

COMPOSICIÓN DE HIDROLIZADO CELULAR A PARTIR DE CÉLULAS CULTIVADAS Y APLICACIONES DE LA MISMA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica una solicitud provisional con número de serie 63/173,332, presentada el 9 de abril de 2021. Esta solicitud reivindica además la prioridad de la solicitud PCT no. PCT/IB2020/060727, presentada el 14 de noviembre de 2020, que reivindica la prioridad de una solicitud de patente provisional estadounidense número de serie 62/942,568, presentada el 2 de diciembre de 2019. Todas las solicitudes identificadas anteriormente se incorporan a la presente por
10 referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

Las modalidades descritas en el presente documento se refieren generalmente a la composición de un hidrolizado celular a partir de células cultivadas. Las modalidades divulgadas en
15 el presente documento también se refieren generalmente a las aplicaciones de la composición de hidrolizado celular a partir de células cultivadas y su proceso de elaboración. En particular, a los polipéptidos proteicos y/o fragmentos polipeptídicos derivados de células cultivadas.

ANTECEDENTES

20 La carne animal es rica en proteínas, y suministra todos los aminoácidos necesarios para producir la proteína utilizada con el fin de ayudar a las funciones del cuerpo. La carne se utiliza a menudo para producir materias primas derivadas de animales, que incluyen, entre otras, proteínas, factores de crecimiento, citocinas, etc. Dichas materias primas derivadas de animales tienen muchas aplicaciones, que con frecuencia se incluyen en suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado
25 de la piel, cosméticos y productos para el cuidado de heridas, etc. Los factores de crecimiento, las citocinas y las proteínas de la matriz extracelular (MEC) pueden estimular la reparación y regeneración del tejido cutáneo. Los derivados del ácido hialurónico pueden hidratar la piel y disminuir las arrugas. Los antioxidantes pueden dar protección contra el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. El colágeno puede acelerar la cicatrización. Sin embargo, estas materias primas
30 derivadas de animales se obtienen tradicionalmente a partir de animales o peces que se crían en granjas o se capturan en la naturaleza. De manera similar, las materias primas derivadas de plantas (junto con las materias primas derivadas de animales, "materias primas derivadas"), que pueden contener una gran cantidad de proteínas específicas de plantas de utilidad, factores de crecimiento, citocinas, etc., ahora se obtienen de la cosecha de plantas en granjas o en la naturaleza. Sin

embargo, la creación de materias primas derivadas de animales vivos y plantas vivas tiene los siguientes inconvenientes.

En primer lugar, requiere un suministro constante de fuentes animales y vegetales. Un aumento de la demanda de productos animales provoca que más animales sufran y sean sacrificados en granjas y mataderos. El aumento en términos de criar ganado también puede suponer una carga adicional para el medio ambiente o el ecosistema. La cría de ganado y la agricultura podrían causar deforestación, aumento del consumo de agua limpia, aumento de la contaminación del medio ambiente (por ejemplo, debido a la dispersión de desechos animales o plaguicidas y otros productos químicos utilizados en la agricultura para promover el desarrollo de las plantas), uso excesivo de los recursos naturales (por ejemplo, sobreexplotación agrícola y sobrepesca). Lo anterior podría dar como resultado el agotamiento de los ecosistemas naturales y disminuir la biodiversidad de la tierra. Además, también se pueden propiciar problemas de abuso y bienestar animal. Asimismo, la inestabilidad de las cosechas es la característica inherente a la cría de ganado y la agricultura, ya que depende de una gran cantidad de factores incontrolables, incluyendo el clima y fenómenos meteorológicos.

En segundo lugar, solo se extraen las proteínas requeridas, y el resto de otras proteínas funcionales producidas por los animales o plantas silvestres se pierden. Por lo general, las materias primas derivadas se crean extrayendo ciertas proteínas diana/de interés a partir de animales o plantas silvestres. Durante el proceso de extracción, se extraen partes de animales y/o plantas y sus tejidos (por ejemplo, la piel de los animales y la pared celular de las plantas) se descomponen a través de una serie de procesos. Los procesos pueden incluir el uso de una combinación de energía química, térmica y/o mecánica. Los procesos pueden dar como resultado la pérdida de ciertas proteínas debido a cambios en el pH, en la temperatura y otras condiciones. Como resultado, las proteínas o nutrientes no diana/que no son de interés no se recolectan en los procesos de extracción. Sin embargo, resulta deseable incluir también esas proteínas no diana/que no son de interés en las materias primas derivadas, dado que involucran rastros de proteínas funcionales que podrían ser benéficas para determinados fines. Por ejemplo, el valor nutricional total en las naranjas puede ser más benéfica para un ser humano para un determinado propósito en comparación con solo la vitamina C extraída de la naranja. Además, criar animales o cultivar plantas únicamente para obtener algunas partes utilizables para generar materias primas derivadas es altamente ineficiente.

En tercer lugar, implica el uso de productos químicos nocivos. Por ejemplo, la extracción de colágeno de la piel de pescado implica una serie de pasos que incluyen las etapas de mezclar las pieles de pescado con soluciones alcalinas y ácidas. Esto supone una carga adicional para el medio ambiente o el ecosistema. Además, puede contribuir a posibles riesgos laborales. Las materias primas derivadas también pueden contener productos químicos residuales nocivos.

