

# **COMPOSICIÓN POSTBIÓTICA PARA TRASTORNOS CUTÁNEOS Y USO COSMÉTICO**

## **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención describe una composición postbiótica que comprende lisados de microorganismos probióticos para su uso como tratamiento de trastornos cutáneos y uso cosmético, que es extremadamente segura, incluso durante un período de consumo largo.

## **ANTECEDENTES**

Hoy en día, los trastornos cutáneos figuran entre las enfermedades más comunes y frecuentes. Estas incluyen eccema, psoriasis, acné, rosácea, ictiosis, vitíligo, urticaria y dermatitis seborreica. La etiología de estas enfermedades, así como sus síntomas clínicos, es tan diversa que en muchos casos resultan muy difíciles de tratar.

Debido a su muy diversa etiología, los médicos tienen grandes dificultades para diagnosticar, pero sobre todo para controlar este tipo de enfermedad de la manera más adecuada posible. En muchos casos, este tipo de patología se trata con corticoides, que son un tipo de hormonas producidas por nuestras glándulas suprarrenales, de las que la más importante es el cortisol. Se sabe que los corticoesteroides tienen potentes propiedades antiinflamatorias e inmunodepresoras, especialmente cuando se usan a dosis farmacológicas. Por este motivo, se han utilizado ampliamente para tratar diversas enfermedades inflamatorias, incluidas las que afectan a la piel.

No obstante, se sabe que estos tratamientos tienen un efecto perjudicial para los pacientes. En la mayoría de los casos, existe un alto riesgo de absorción sistémica cuando se utilizan por vía tópica, con todos los riesgos que esto implica. Además, pueden tener otros efectos secundarios cuando no se aplican adecuadamente, como atrofia (adelgazamiento) de la piel, estrías y telangiectasias. Esto suscita dudas sobre la idoneidad de estos tratamientos, a la vez que sirve de incentivo para que los especialistas busquen tratamientos alternativos.

Los tratamientos alternativos incluyen el uso de antiinflamatorios naturales, tales como cúrcuma, sauce blanco, harpagófito, jengibre, bromelina (piña), árnica, omega 3. Sin embargo, este tipo de tratamiento no es igual de eficaz en todos los casos.

Por este motivo, al enfrentarse al problema técnico de los tratamientos actuales, se están realizando trabajos activos en el la técnica para desarrollar tratamientos y composiciones que puedan administrarse tanto por vía oral como tópica para mejorar la eficacia de los tratamientos para los trastornos cutáneos. A modo de ejemplo, se cita el siguiente documento de patente:

el documento WO2022185238A1 divulga una composición tópica para uso cosmético que comprende *Micrococcus luteus* Q24

Sin embargo, ninguno de los documentos encontrados en la técnica anterior divulga la composición postbiótica de la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades cutáneas y para su uso cosmético estable mediante aplicación tópica u oral.

Asimismo, cabe destacar las solicitudes de patente españolas P201930242 y P201930280 de los mismos inventores de la presente composición postbiótica, que describen una composición moduladora del microbioma intestinal humano obtenida de lisados de microorganismos probióticos y su método de obtención, así como un suplemento alimenticio que comprende la composición, que es útil en la prevención y el tratamiento de trastornos provocados, o al menos fomentados, por la disbiosis intestinal. Dichos documentos no divulgan ni sugieren el uso de una composición obtenida de lisados de microorganismos probióticos para trastornos cutáneos.

Por lo tanto, la presente invención pretende resolver los problemas de la técnica anterior mediante el uso de una composición administrada por vía oral o tópica obtenida de lisados de microorganismos probióticos para el tratamiento de trastornos cutáneos y para uso cosmético en la piel.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En el presente informe, las expresiones "composición de la invención" y "composición postbiótica" son sinónimas y se utilizan indistintamente.

En el presente informe, el término microorganismos incluye tanto bacterias como levaduras.

La acción inmunomoduladora se entiende, en el contexto de la presente invención, como el conjunto de moléculas de las paredes celulares y el lisado de células y las células no viables que modulan la respuesta inmunitaria innata mediante la liberación de citocinas y, por lo

tanto, potencian la respuesta inmunitaria contra los trastornos cutáneos.

En el presente informe, las expresiones "trastornos cutáneos", "enfermedades cutáneas" y "alteraciones cutáneas" son sinónimas y se utilizan indistintamente.

