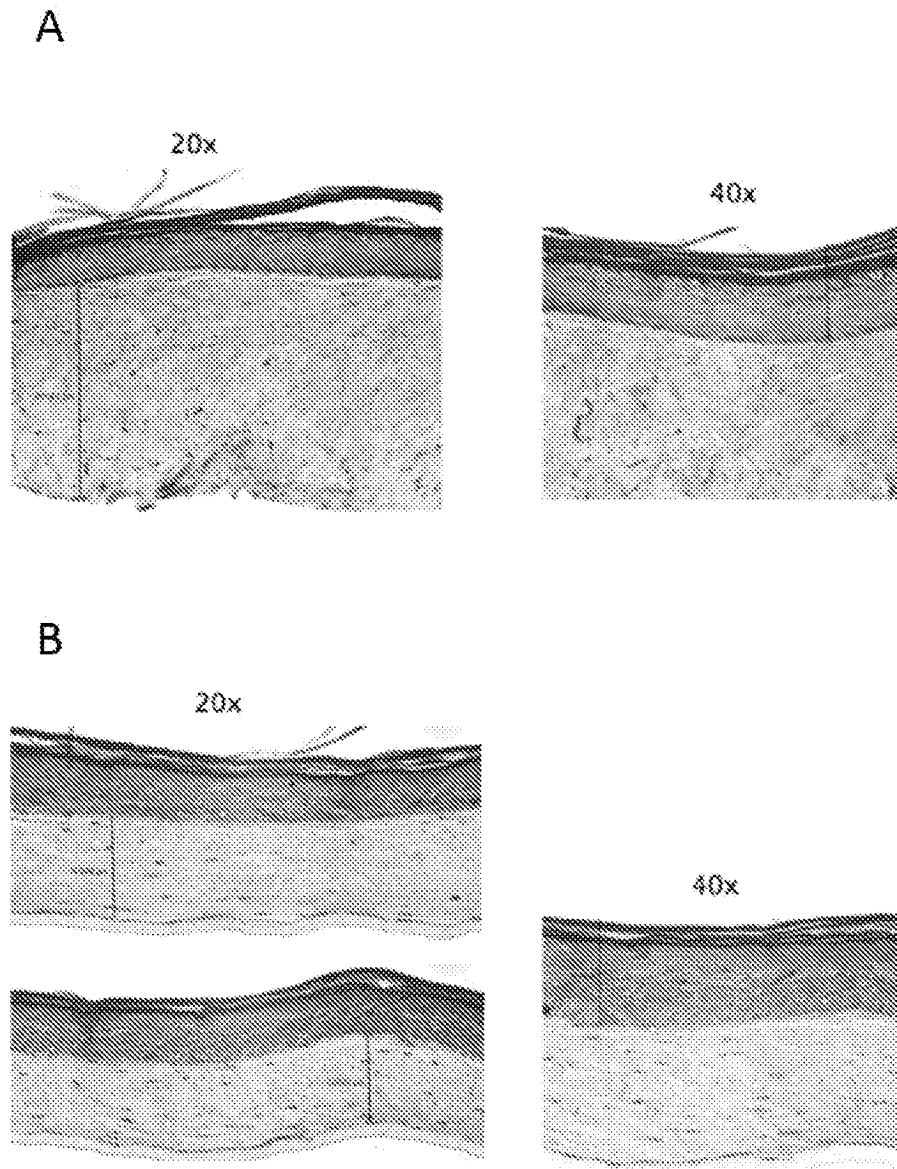


Fig. 1

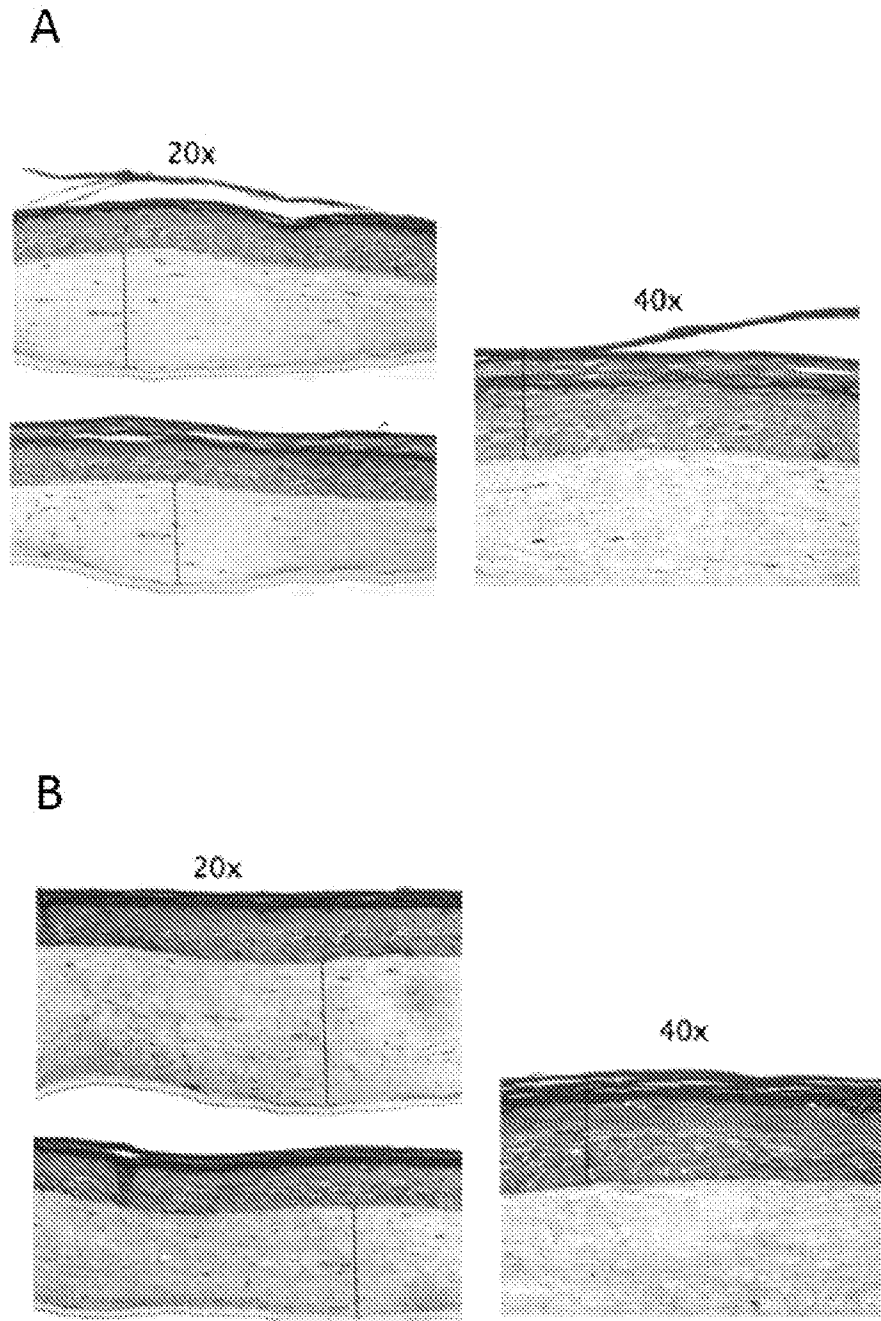


Fig. 2