En cuarto lugar, existen preocupaciones en términos de seguridad debido a la presencia de contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas), agentes adventicios (bacterias, virus, hongos, agentes de encefalopatía espongiforme transmisible) y alergenicos en los animales y plantas domésticos o salvajes.

5 En quinto lugar, existen dificultades para controlar el perfil molecular y determinar la consistencia de las materias primas de origen animal (por ejemplo, suero animal) y vegetal (por ejemplo, extractos vegetales e hidrolizados vegetales). Cada lote de materias primas derivadas de animales o vegetales se produce a partir de diferentes lotes de animales y plantas, que pueden desviarse significativamente debido a las variaciones de temperatura, del tiempo de extracción, del
10 tipo de pienso y de fertilizantes, de la presencia de plagas y parásitos, etc. Algunas moléculas en un determinado lote pueden desencadenar una reacción alérgica en algunos individuos.

En sexto lugar, si las materias primas de origen animal y vegetal se obtienen a partir de animales y plantas silvestres, es muy difícil rastrear el origen.

Alternativamente, se pueden crear materias primas derivadas mediante el uso de
15 organismos recombinantes. Sin embargo, este método implica el uso de organismos modificados genéticamente, que podrían ser perjudiciales para el medio ambiente cuando dichos organismos se liberan accidentalmente. Además, solo se puede producir una (1) proteína por línea de producción. Este método resulta ineficiente para múltiples proteínas derivadas de materias primas. Además, la proteína producida por los organismos recombinantes debe aislarse y purificarse adicionalmente. El
20 aislamiento y la purificación normalmente implican múltiples pasos que conducen a un aumento en el costo de producción. Asimismo, puede haber variaciones en el plegamiento de la proteína producida por este método. Algunas funciones pueden perderse en algunas variaciones.

De manera alternativa, el medio consumido o acondicionado también puede ser una fuente de proteínas funcionales. Los términos “consumido”, “medio consumido”, “medios consumidos”, “medio acondicionado” o “medios acondicionados” se refieren al medio de cultivo que
25 se ha incubado con células. Sin embargo, al igual que los métodos anteriores, presenta varios inconvenientes. En primer lugar, requiere un suministro constante de fuentes animales y vegetales. Estas desventajas se expusieron anteriormente y, por lo tanto, no se repiten aquí. En segundo lugar, existen preocupaciones en términos de contaminación debido a la presencia de contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas),
30 agentes adventicios (bacterias, virus, hongos, agentes de encefalopatía espongiforme transmisible) y alergenicos en las fuentes de animales y plantas silvestres. En tercer lugar, los metabolitos no deseados y los desechos en el medio consumido pueden afectar a la pureza del producto final. Otras medidas adicionales de depuración producirían un aumento de los costos de producción.

La producción de carne *in vitro* es el proceso mediante el cual el tejido muscular o el tejido orgánico de los animales se cultiva en laboratorios utilizando técnicas de cultivo celular para obtener carne y productos cárnicos. Como se utiliza en la presente, los términos carne y productos cárnicos *in vitro* incluyen productos de proteína animal, así como productos no cárnicos que incluyen formas solubles y formas sólidas en formato de célula entera o hidrolizada. Si bien todavía se encuentran en una etapa temprana de desarrollo, la carne y los productos cárnicos *in vitro* pueden ofrecer una serie de ventajas sobre los productos cárnicos tradicionales, como ventajas para la salud y el medio ambiente, así como beneficios para el bienestar animal. Es una tecnología emergente de próxima generación que funciona como parte de un campo más amplio de la agricultura celular o de la producción de productos agrícolas a partir de cultivos celulares.

Las células para la producción de carne *in vitro* pueden ser células (por ejemplo, células musculares, células somáticas, células madre, etc.) extraídas de biopsias animales, que luego se pueden cultivar por separado en medios de cultivo en un biorreactor u otro tipo de entorno estéril. Las células pueden crecer en una forma semisólida o sólida que imita un órgano animal al unirse a un andamiaje tridimensional comestible que se coloca en el biorreactor. Sin embargo, las células también pueden desarrollarse en un cultivo en suspensión. Las células iniciadoras pueden ser células primarias obtenidas directamente de los tejidos del animal o de líneas celulares continuas. Si se cultivan en las condiciones adecuadas en medios de cultivo apropiados, las células primarias crecerán y proliferarán, pero solo un número finito de veces, que está relacionado con la longitud del telómero al final del ADN de la célula. Las líneas celulares continuas, por otro lado, se pueden cultivar *in vitro* durante un periodo prolongado. La investigación en biología celular ha establecido procedimientos sobre cómo convertir las células primarias en líneas celulares inmortales continuas. Las células primarias se pueden transformar en líneas celulares continuas utilizando oncogenes virales, tratamientos químicos o sobreexpresión de la transcriptasa inversa de la telomerasa para evitar que los telómeros se acorten.