Los términos "tratamiento" y "tratar", como se utilizan en el presente documento, se refieren al control médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, patología o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, patología o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad, patología o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que para la cura de la enfermedad, patología o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, patología o trastorno; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento que se emplea para complementar otra terapia específica que está dirigida a la mejora de la enfermedad, patología o trastorno. Se entiende que el tratamiento, aunque tiene la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, patología o trastorno, no da necesariamente como resultado la cura, mejora, estabilización o prevención. Los efectos de los tratamientos pueden medirse o evaluarse como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica como adecuado para la enfermedad, patología o trastorno implicado. Dichas mediciones y evaluaciones pueden realizarse en términos cualitativos y/o cuantitativos. Por tanto, por ejemplo, las características o rasgos de una enfermedad, patología o trastorno y/o los síntomas de una enfermedad, patología o trastorno pueden reducirse a cualquier efecto o en cualquier cantidad. En el contexto de un sujeto que padece trastornos cutáneos, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren al control médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar o estabilizar trastornos cutáneos. En el contexto de un sujeto en riesgo de desarrollar trastornos cutáneos, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren al control médico de un sujeto con la intención de prevenir trastornos cutáneos.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición postbiótica que comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al peso total de los lisados de microorganismos de la composición:

- del 6 % al 19 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;

- del 4 % al 8 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- del 15 % al 25 % de lisados bacterianos del género *Lactobacillus*;
- del 50 % al 60 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- del 1,5 % al 7 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos en un sujeto.

En una realización particular, la composición postbiótica de la invención comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al peso total de los lisados de microorganismos de la composición:

- del 13 % al 19 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;
- del 4 % al 8 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- del 15 % al 25 % de lisados bacterianos del género *Lactobacillus*;
- del 50 % al 60 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- del 1,5 % al 5 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos.

De acuerdo con la invención, la composición puede comprender entre el 1 % y el 99,5 % en peso de lisados de microorganismos; en particular el 5 %-99 % en peso de lisados de microorganismos, en particular el 10 %-96 % en peso de lisados de microorganismos, en particular el 25 %-95 % en peso de lisados de microorganismos o en particular el 50 %±10 % en peso de lisados de microorganismos.

En una realización particular, la composición postbiótica de la invención se administra por vía oral o tópica.

Como se ha indicado anteriormente, los inventores han identificado la necesidad de desarrollar una composición que se administra tanto por vía oral como tópica, que es fácil de administrar y que no presenta toxicidad para la piel.

Basándose en esto, los inventores han desarrollado una composición postbiótica que puede administrarse por vía oral o tópica, que comprende lisados de microorganismos que pueden estar acompañados de otros componentes y que se ha demostrado que es sorprendentemente beneficiosa para seres humanos y animales, ya que tiene un carácter inmunomodulador.

La composición de la invención puede comprender componentes o aditivos adicionales, o cualquier otra sustancia, tal como sales o excipientes que facilitan el envasado, la preparación y/o la administración de la composición, pero que no afectan a la capacidad de tratamiento de las enfermedades cutáneas de la composición postbiótica de la invención.

En el contexto de la presente invención, se entiende que los lisados de microorganismos probióticos son el producto obtenido después del procedimiento de cultivo y posterior lisis mecánica o química de estas células para obtener un producto con fragmentos microbianos, así como los componentes contenidos en el mismo. Asimismo, este documento afirma que son lisados de microorganismos probióticos desecados, puesto que, gracias al método empleado para obtenerlos, dichos lisados se someten posteriormente a técnicas de secado, de modo que dichos lisados desecados se encuentran opcionalmente en forma de un polvo seco.

En realizaciones preferidas de la presente invención, los lisados bacterianos del género *Bacillus* son de especies seleccionadas del grupo que consiste en *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus paralicheniformes* y combinaciones de los mismos. Preferentemente, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*.

En otras realizaciones, los lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* son de las especies *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* y combinaciones de los mismos, preferentemente *Bifidobacterium lactis*.

En otras realizaciones, los lisados bacterianos del género *Lactobacillus* son de especies seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* y combinaciones de los mismos, preferentemente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*.

En otras realizaciones particulares de la presente invención, los lisados de levaduras del

género *Saccharomyces* son especies seleccionadas del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardi* y combinaciones de los mismos, preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

En otras realizaciones particulares de la presente invención, los lisados bacterianos del género *Streptococcus* son de la especie *Streptococcus thermophilus*.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición de la invención comprende lisados bacterianos del género *Bacillus* en una cantidad en porcentaje en peso de entre aproximadamente el 6 % y el 19 % de los lisados totales de la composición, preferentemente del 13 % al 19 % de los lisados totales de la composición. En realizaciones preferidas, la cantidad de lisados bacterianos del género *Bacillus* puede ser de aproximadamente el 14 %, 15 %, 16 %, 17 % o 18 % de los lisados totales de la composición.