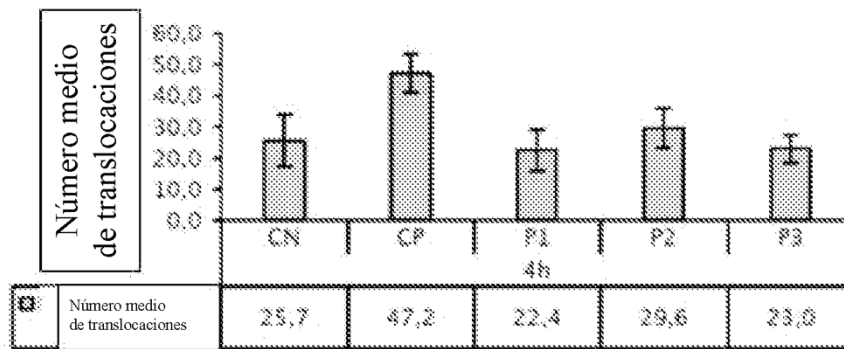


Fig. 3

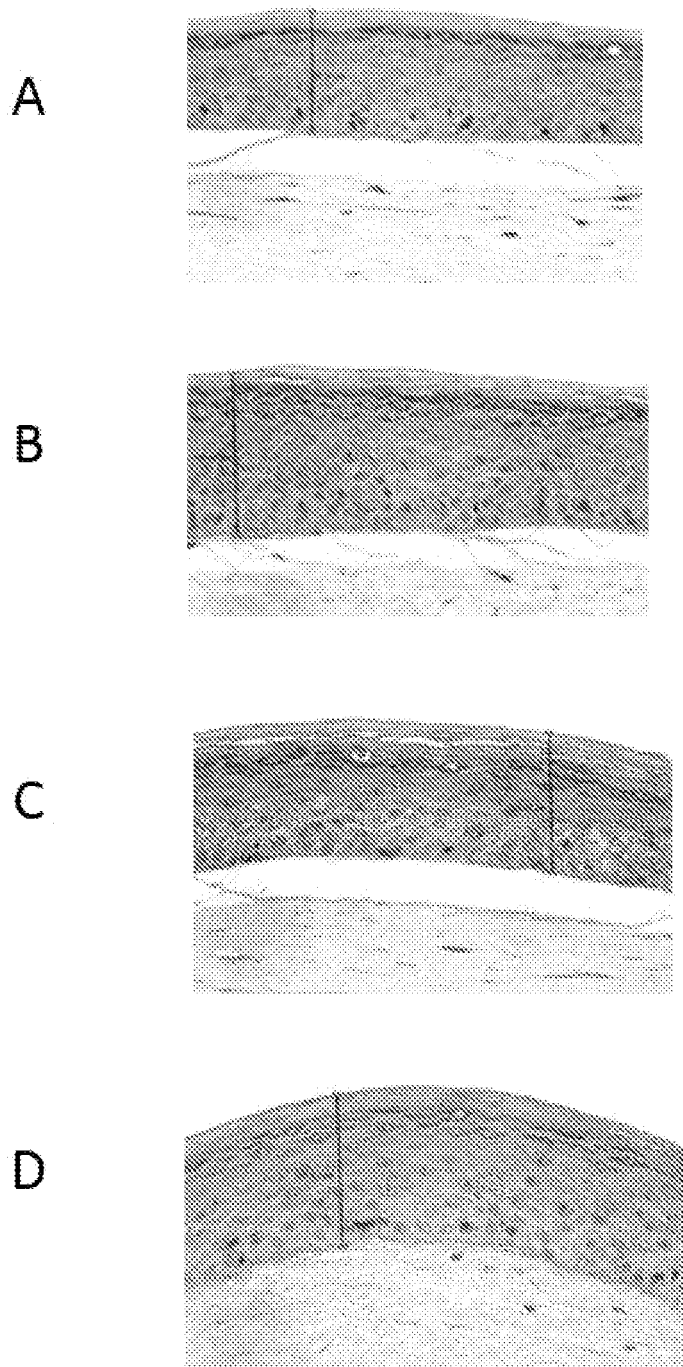


Fig. 4

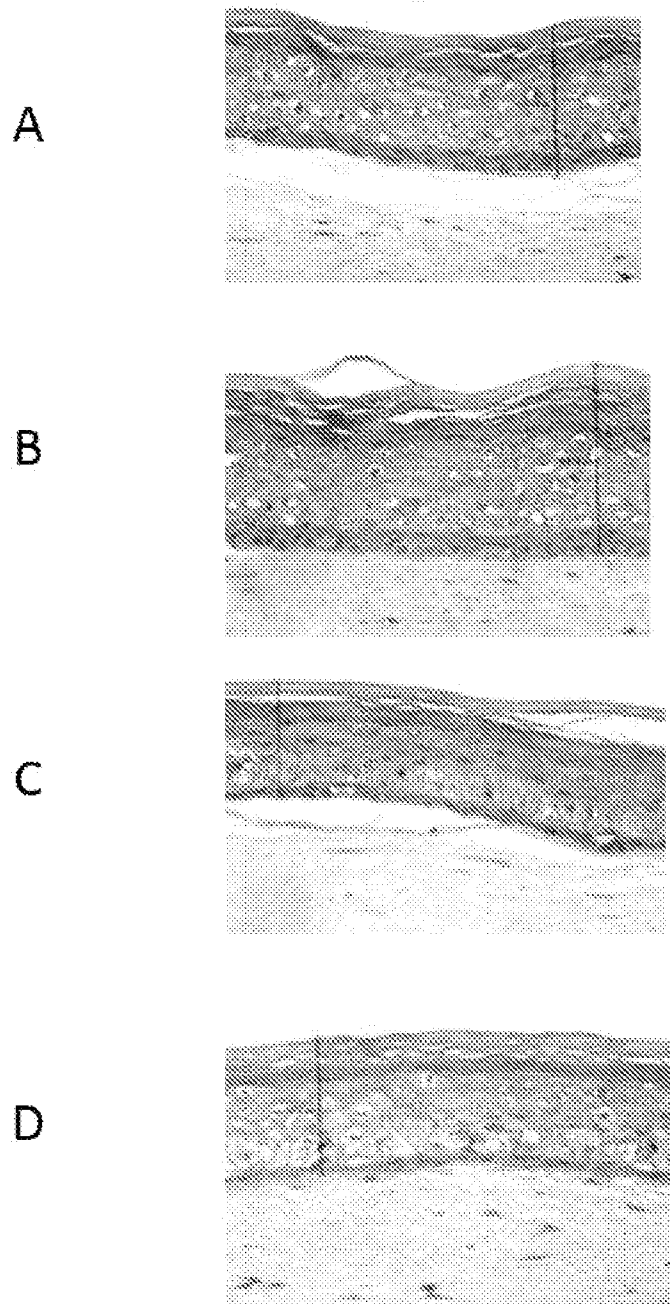