BREVE DESCRIPCIÓN

Si bien los métodos existentes mencionados en la sección de antecedentes pueden cumplir, por ejemplo, con ciertos requisitos, el método recombinante evita la escarificación de los animales y el método del medio gastado/acondicionado puede producir una materia prima derivada con componentes traza más completos a un costo relativamente bajo en comparación con los animales silvestres o el método de recolección de plantas silvestres. Sin embargo, ninguno de los métodos existentes satisface la creciente demanda de sostenibilidad, bajo costo, componentes celulares enteros, catálogo completo de proteínas/péptidos celulares y métodos sin trato cruel en términos de una solución simple.

Por lo tanto, uno de los muchos aspectos de la invención comprende sustancialmente todos los polipéptidos de proteínas y/o fragmentos de polipéptidos derivados de sustancialmente todas las proteínas en una célula de un cultivo celular *in vitro*; y (ii) que esté libre de desechos y metabolitos de los medios de cultivo utilizados en el cultivo celular *in vitro*.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método alternativo para obtener materias primas derivadas de animales y materias primas derivadas de plantas utilizando la producción de carne *in vitro* y la producción de plantas *in vitro*, respectivamente. Las materias primas derivadas de conformidad con la presente invención están libres de contaminantes ambientales, agentes adventicios y alérgenos. También ayudan a limitar el sufrimiento animal y el sacrificio asociado con la producción de materiales derivados de animales.

La composición del hidrolizado celular de la presente invención se puede aplicar como un ingrediente activo en suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos o productos alimenticios. El hidrolizado celular incluye, de manera no limitativa, ácido hialurónico. La composición del hidrolizado celular de la presente invención comprende todos los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos proteicos derivados de estos a partir de células enteras. En otras palabras, la composición comprende múltiples polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos proteicos derivados de estos en lugar de un único polipéptido proteico. En consecuencia, la composición de la presente invención es multifuncional. Teniendo en cuenta lo anterior, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una composición de hidrolizado celular a través de un proceso eficiente y respetuoso con el medio ambiente. La composición del hidrolizado de proteínas de la presente invención también proporciona una mejor consistencia de lote a lote y una mejor trazabilidad para dicha composición. Algunos polipéptidos proteicos solo se pueden encontrar en animales, pero no en plantas, y viceversa. Por ejemplo, el colágeno solo se puede encontrar en células animales, pero no en células vegetales. Generalmente, los polipéptidos proteicos derivados de animales tienen una alta eficacia para el ser humano que los polipéptidos proteicos derivados de plantas.

También es un objetivo de la presente invención generar un valor adicional para los consumidores o fabricantes en diversas industrias/productos, que incluyen, de modo no limitativos, los suplementos dietéticos, el cuidado del cabello, el cuidado de la piel, el cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales, ya que la invención soluciona simultáneamente todos los inconvenientes presentes en el método convencional de producción de materias primas derivadas (es decir, la extracción de animales/plantas silvestres, organismos de ADN recombinante y de medio acondicionado/consumido). La presente invención proporciona los siguientes beneficios:

(1) no depender de fuentes animales y/o vegetales;

(2) no depender de organismos modificados genéticamente;
 (3) la extracción de todas las proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto;

- 5 (4) pureza (sin residuos en el producto);
 (5) prohibición del uso de productos químicos nocivos;
 (6) proceso en cadena simple, reduciendo así el costo; y
 (7) de carácter multifuncional en lugar de un solo uso/función/acción.

Los beneficios de la presente invención dan como resultado la creación de nuevos valores que satisfacen las necesidades de los consumidores. La invención proporciona el ingrediente activo de varios productos o de los productos propiamente (que incluye, entre otros, suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, medicamentos y otras aplicaciones medicinales) con las siguientes características:

- 10 (1) etiqueta con información clara no engañosa, a causa de la alta pureza y la
 15 inexistencia de residuos o productos químicos nocivos en las materias primas derivadas;
 (2) sostenibilidad, gracias a la poca o escasa dependencia de fuentes animales y/o vegetales;
 (3) síntesis no química, gracias al uso de biomateriales;
 (4) carácter multifuncional, gracias a su perfil molecular completo con todas las
 20 proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto; y
 (5) respaldada por principios científicos y resultados de ensayos.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición de hidrolizado celular, en donde la composición comprende: (i) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del colágeno 1 α 1; (ii) una mezcla
 25 de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del colágeno 1 β 1; (iii) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTFG, por sus siglas en inglés); y (iv) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de Decorina.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La divulgación podrá comprenderse de mejor manera si se consulta la descripción detallada, en combinación con los dibujos adjuntos. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace énfasis en la ilustración de los principios de la divulgación.

La Figura 1 muestra un análisis de transferencia western blot de proteínas en un tejido de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla (etiquetado como A) y una línea celular de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla (etiquetada como B).

La Figura 2 es un diagrama de flujo de un método para generar hidrolizado celular a partir de cultivo celular *in vitro*, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 3A es una gráfica que representa la expresión génica después de la exposición al hidrolizado en circunstancias de regeneración. La Figura 3B es una gráfica que representa la supervivencia celular tras la exposición al hidrolizado bajo circunstancias antioxidantes. La Figura 3C es una gráfica que representa la expresión génica tras la exposición al hidrolizado bajo circunstancias de reparación de la piel.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Generación del hidrolizado celular mediante cultivo celular *in vitro*

El método para producir el hidrolizado celular (es decir, materias primas derivadas de animales o materias primas derivadas de plantas) a partir del cultivo celular *in vitro* de la presente invención ofrece muchos beneficios en comparación con aquellos producidos a partir de animales o plantas silvestres.