En una realización particular, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición de la invención comprende lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* en una cantidad en porcentaje en peso de entre aproximadamente el 4 % y el 8 % de los lisados totales de la composición, preferentemente entre el 5 % y el 7 %. En realizaciones preferidas, la cantidad de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* puede ser de aproximadamente el 5 %, 6 %, 7 % u 8 % de los lisados totales de la composición.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición de la invención comprende lisados bacterianos del género *Lactobacillus* en una cantidad en porcentaje en peso de entre aproximadamente el 15 % y el 25 % de los lisados totales de la composición, preferentemente entre el 20 % y el 24 % de los lisados totales de la composición. En realizaciones preferidas, la cantidad de lisados bacterianos del género *Lactobacillus* puede ser de aproximadamente el 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % o 25 % de los lisados totales de la composición.

En otra realización particular, el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el del resto de las especies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

En una realización particular, el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* es aproximadamente igual, y es mayor que el de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que también es aproximadamente igual y mayor que el de *Lactobacillus rhamnosus*.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición comprende lisados de levaduras del género *Saccharomyces* en una cantidad en porcentaje en peso de entre aproximadamente el 50 % y el 60 % de los lisados totales de la composición, preferentemente entre el 52 % y el 57 % de los lisados totales de la composición. En realizaciones preferidas, la cantidad de lisados de levaduras del género *Saccharomyces* puede ser de aproximadamente el 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 % o 60 % de los lisados totales de la composición.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición comprende lisados bacterianos del género *Streptococcus* en una cantidad en porcentaje en peso de entre aproximadamente el 1,5 % y el 5 % de los lisados totales de la composición, preferentemente entre aproximadamente el 3 % y el 4 % de los lisados totales de la composición. En desarrollos preferidos, la cantidad de lisados bacterianos del género *Streptococcus* puede ser de aproximadamente el 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 % o 3 % de los lisados totales de la composición. En otras realizaciones preferidas, la cantidad de lisados bacterianos del género *Streptococcus* puede ser de aproximadamente el 3,5 %, 4 %, 4,5 % o 5 % de los lisados totales de la composición.

En una realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición:

- de aproximadamente el 13 % al 17 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;
- de aproximadamente el 4,5 % al 7,5 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- de aproximadamente el 20 % al 22 % de lisados bacterianos del género

*Lactobacillus*;

- de aproximadamente el 53 % al 57 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- de aproximadamente el 2,5 % al 3,5 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

Esta composición se denomina composición "A".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición:

- de aproximadamente el 14 % al 17 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;
- de aproximadamente el 4,6 % al 6,5 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- de aproximadamente el 20,5 % al 21,8 % de lisados bacterianos del género *Lactobacillus*;
- de aproximadamente el 55 % al 56,5 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- de aproximadamente el 2,8 % al 3,2 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

Esta composición se denomina composición "B".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 6 % al 19 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*;
- de aproximadamente el 4 % al 8 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 15 % al 25 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*;
- de aproximadamente el 50 % al 60 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 1,5 % al 7 % de lisados bacterianos de *Streptococcus*

*thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "C".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 13 % al 19 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*;
- de aproximadamente el 4 % al 8 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 15 % al 25 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*;
- de aproximadamente el 50 % al 60 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 1,5 % al 5 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "D".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 13 % al 17 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*;
- de aproximadamente el 4,5 % al 7,5 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 20 % al 22 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*;
- de aproximadamente el 53 % al 57 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 2,5 % al 3,5 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "E".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 14 % al 17 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*;
- de aproximadamente el 4,6 % al 6,5 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 20,5 % al 21,8 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*;
- de aproximadamente el 55 % al 56,5 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 2,8 % al 3,2 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "F".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 6 % al 19 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.
- de aproximadamente el 4 % al 8 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 15 % al 25 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus*
- de aproximadamente el 50 % al 60 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 1,5 % al 7 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "G".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 13 % al 19 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.
- de aproximadamente el 4 % al 8 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 15 % al 25 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus*
- de aproximadamente el 50 % al 60 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 1,5 % al 5 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "H".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 13 % al 17 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.
- de aproximadamente el 4,5 % al 7,5 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 20 % al 22 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus*
- de aproximadamente el 53 % al 57 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;

- de aproximadamente el 2,5 % al 3,5 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "I".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 14 % al 17 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.
- de aproximadamente el 4,6 % al 6,5 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 20,5 % al 21,8 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus*
- de aproximadamente el 55 % al 56,5 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 2,8 % al 3,2 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "J".