Fig. 5

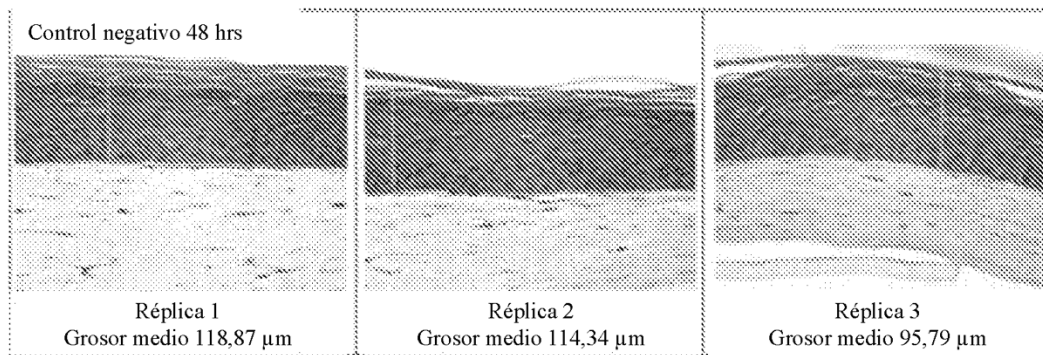


Fig 6a

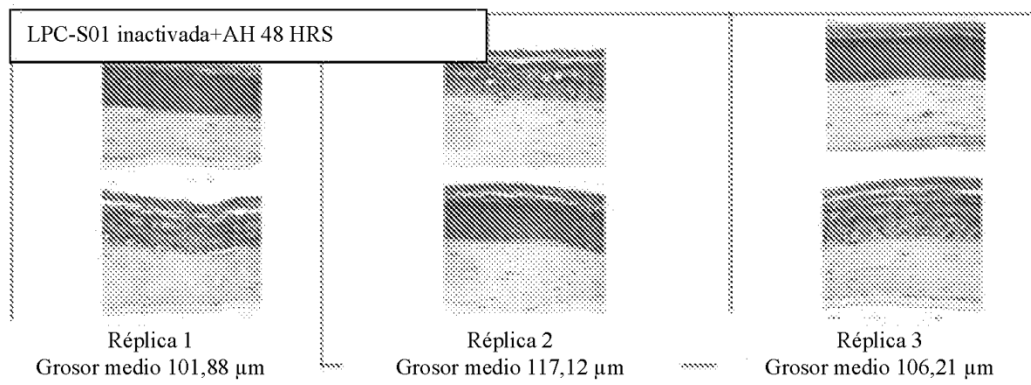