En primer lugar, dado que las células se cultivan bajo condiciones libres de contaminantes y enfermedades, el medio de cultivo no contiene contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas) o agentes adventicios (bacterias, virus, hongos o agentes de encefalopatía espongiforme transmisible). Como resultado, las materias primas derivadas de animales o las materias primas derivadas de plantas generadas también estarán libres de contaminantes y enfermedades.

En segundo lugar, se puede utilizar un medio libre de componentes animales y químicamente definido para reducir la posibilidad de desencadenar una reacción alérgica por parte usuario. Esto se logra sustituyendo el suero animal y los factores de crecimiento derivados de animales (por ejemplo, insulina bovina) en el medio por factores de crecimiento recombinantes. No se requiere un extracto vegetal/hidrolizado en un medio químicamente definido.

En tercer lugar, la consistencia de lote a lote de materias primas derivadas de animales o materias primas derivadas de plantas puede mejorarse significativamente. Esto se debe a que el perfil nutricional (carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, minerales) del medio basal es conocido, consistente y puede refinarse aún más utilizando un medio químicamente definido, es decir, un medio con concentraciones conocidas de todos los nutrientes y factores de crecimiento.

En cuarto lugar, se mejora la trazabilidad. Dado que se conoce la cadena de suministro para cada componente del medio de cultivo, todo podría rastrearse fácilmente hasta su origen.

5 En quinto lugar, se reduce el sufrimiento y el sacrificio de los animales. La ejecución del proceso de producción no requiere un suministro continuo de tejidos animales de animales silvestres. Inicialmente, las células iniciadoras se purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se desarrollan en una línea celular, que se puede conservar criogénicamente y propagar indefinidamente en un medio de cultivo. Esto limita el sufrimiento y el sacrificio de los animales.

10 En sexto lugar, se reduce el desperdicio y se mejora la eficiencia. Los nutrientes en el medio se suministran directamente a las células para el crecimiento celular. Cada célula cultivada se lisa para producir el hidrolizado celular. No existe desperdicio de energía y nutrientes para el crecimiento de partes no utilizadas de animales, plantas o procesos biológicos como el apareamiento y la locomoción de animales.

15 Además, la presente invención crea valores para los consumidores o fabricantes de diversas industrias o productos, que incluyen, entre otros, suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales, ya que la invención soluciona todos los inconvenientes identificados en los métodos convencionales, como se menciona en la sección de antecedentes. La presente invención proporciona los siguientes beneficios: las materias primas derivadas de animales
20 y/o las materias primas derivadas de plantas de los productos generados por la producción de carne *in vitro* de la presente invención ofrecen muchos beneficios en comparación con aquellos creados a partir de animales o plantas silvestres.

En primer lugar, no depende de una alimentación continua de las fuentes animales. Por ejemplo, para producir más crema a base de colágeno mediante el método convencional, se
25 necesitan más porciones del cuerpo de los animales, lo que puede suponer más sufrimiento o sacrificio animal. En la presente invención, las células iniciales (no limitadas a células madre, células musculares, fibroblastos o adipocitos) se purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se constituyen en una línea celular. La línea celular se puede preservar criogénicamente y almacenar en nitrógeno líquido. Cuando sea necesario, la línea celular puede descongelarse y
30 propagarse indefinidamente bajo condiciones de cultivo celular para producir ingredientes activos (por ejemplo, factores de crecimiento o moléculas de la MEC). Por lo tanto, la totalidad del proceso es autosostenible y reduce el sufrimiento/sacrificio de los animales.

En segundo lugar, no hay dependencia de la fuente animal. En la presente invención, las células iniciales (no limitadas a células madre, células musculares, fibroblastos o adipocitos) se

purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se constituyen en una línea celular. La línea celular no se modifica genéticamente.

En tercer lugar, las materias primas derivadas de la presente invención son multifuncionales, ya que incluyen una gran cantidad de trazas de proteínas funcionales, además de la proteína diana principal. Esta cantidad traza de proteínas funcionales puede ser esencial para muchas funciones celulares. Un producto creado a partir de materias primas derivadas con un perfil proteico funcional más cercano a una porción animal/vegetal silvestre extraída, generalmente proporciona un mejor rendimiento que un producto obtenido a partir de materias primas derivadas con un perfil proteico funcional menos completo. Aunque se pueden añadir proteínas funcionales a las materias primas derivadas mediante reemplazos externos, es difícil reponer varias proteínas funcionales. Además, los costos se incrementan con un mayor número de reemplazos.

En cuarto lugar, las proteínas funcionales obtenidas mediante la presente invención no contienen residuos, ya que el ingrediente en el medio de cultivo está bien controlado.