En otra realización particular de la invención, la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al total:

- de aproximadamente el 6 % al 19 % de los lisados bacterianos de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.
- de aproximadamente el 4 % al 8 % de lisados bacterianos de *Bifidobacterium lactis*;
- de aproximadamente el 15 % al 25 % de lisados bacterianos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* y

*Lactobacillus rhamnosus*, el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* es aproximadamente igual, y es mayor que el de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que también es aproximadamente igual y mayor que el de *Lactobacillus rhamnosus*.

- de aproximadamente el 50 % al 60 % de los lisados de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*;
- de aproximadamente el 1,5 % al 7 % de lisados bacterianos de *Streptococcus thermophilus*.

Esta composición se denomina composición "K".

En otras realizaciones particulares de la presente invención, pueden ser componentes o aditivos adicionales: hidratos de carbono (fructosa, xilitol, sorbitol, fructooligosacáridos, inulina), antioxidantes (resveratrol, betacaroteno), vitaminas (Vitamina C, D, K, B1, B9, E, B3, B5, A, B3, B6, H, D3, B12, biotina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico), prebióticos (galactooligosacáridos, inulina, oligofructosa), aminoácidos (cisteína, tirosina, resina, metionina, fenilalanina, glicina, glutamina, alanina, carnitina, glutamina, arginina), lípidos (ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico), oligoelementos (sodio, potasio, magnesio, fósforo, calcio, cobre, cinc, manganeso, cromo, yodo, selenio), enzimas digestivas (papaína, amilasa, lactasa, bromelina), lactosuero.

Estos micro y macronutrientes pueden modular la microbiota intestinal y favorecer el predominio de algunas especies asociadas a un buen estado de salud, tales como especies de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Fecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Blautia*. Entre los macronutrientes, los hidratos de carbono tales como los galactooligosacáridos, los fructooligosacáridos y la inulina tienen un efecto bifidogénico y pueden modular los microorganismos beneficiosos para la salud, así como las grasas insaturadas, que también aumenta la microbiota beneficiosa. Antioxidantes tales como los polifenoles modulan la relación *Firmicutes/Bacteroides*. Las vitaminas, como la vitamina A, C, D y E influyen positivamente en *Bifidobacteria*, *Akkermansia* y *Lactobacillus*. Algunos oligoelementos, tales como el calcio, magnesio, fósforo, selenio y cinc han mostrado un efecto en *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Ruminococcus*. El consumo de prebióticos se ha asociado a la proliferación de *Bifidobacterium* y bacterias acidolácticas. En general, los macro y micronutrientes influyen en la composición y diversidad de la microbiota intestinal.

En una realización particular de la invención, la composición de los lisados y los componentes adicionales es la de la tabla 1. Los componentes adicionales pueden ser uno o más de resveratrol, astaxantina, bromelina, papaína, almidón de arroz fermentado, almidón de maíz y FOS, cada uno de estos componentes en cantidades variables, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Lista de componentes adicionales para la composición de la invención por 100 mg de lisados de microorganismos probióticos.

|                                                       |            |    |
|-------------------------------------------------------|------------|----|
| Composición de lisados de microorganismos probióticos | 100        | Mg |
| Resveratrol                                           | Hasta 2,55 | Mg |
| Astaxantina                                           | Hasta 25   | Mg |
| Bromelina                                             | Hasta 24   | Mg |
| Papaína                                               | Hasta 35,2 | Mg |
| Almidón de arroz fermentado                           | Hasta 110  | Mg |
| Almidón de maíz                                       | Hasta 12   | Mg |
| FOS                                                   | Hasta 70   | Mg |

En el ejemplo específico de la tabla 1, la composición de lisados de microorganismos probióticos representaría el 26,4 % del peso total de la composición de la invención.

La composición postbiótica de la invención, al estar compuesta de lisados de microorganismos de múltiples especies probióticas, está pensada para tratar, es decir, para controlar o al menos mitigar, trastornos cutáneos en un sujeto, en particular aquellos trastornos cutáneos relacionados con enfermedades inflamatorias y/o estrés oxidativo, más concretamente para restaurar alteraciones que dan lugar a disbiosis y tienen impacto en los procesos oxidativos e inflamatorios.