Fig. 6b

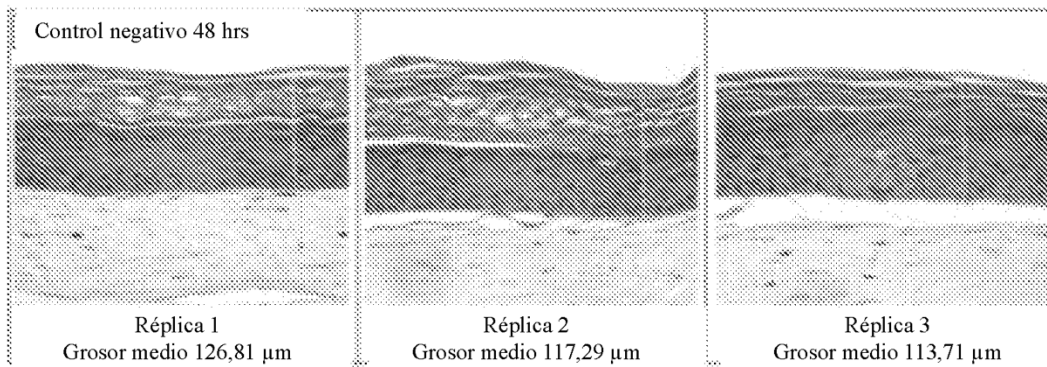


Fig. 6c

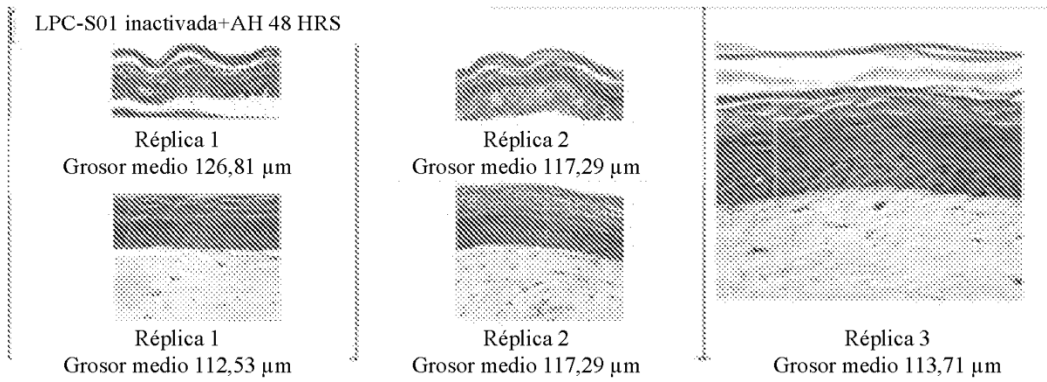


Fig. 6d