En quinto lugar, la materia prima derivada obtenida mediante la presente invención no contiene productos químicos nocivos, ya que las proteínas funcionales no se extraen utilizando productos químicos nocivos. El ingrediente del medio de cultivo está bien controlado.

En sexto lugar, las proteínas funcionales obtenidas mediante la presente invención no contienen residuos ni sustancias químicas nocivas, por lo que no es necesario aislarlas y purificarlas adicionalmente. Por lo tanto, se pueden reducir los costos de producción.

Los beneficios de la presente invención permiten crear nuevos valores que satisfacen las necesidades de los consumidores. La invención proporciona el ingrediente activo de varios productos o de los productos propiamente (que incluye, entre otros, suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, medicamentos y otras aplicaciones medicinales) con las siguientes características:

(1) etiqueta con información clara no engañosa, a causa de la alta pureza y la inexistencia de residuos o productos químicos nocivos en las materias primas derivadas;

(2) sostenibilidad, gracias a la poca o escasa dependencia de fuentes animales y/o vegetales;

(3) síntesis no química, gracias al uso de biomateriales;

(4) carácter multifuncional, gracias a su perfil molecular completo con todas las proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto; y

(5) respaldada por principios científicos y resultados de ensayos.

Como un ejemplo, la Figura 1 muestra un análisis de transferencia western blot de proteínas en un tejido de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla (etiquetado como A) y una línea celular de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla (etiquetada como B). Se ilustra que las células

cultivadas *in vitro* contienen proteínas similares al tejido original obtenido de un animal. Por lo tanto, se muestra que los beneficios anteriores se pueden obtener completamente mediante la presente invención.

El método para producir la composición de hidrolizado celular a partir del cultivo celular *in vitro* implica las etapas de recolectar las células del cultivo celular *in vitro* ("etapa de recolección"), lisar las células recolectadas para liberar todos los polipéptidos proteicos de las células recolectadas ("etapa de lisado") y una etapa de digestión opcional en la que los polipéptidos proteicos de la etapa de lisado se cortan/seccionan ("etapa de digestión"). En particular, la etapa de recolección puede comprender las etapas de separación de las células en el cultivo celular *in vitro* del medio de cultivo celular, que puede comprender además una etapa de eliminación de las células del contenedor del cultivo celular *in vitro* y/o una etapa de aislamiento de las células. El aislamiento puede implicar centrifugación para separar las células del medio de cultivo celular y/o una filtración para separar las células del medio de cultivo celular. En algunas modalidades, se puede utilizar una membrana que tiene un tamaño de poro dentro de un rango de 5 µm a 60 µm. La etapa de lisado puede comprender además lisar las células mediante el uso de medios mecánicos que incluyen, entre otros, la sonicación, el uso de un homogeneizador de alta presión, la trituración manual y/o ciclos de congelación/descongelación. También se pueden utilizar medios no mecánicos para lisar las células, que incluyen, entre otros, el calentamiento, el choque osmótico, la cavitación, el uso de álcalis y/o detergente(s), hidrólisis ácida y/o enzima(s). Para la etapa de digestión opcional, se pueden usar diferentes enzimas o reactivos químicos, que incluyen, de manera no limitativa, subtilisina, quimotripsina, tripsina, carboxipeptidasa, elastasa, pepsina, proteinasa K y/o bromuro de cianógeno.

La composición obtenida a partir del método anterior se puede aplicar como un agente tópico en suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cosméticos y productos para el cuidado de heridas. El hidrolizado también puede utilizarse como un ingrediente activo en varios productos, incluyendo, de manera no limitativa, suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales.

A continuación, en referencia a las figuras, y específicamente a la Figura 2, se ilustra un método para producir un hidrolizado celular a partir de cultivo celular *in vitro* en una modalidad. En la etapa de crecimiento celular (100), en primer lugar se cultivan las células bajo condiciones controladas usando un medio de cultivo que está parcialmente definido (es decir, un medio basal definido complementado con FBS/hidrolizados vegetales/lisado plaquetario humano) o un medio químicamente definido (es decir, un medio que tiene concentraciones definidas de todos los nutrientes y factores de crecimiento) que no contiene componentes animales o vegetales. En aun

algunas modalidades, se puede utilizar al menos una línea celular en la etapa de crecimiento celular (100). En algunas modalidades, las líneas celulares incluyen células madre, células musculares, fibroblastos y adipocitos. En aun una modalidad específica, se utilizan células de vejiga natatoria de peces cultivadas en la etapa de crecimiento celular (100).

5 En la etapa de separación (102), las células se separan de su superficie adherida y se recolecta la suspensión celular en un tubo.

En algunas modalidades, la etapa de separación (102) puede omitirse si las células se recolectan de un cultivo celular en suspensión *in vitro*.

10 La mezcla obtenida de la etapa de separación (102) se centrifuga en un rango de entre 100 x g a 500 x g durante 1-10 minutos en la etapa de centrifugación (104), preferentemente a 300 x g durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se obtiene el sedimento celular. En algunas modalidades, el sedimento celular se puede volver a suspender en un medio y se puede llevar a cabo la etapa de centrifugación (104) más de una vez. En algunas modalidades, se puede utilizar otra velocidad y tiempo para la centrifugación.