En una realización particular, los trastornos cutáneos son uno o más de los siguientes: eccema, psoriasis, acné, rosácea, ictiosis, vitiligo, urticaria y dermatitis seborreica, disbiosis, así como para controlar la traslocación de microorganismos y/o sus componentes (proteínas, ácidos nucleicos). Además, a diferencia de las composiciones que comprenden probióticos, evita la posible colonización por estos microorganismos, así como el alto coste

de mantenerlos viables durante la preparación de la composición de la invención.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" incluye mamíferos (p. ej., un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, cobaya o roedor), un pez, un ave o un reptil o un anfibio. El sujeto puede ser un invertebrado, más específicamente un artrópodo (p. ej., insectos y crustáceos). El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende que estén cubiertos sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean de sexo masculino o femenino. Un paciente se refiere a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En un aspecto, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a un sujeto que comprende un ser humano o un animal, lo que incluye, pero sin limitación, un ratón, perro, gato, caballo, bóvido u óvido y similares, que necesita el alivio o mejora de una afección médica reconocida.

En realizaciones particulares de la presente invención, la composición de la invención, se obtiene mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- Cultivar las especies microbianas seleccionadas para la preparación de la composición utilizando las condiciones estándar establecidas para las especies microbianas enumeradas en el presente documento;
- Filtrar o centrifugar las especies microbianas hasta obtener una biomasa adecuada de los microorganismos seleccionados;
- Lisar mediante congelación y descongelación y ciclos de tratamiento con ultrasonidos la biomasa obtenida hasta asegurar al menos un 90 % o 91 % o 92 % o 94 % de lisados bacterianos, preferentemente al menos un 95 % o 96 % o 97 % o 98 % y más preferentemente, un 99 % o 100 %;
- Mezclar las diferentes cepas en las proporciones seleccionadas de acuerdo con el porcentaje en peso para obtener la composición de lisados de microorganismos probióticos de la invención.

Un experto sabría encontrar el protocolo adecuado para el crecimiento de los microorganismos de la composición, así como el protocolo para su lisis, puesto que se trata de procedimientos habituales en el estado de la técnica.

En una realización particular, el método de obtención de la composición de la invención comprende una etapa adicional: secado por atomización o liofilización de las biomasas de lisados bacterianos, obteniendo un producto en polvo que comprende todas las cepas

bacterianas seleccionadas para preparar la composición objeto de la invención.

En una realización particular, la composición de la invención se presenta en forma de polvo seco.

Cuando la composición de la invención se presenta en forma de polvo seco, es necesario disolverlo en agua o en cualquier otro líquido que no afecte a las propiedades de los componentes de la composición antes de su ingesta por el paciente. Las ventajas del polvo seco son que es más fácil de transportar y almacenar, y también aumenta la estabilidad y durabilidad de la composición. En el presente documento, polvo seco significa que el nivel de humedad es inferior al 10 %, preferentemente inferior al 5 %, incluso más preferentemente inferior al 1 %.

En realizaciones particulares, la composición de la invención se obtiene a partir de cultivos de microorganismos probióticos de los géneros descritos en el presente documento, que comprenden una determinada cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC). En el contexto de la presente invención, una unidad formadora de colonias es una expresión de microbiología. Es un indicador de la cantidad de microorganismos vivos presentes en un medio.

El proceso de obtención de lisados comprende un tratamiento térmico, alternando ciclos de calentamiento y enfriamiento. Cada lote de cultivo celular viable se resuspende en agua destilada en una relación de 1:2 y se somete a un ciclo de esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Después, se congelan a -20 °C durante 12 horas y se descongelan a temperatura ambiente al día siguiente.

Una vez descongelados, se someten a un tratamiento de ruptura celular por ultrasonidos durante 20 min, con una potencia de salida de 500 W y una amplitud del 40 % y 10 segundos de pausa, obteniéndose una masa de células lisadas del lote probiótico (Qsonica, Q500). La solución final se liofiliza y se tritura para obtener un lisado del microorganismo probiótico en polvo. El polvo se conserva en un ambiente fresco y alejado del calor. El grado de supervivencia no supera en ningún caso una viabilidad final de aproximadamente 7 E3 UFC/ml, lo que implica prácticamente un 100 % de muerte celular.

En realizaciones particulares de la presente invención, se parte de una cantidad de bacterias del género *Bacillus* que comprende aproximadamente entre el 3,49 % y el

20,94 % de las UFC con respecto a las UFC totales de la composición, preferentemente entre aproximadamente el 9,98 % y el 15,75 %. En valores absolutos, el cultivo cultivado, antes de proceder a la lisis de las células, presenta entre  $1\text{E}+11$  y  $5\text{E}+11$  células, preferentemente entre  $2\text{E}+11$  y  $3\text{E}+11$ , lo más preferentemente aproximadamente  $2,65\text{E}+11$ .