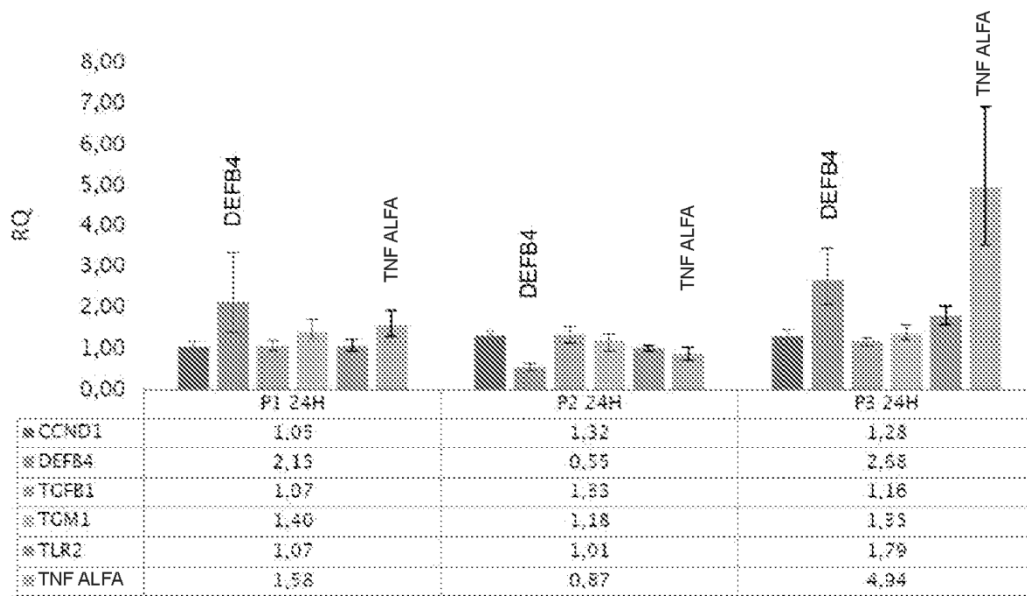


Fig. 7

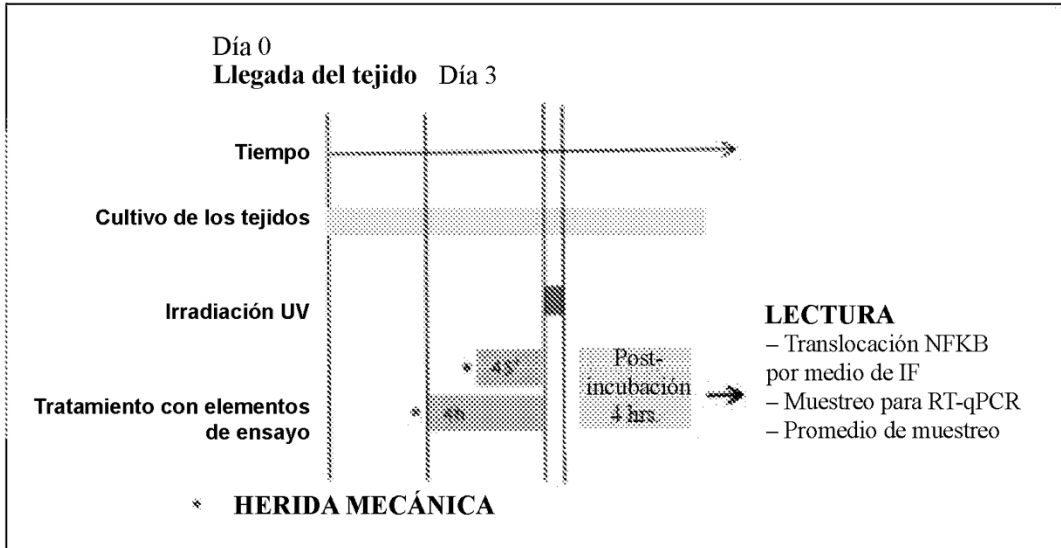


Fig. 8