15 En la etapa de resuspensión (106), el sedimento celular se suspende en PBS a un volumen predeterminado. En algunas modalidades, el sedimento celular se suspende en 1 ml de PBS. En algunas modalidades, el sedimento celular puede suspenderse en un tampón o solución salina distinta a PBS, por ejemplo, en solución salina equilibrada de Hank.

En la etapa de lisis (108), las células de la etapa (106) se lisan mediante sonicación.

20 Después de la lisis celular por sonicación, la fracción soluble se aísla de los desechos celulares. Las proteínas en la fracción soluble se digieren enzimáticamente en péptidos funcionales cortos en la etapa de digestión (110). La proteasa deseada se añade a la fracción soluble a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 40 °C durante 1-5 horas, preferentemente a 30 °C durante 2 horas. En algunas modalidades, la proteasa es pepsina, proteinasa K o tripsina, 25 preferentemente proteinasa K o tripsina. Se obtienen péptidos que tienen diferentes tamaños moleculares. En algunas modalidades, se prefieren los péptidos que tienen un tamaño molecular que varía entre 100 Daltons (Da) y 800 Da. Particularmente se prefieren péptidos que tienen un tamaño molecular menor a 500 Da porque las moléculas que tienen un tamaño molecular mayor a 500 Daltons (Da) no penetran eficazmente a través de la epidermis más externa y son absorbidas por las 30 capas de piel subyacentes. En otras modalidades adicionales, se prefieren péptidos que tienen un tamaño molecular que varía entre 100 Daltons (Da) y 500 Da. En algunas modalidades, se agrega una cantidad apropiada de proteasa a la suspensión celular para descomponer las proteínas celulares en péptidos más pequeños. Se lleva a cabo la digestión durante 1-3 horas, preferiblemente durante 2 horas, y se mantiene el tubo dentro de un rango de temperatura de 25 °C a 40 °C en baño 35 de agua, preferiblemente a 30 °C.

Después de la etapa de digestión (110), la mezcla de la etapa de digestión (110) se centrifuga a un rango de 15000 x g a 25000 x g durante 15-35 minutos en la etapa de aislamiento (112) para aclarar el líquido y eliminar cualquier residuo de mayor tamaño, preferentemente a 15000 x g durante 20 minutos. En algunas modalidades, la etapa de aislamiento (112) se puede llevar a cabo al filtrar la mezcla de la etapa de digestión (110). En algunas modalidades, se puede utilizar una membrana que tiene un tamaño de poro dentro de un rango de 0.05 μm a 0.5 μm . Los sobrenadantes de los tubos de microcentrifuga se combinan en un tubo, preferentemente un tubo de 50 ml. Se evita agitar los sedimentos en los tubos de microcentrifuga.

En la etapa de finalización (114), la actividad de digestión enzimática se detiene mediante calentamiento y/o dilución. En algunas modalidades, la etapa de finalización (114) puede realizarse antes de la etapa de aislamiento (112).

Si el hidrolizado no se utiliza inmediatamente, en algunas modalidades se almacena a una temperatura en un rango de +4 a -30 grados Celsius, preferentemente de -10 grados Celsius.

Composiciones de hidrolizado celular

Una composición de hidrolizado celular, en la que la composición comprende sustancialmente todos los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de sustancialmente todas las proteínas en una célula de un cultivo celular *in vitro*; y (ii) que está sustancialmente libre de desechos y metabolitos de los medios de cultivo utilizados en el cultivo celular *in vitro*, que comprende, de manera no limitativa, al menos uno de los siguientes compuestos: amoníaco, lactato, piruvato y putrescina. En algunas modalidades, la composición está sustancialmente libre de desechos y metabolitos de los medios de cultivo utilizados en el cultivo celular *in vitro* que comprende todo el amoníaco, lactato, piruvato y putrescina. Los polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos pueden variar en tamaño, entre alrededor de 100 Daltons (Da) y alrededor de 800 Da. En algunas modalidades, el tamaño molecular promedio de los polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos puede ser menor a alrededor de 500 Da. En otras modalidades, el tamaño molecular promedio de los polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos varía entre alrededor de 100 Da y alrededor de 500 Da. Las composiciones de hidrolizado celular se pueden almacenar a una temperatura refrigerada (es decir, de +4 °C a -30 °C). En una modalidad, la composición de hidrolizado celular puede ser estable durante alrededor de una semana a alrededor de cuatro semanas. En otra modalidad, la composición de hidrolizado celular puede ser estable durante alrededor de un mes a alrededor de seis meses. En una modalidad adicional, la composición de hidrolizado celular puede ser estable durante alrededor de más de seis meses.

La composición de hidrolizado celular se puede secar. Por ejemplo, la composición de hidrolizado celular puede liofilizarse, secarse al vacío o secarse al aire. La temperatura para el secado es preferiblemente inferior a 150 °C.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de al menos un cultivo de células animales. En otras modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptido se derivan de al menos un cultivo de células vegetales. En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de una combinación de un cultivo de células animales y un cultivo de células vegetales. En aun algunas modalidades, los polipéptidos de proteína y/o fragmentos de polipéptido se derivan de la línea celular de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla. En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de cultivos celulares mutados (tanto de animales como de plantas). En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o los fragmentos de polipéptidos se derivan de cultivos celulares humanos mutados o no mutados.