En otra realización particular, cuando las especies del género *Bacillus* son: *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*, cada uno de los cultivos cultivados presenta, antes de proceder a la lisis de las células, entre  $1\text{E}+10$  y  $7\text{E}+10$  células de *Bacillus coagulans*, entre  $6\text{E}+10$  y  $3\text{E}+11$  células de *Bacillus licheniformis*, entre  $4\text{E}+10$  y  $8\text{E}+10$  células de *Bacillus mesentericus* y entre  $4\text{E}+10$  y  $1\text{E}+11$  células de *Bacillus subtilis*.

En realizaciones particulares de la presente invención, se parte de un número de bacterias del género *Lactobacillus* que comprende entre el 28,64 % y el 66,82 % de las UFC con respecto a las UFC totales de la composición, preferentemente entre el 40,66 % y el 57,36 %. En valores absolutos, el cultivo cultivado, antes de proceder a la lisis de las células, presenta entre  $8\text{E}+11$  y  $3\text{E}+12$  células, preferentemente entre  $9\text{E}+11$  y  $2\text{E}+12$ , lo más preferentemente aproximadamente  $1,07\text{E}+12$ .

En otra realización particular, cuando las especies del género *Lactobacillus* son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus*, cada uno de los cultivos cultivados presenta, antes de proceder a la lisis de las células, entre  $5\text{E}+10$  y  $9\text{E}+10$  células de *Lactobacillus acidophilus*, entre  $5\text{E}+10$  y  $9\text{E}+10$  células de *Lactobacillus bulgaricus*, entre  $2\text{E}+11$  y  $8\text{E}+11$  células de *Lactobacillus casei*, entre  $3\text{E}+10$  y  $9\text{E}+10$  células de *Lactobacillus fermentum*, entre  $3\text{E}+10$  y  $9\text{E}+10$  células de *Lactobacillus reuteri* y entre  $1\text{E}+11$  y  $6\text{E}+11$  células de *Lactobacillus rhamnosus*.

En realizaciones particulares de la presente invención, se parte de un número de bacterias del género *Streptococcus* que comprende entre el 5,72 % y el 38,15 % de las UFC con respecto a las UFC totales de la composición, preferentemente entre el 10,98 % y el 20,75 %. En valores absolutos, el cultivo cultivado, antes de proceder a la lisis de las células, presenta entre  $1\text{E}+11$  y  $6\text{E}+11$  células, preferentemente entre  $2\text{E}+11$  y  $4\text{E}+11$ , lo más preferentemente aproximadamente  $3,00\text{E}+11$ . En una realización particular, la especie de *Streptococcus* es *Streptococcus thermophilus*.

En realizaciones particulares de la presente invención, se parte de una cantidad de bacterias del género *Saccharomyces* que comprende entre el 11,44 % y el 24,79 % de las UFC con respecto al cultivo total, preferentemente entre el 19,04 % y el 21,75 %. En valores absolutos, el cultivo cultivado, antes de proceder a la lisis de las células, presenta entre  $1\text{E}+11$  y  $7\text{E}+11$  células, preferentemente entre  $4\text{E}+11$  y  $6\text{E}+11$ , lo más preferentemente aproximadamente  $5,20\text{E}+11$ . En una realización particular, la especie de *Saccharomyces* es *Saccharomyces cerevisiae*.

En realizaciones particulares de la presente invención, se parte de una cantidad de bacterias del género *Bifidobacterium* que comprende entre el 10,20 % y el 53,64 % de las UFC con respecto al cultivo total, preferentemente entre el 15,99 % y el 18,75 %. En valores absolutos, el cultivo cultivado, antes de proceder a la lisis de las células, presenta entre  $1\text{E}+11$  y  $7\text{E}+11$  células, preferentemente entre  $4\text{E}+11$  y  $6\text{E}+11$ , lo más preferentemente aproximadamente  $4,50\text{E}+11$ . En una realización particular, la especie de *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium lactis*.

Estas bacterias probióticas se cultivan en condiciones convencionales, como se establecen en los protocolos de cultivo publicados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), indicadas para cada una de las especies bacterianas descritas en este documento.

Una vez cultivados estos microorganismos, se someten a un procedimiento de lisis. En primer lugar, las células microbianas se someten a un tratamiento térmico. Cada lote de cultivo celular viable se somete a un ciclo de esterilización en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 a 30 minutos. Esta temperatura desnaturaliza y coagula las proteínas inactivándolas. Además, provoca daños en las membranas, la agregación de ribosomas, la rotura de las cadenas de ADN y la inactivación de las enzimas. Una vez frías, se someten a un tratamiento de ruptura celular por ultrasonidos durante un período de 15 a 20 min, a una potencia de salida de entre 450 y 550 W, con una amplitud de entre el 38 y el 43 % y un período de pausa de 8 a 15 segundos, obteniéndose una masa de células lisadas del lote probiótico (Qsonica, Q500). Con ello se consigue la ruptura de las interacciones intermoleculares y la fragmentación del ADN. Opcionalmente, la solución final se liofiliza y se tritura para obtener un lisado del microorganismo probiótico en polvo. El polvo se conserva en un ambiente fresco y alejado del calor.