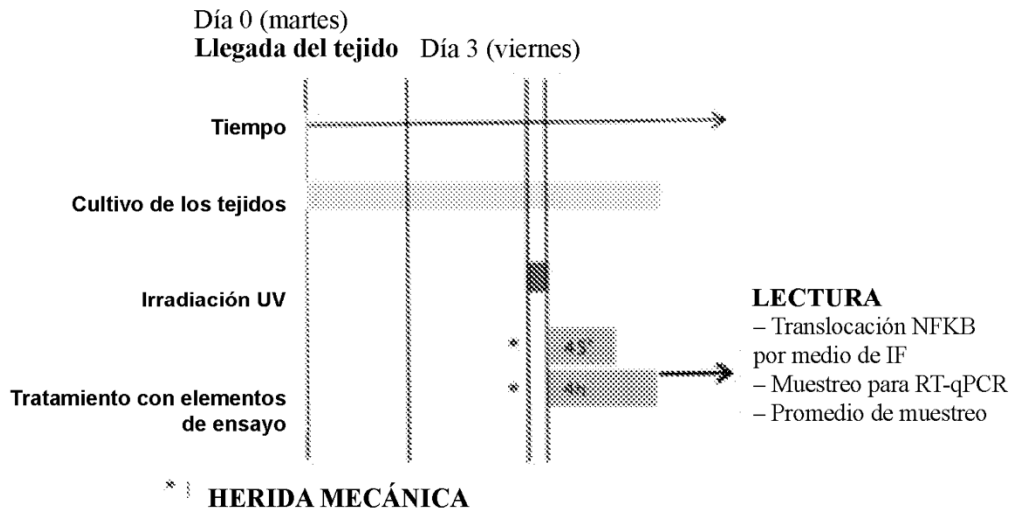


Fig.9

Reducción del recuento viable de *C. acnes*

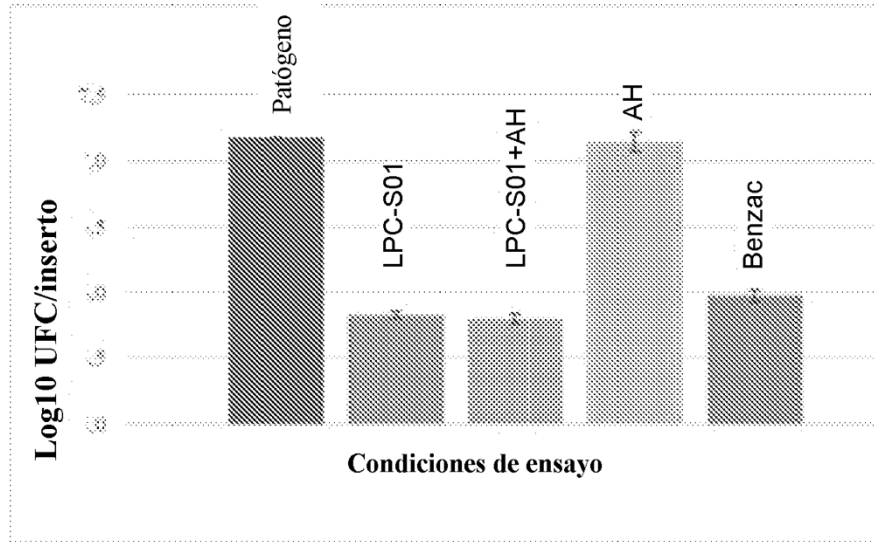