En algunas modalidades, la composición del hidrolizado celular comprende además Lumican, Fibulina, Condroitina, Quitosano, Glicosaminoglicano (condroitina y heparán), Condroadherina y Tropomiosina, etc.

En algunas modalidades, la composición de hidrolizado celular comprende: (i) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del colágeno 1 $\alpha 1$; (ii) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del colágeno 1 $\beta 1$; (iii) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTFG); y (iv) una mezcla de polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de Decorina.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de una línea celular de vejiga natatoria de corvina amarilla procedente de un cultivo celular *in vitro*. En otras modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de una línea celular de vejiga natatoria de corvina de aleta amarilla de un cultivo celular *in vitro* y al menos una línea celular animal y/o una línea celular vegetal de un cultivo celular *in vitro*. En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de cultivos celulares mutados (tanto de animales como de plantas). En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o los fragmentos de polipéptidos se derivan de cultivos celulares humanos mutados o no mutados.

En algunas modalidades, la composición está sustancialmente libre de desechos y metabolitos que comprenden, de manera no limitativa, al menos uno de los siguientes compuestos: amoníaco, lactato, piruvato y putrescina. En algunas modalidades, la composición está

sustancialmente libre de desechos y metabolitos que comprenden todo el amoníaco, lactato, piruvato y putrescina.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o los fragmentos de polipéptidos se derivan de la línea celular de la vejiga natatoria de la corvina amarilla a partir de un cultivo celular *in vitro* y se digieren enzimáticamente con tripsina. En algunas modalidades, (i) la mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 α 1 comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 1- 112; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 β 1 comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 113 - 214; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 215 – 249; y (iv) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de decorina comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 250 – 285.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o los fragmentos de polipéptidos se derivan de la línea celular de la vejiga natatoria de la corvina amarilla a partir de un cultivo celular *in vitro* y se digieren enzimáticamente con tripsina. En algunas modalidades, (i) la mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 α 1 comprende al menos 56 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 1- 112; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 β 1 comprende al menos 51 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 113 - 214; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende al menos 17 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 215 – 249; y (iv) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de decorina comprende al menos 18 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 250 – 285.

En algunas modalidades, (i) la mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 α 1 comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 1- 112; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 β 1 comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 113 - 214; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 215 – 249; y (iv) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de decorina comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 250 – 285.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de la línea celular de la vejiga natatoria de corvina amarilla a partir de un cultivo celular *in vitro* y se digieren enzimáticamente con proteinasa K. En algunas modalidades, (i) la mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 $\alpha 1$ comprende al menos 1
 5 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 286- 488; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 $\beta 1$ comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 489-657; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 658 - 722; y (iv) una
 10 mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de la Decorina comprende al menos 1 fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID: 723 - 809.

En algunas modalidades, los polipéptidos proteicos y/o fragmentos de polipéptidos se derivan de la línea celular de la vejiga natatoria de corvina amarilla a partir de un cultivo celular *in vitro* y se digieren enzimáticamente con proteinasa K. En algunas modalidades, (i) la mezcla de
 15 polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 $\alpha 1$ comprende al menos 101 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 286- 488; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 $\beta 1$ comprende al menos 84 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 489-657; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende al
 20 menos 32 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 658 - 722; y (iv) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de la Decorina comprende al menos 43 fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 723 - 809.

En algunas modalidades, (i) la mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos
 25 derivados de colágeno 1 $\alpha 1$ comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 286-488; (ii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de colágeno 1 $\beta 1$ comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 489 - 657; (iii) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de CTFG comprende
 30 sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 658 – 722; y (iv) una mezcla de polipéptidos y/o fragmentos de polipéptidos derivados de decorina comprende sustancialmente todos los fragmentos de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID: 723 – 809.

En algunas modalidades, la composición del hidrolizado celular comprende además Lumican, Fibulina, Condroitina, Quitosano, Glicosaminoglicano (condroitina y heparán), Condroadherina y Tropomiosina, etc.

Además, la invención también abarca fragmentos de polipéptidos que son sustancialmente similares en términos de secuencia a aquellos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-809. En una modalidad, el fragmento de polipéptido puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con un fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-809. En otra modalidad, el fragmento de polipéptido puede tener al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a un fragmento de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-809.

También se contempla que las composiciones de hidrolizado celular de la invención pueden comprender además una proteína no hidrolizada (es decir, intacta). La proteína no hidrolizada puede estar presente en una preparación esencialmente intacta. Además, la proteína no hidrolizada puede aislarse de un cultivo *in vitro* vegetal o aislarse de un cultivo *in vitro* animal. Las proporciones relativas del hidrolizado de proteína y la proteína no hidrolizada pueden variar en función de la aplicación de la composición de hidrolizado celular.