La composición, de acuerdo con la invención, es el resultado de la combinación de microorganismos probióticos que, después de un proceso de cultivo y lisis, genera un

extracto que consiste en un conjunto de metabolitos, proteínas, fragmentos de ADN y otros componentes, tales como, por ejemplo, peptidoglicanos, que mediante una dosificación eficiente tiene la capacidad de alterar y modificar de una manera sorprendente la microbiota del hospedador por varios mecanismos, de modo que activa el sistema inmunitario, revirtiendo la disbiosis y, sorprendentemente, ayudando a mejorar los trastornos cutáneos.

El efecto técnico que se obtiene de la composición de la invención es que actúa directamente en la microbiota de un sujeto. Gracias a esta acción reconstituyente y moduladora, los inventores han confirmado que, sorprendentemente, la intervención en la microbiota de un sujeto puede mejorar significativamente el estado de salud de dicho sujeto, en particular el estado de los trastornos cutáneos, como se demuestra por los resultados experimentales descritos en la presente solicitud.

En una realización particular, cuando la composición de la invención está en forma de polvo, la composición, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, puede presentarse en bolsitas selladas, que es de por sí convencional en la industria alimentaria y farmacéutica.

En el contexto de la presente invención, una dosis se define como la cantidad de la composición de la invención que debe ser efectiva, eficaz y segura para el sujeto y para resolver el problema de salud para el que está indicada.

Por tanto, en el contexto de la presente invención, se establece que debe administrarse al menos una dosis, preferentemente al menos una dosis diaria, de entre 100 mg y 80000 mg de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K. En realizaciones preferidas, una dosis puede comprender entre 100 mg y 50000 mg de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K; en otra realización preferida, una dosis puede comprender entre 100 mg y 2000mg de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K; en otra realización preferida, una dosis puede comprender entre 100 mg y 700mg de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K. En realizaciones particulares de la presente invención, una dosis puede comprender aproximadamente 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg 210 mg, 220 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 260 mg, 270 mg, 280 mg, 290 mg, 300 mg 310 mg, 320 mg, 330 mg, 340 mg, 350 mg, 360 mg, 370 mg, 380 mg, 390 mg, 400 mg, 410 mg, 420 mg, 430 mg, 440 mg, 450 mg, 460 mg, 470 mg, 480 mg, 490 mg, 500 mg, 510 mg, 520 mg, 530 mg, 540 mg, 550 mg, 560 mg, 570 mg, 580 mg, 590 mg,

600 mg, 610 mg, 620 mg, 630 mg, 640 mg, 650 mg, 660 mg, 670 mg, 680 mg o 690 mg de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K.

En una realización particular, puede administrar al menos una dosis de la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K, a diario, o cada dos días, o cada 3 o 4 días, siguiendo cualquiera de las concentraciones del párrafo anterior.

En una realización particular, la dosis es de al menos 100 mg/día o al menos 100 mg/día o entre 80 y 150 mg/día o entre 80 y 200 mg/día.

En otra realización adicional, la administración de la composición postbiótica de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K, es a diario durante al menos 2 semanas, preferentemente a diario durante al menos 3 semanas, incluso más preferentemente a diario durante al menos 4 semanas, incluso más preferentemente a diario durante al menos 5 semanas, incluso más preferentemente a diario durante al menos 6 semanas, incluso más preferentemente a diario durante al menos 7 semanas, incluso más preferentemente a diario durante al menos 8 semanas, o a diario durante al menos 9 semanas, o a diario durante al menos 10 semanas, o a diario durante al menos 11 semanas, o a diario durante al menos 12 semanas.

Preferentemente, la composición de la invención, incluidas cualquiera de las composiciones A-K, se administra en una cantidad de entre 100 mg y 700 mg por dosis y entre 1 y 6 dosis al día durante al menos 2 semanas.

En otra realización adicional, el tratamiento con la composición postbiótica se realiza antes, simultáneamente con o después del tratamiento del paciente con cualquier otro tratamiento para la piel. Cuando el tratamiento con la composición de la invención consigue mejorar el estado general del paciente, puede realizarse cualquier otro tratamiento para la piel si los médicos consideran que el paciente puede soportarlos.

Un objeto adicional de la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéutica eficaz de la composición, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos.