Fig 10

Reducción del recuento viable de *C. acnes*

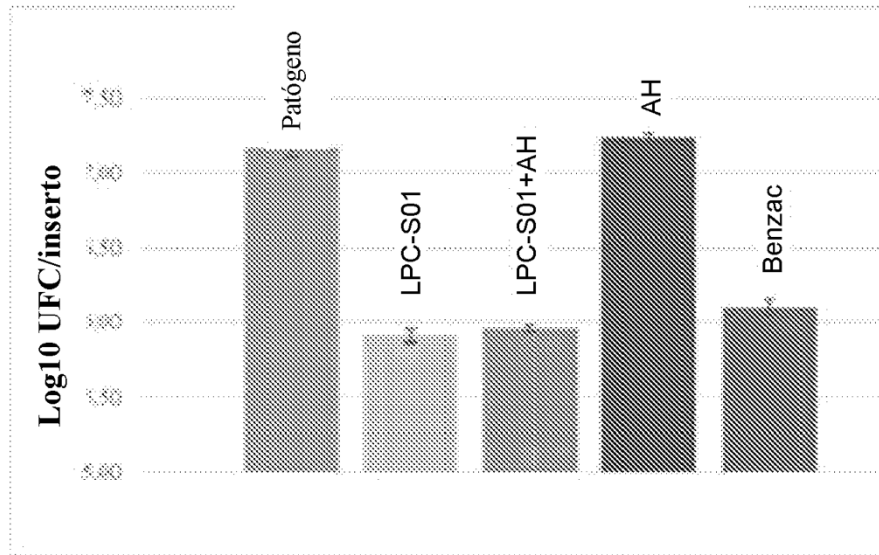


Fig. 11