Los múltiples polipéptidos proteicos, fragmentos de polipéptidos proteicos y/u otros ingredientes en la célula del cultivo celular *in vitro* contenidos en la composición de hidrolizado celular proporcionan efectos y beneficios sinérgicos en diversas aplicaciones que incluyen, entre otros, favorecer la salud general, la salud del cabello, la salud de la piel, la cicatrización de heridas, la salud de las articulaciones y la regulación del colágeno y el desarrollo del cartílago.

En algunas modalidades, la composición de hidrolizado celular tiene un pH que varía entre 6.5 y 8.5. En otras modalidades, la composición de hidrolizado celular es soluble en agua. Sin embargo, en algunas modalidades, el color de la composición de hidrolizado celular varía de incoloro a amarillo pálido.

Productos que comprenden la composición de hidrolizado celular

La composición de hidrolizado celular de la presente invención puede aplicarse como un agente tópico en suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cosméticos y productos para el cuidado de heridas. El hidrolizado también puede utilizarse como un ingrediente activo en varios productos, incluyendo, de manera no limitativa, suplementos dietéticos, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones médicas.

Otro aspecto de la presente invención consiste en una composición farmacéutica que comprende la composición de hidrolizado celular, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Para los suplementos dietéticos, el cuidado del cabello, el cuidado de la piel, el cuidado de heridas, los productos cosméticos o tópicos, el hidrolizado de células cultivadas es rico en nutrientes, contiene múltiples polipéptidos de proteínas y/o fragmentos de polipéptidos que estimulan la reparación y regeneración de células de la piel, y tienen un tamaño molecular menor a 500 Daltons (Da). El hidrolizado de la presente invención puede producir y tener un efecto en las capas profundas de la piel (dermis, hipodermis) ya que el hidrolizado de la presente invención es lo
10 suficientemente pequeño como para pasar a través del estrato córneo y también mantiene los dominios proteicos fundamentales de los factores de crecimiento y citocinas para desencadenar sus actividades funcionales.

En referencia a la Figura 3A, la gráfica ilustra la diferencia en la expresión génica entre las células de la piel que se tratan con la composición del hidrolizado celular y las células de la
15 piel que no se tratan con el hidrolizado celular bajo circunstancias de regeneración. La figura muestra que la composición de hidrolizado celular de la presente invención potencia el metabolismo de las proteínas de la piel, aumenta la producción de colágeno, fortalece la microestructura de la piel, revitaliza el cutis y el tono de la piel de adentro hacia afuera y mantiene la integridad de la piel y de los folículos pilosos.

20 En referencia a la Figura 3B, la gráfica ilustra la diferencia en la supervivencia celular entre las células de la piel que se tratan con la composición de hidrolizado celular (el péptido A se refiere a la composición de hidrolizado celular de la presente invención que comprende las SEQ ID: 286 – 809; y el péptido B se refiere a la composición de hidrolizado celular de la presente invención que comprende las SEQ ID: 1- 285) y las células de la piel que no se tratan con hidrolizado celular
25 bajo condiciones antioxidantes (en este ejemplo específico, bajo condiciones con peróxido de hidrógeno). Se muestra que las composiciones de hidrolizado celular de la presente invención, especialmente el péptido B, promueven la propia defensa antioxidante de la célula, ayudan a proteger las células de los contaminantes y los irritantes ambientales dañinos, que causan el envejecimiento prematuro de la piel, así como incrementan la supervivencia celular de la piel por
30 estrés oxidativo.

En referencia a la Figura 3C, la gráfica ilustra la diferencia en la expresión génica entre las células de la piel que se tratan con el hidrolizado celular y las células de la piel que no se tratan con el hidrolizado celular bajo condiciones de reparación de la piel. Se muestra que la composición de hidrolizado celular de la presente invención fortalece la barrera cutánea que protege

al cuerpo de la deshidratación o de daños, repara la piel dañada y previene el envejecimiento prematuro, así como mejora la salud general de la piel para una apariencia más joven.

La descripción anterior es ilustrativa mas no limitativa. Para los expertos en la materia, resultarán evidentes distintas variaciones de las modalidades una vez que hayan leído la presente divulgación. Por lo tanto, el alcance de las modalidades no debe determinarse con
5 referencia a la descripción anterior, sino que debe determinarse con referencia a las reivindicaciones pendientes junto con su alcance completo o equivalentes.

Una o más características de cualquier modalidad se pueden combinar con una o más características de cualquier otra modalidad, sin apartarse del alcance de las modalidades. La
10 expresión "un", "uno" "una" o "el/la" se entiende como "un/uno/una o más", a menos que se indique específicamente lo contrario. La expresión "y/o" pretende representar el sentido más inclusivo del término, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Si bien la presente divulgación puede manifestarse bajo muchas formas distintas, las figuras y la descripción se presentan en el entendido de que la presente divulgación es una
15 ejemplificación de los principios de una o más invenciones, y no pretende limitar ninguna modalidad a las modalidades ilustradas.

Por lo tanto, la divulgación, en sus aspectos más amplios, no se limita a los detalles específicos, al sistema, a los métodos representativos o a los ejemplos ilustrativos mostrados y descritos anteriormente. Se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones a la descripción
20 anterior sin apartarse del alcance o espíritu de la presente divulgación, y se pretende que la presente divulgación cubra todas esas modificaciones y variaciones siempre que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.