En el contexto de la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que se ha adaptado para suministrar una dosis predeterminada de uno

o más agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano o un tejido.

La expresión "cantidad farmacéutica eficaz", como se usa en el presente documento, se entiende como una cantidad no tóxica, capaz de proporcionar un efecto terapéutico. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad a tratar, el compuesto particular usado, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, un experto puede determinar una cantidad eficaz mediante experimentación rutinaria. En el contexto de compuestos y composiciones para la prevención de infecciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad necesaria para aliviar los síntomas del cáncer que padece el sujeto y mejorar su calidad de vida.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa una sustancia terapéuticamente inactiva que se dice que se usa para incorporar el principio activo, y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico, con respecto a la composición, la formulación, la estabilidad, la aceptación por el paciente y la biodisponibilidad.

La formulación farmacéutica de la invención puede ser adecuada para administración tópica o para administración oral. Es decir, el al menos un excipiente farmacéutico aceptable es adecuado para administración tópica u oral.

Una administración tópica es aquella que se aplica directamente sobre el trastorno cutáneo.

Como se mostrará más adelante, la composición de la invención es eficaz como una aplicación directa (ejemplos 1 y 3) y como una administración oral (ejemplo 2), tal como un suplemento alimenticio.

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, sérums, aceites líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares convencionales.

En una realización particular, la formulación se administra como una crema. Puede contener antiinflamatorios, tales como aloe vera, regeneradores de la piel, tales como vitamina D,

antioxidantes, tales como vitamina C, hidratantes, tales como glicerina, estimuladores del colágeno, tales como ácido glicólico e ingredientes antienvjecimiento, tales como péptidos, retinol y ácido hialurónico. Por ejemplo, los ingredientes que pueden utilizarse son: agua, glicerina, manteca de *Butyrospermum Parkii*, palmitato de cetilo, dimeticona, sodio, poliacrilato, fenoxietanol, linalool, citronelol, alfa-isometil ionona, geraniol, mentol, perfume, vitamina D, aloe vera, vitamina E, aceite de almendras.

Las formulaciones para administración oral pueden incluir polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de la dispersión o aglutinantes.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a un complemento alimenticio que comprende la composición de la invención para su uso en el tratamiento de un paciente con un trastorno cutáneo, incluidas cualquiera de las composiciones "A-K".

En el contexto de la presente invención, lo que se entiende por complemento alimenticio es un producto alimenticio cuya finalidad es complementar la dieta normal y que consiste en fuentes concentradas de nutrientes u otras sustancias, que tiene un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, y se comercializa en forma dosificada, es decir, cápsulas, comprimidos, píldoras y otros medios similares, sobres de polvo, ampollas de líquido, frascos cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos para tomar en pequeñas cantidades unitarias, como se define en la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo.

En una realización particular, el suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención, es en forma de cápsulas, tales como cápsulas de gelatina convencionales, en cuyo interior se encuentra la composición en polvo.

En realizaciones particulares donde la composición se presenta en bolsitas selladas, dicha composición puede administrarse al paciente disuelta o suspendida en un líquido, preferentemente en un líquido acuoso y, más preferentemente, en bebidas tales como zumos de frutas, leche, agua. Además, también puede mezclarse con alimentos, tales como yogur, yogur líquido, sopas, purés, cremas o gachas. Estos alimentos deben encontrarse a una temperatura óptima para su consumo y no deben calentarse nunca después de haber añadido la composición de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a la composición definida en el presente documento para uso cosmético en afecciones cutáneas mejorando el aspecto de la piel o al menos un signo de envejecimiento.

Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para mejorar el aspecto de la piel o mejorar los signos de envejecimiento de la piel. Mejorar el aspecto de la piel o un signo de envejecimiento puede incluir efectos que incluyen, pero sin limitación, que la piel tenga un aspecto más radiante, que la piel tenga un aspecto más saludable, que la piel se note más hidratada, que se reduzca el tamaño de los poros, que la piel se note más suave, que la piel tenga un aspecto más limpio, que se aumente la humedad, que se reduzca la producción de sebo y que se reduzca la aparición de arrugas, sequedad, rugosidad, falta de brillo, manchas, incluidas manchas de la edad e impurezas.

En una realización particular, la composición postbiótica de la invención, o la composición farmacéutica que comprende la misma, es útil en el tratamiento y/o la prevención de la piel deshidratada; la piel enrojecida; la piel envejecida o fotoenvejecida; el envejecimiento de la piel, en particular el fotoenvejecimiento; y trastornos relacionados con el ataque por radicales relacionados con la contaminación química o atmosférica.

El tamaño de los poros, el contenido de humedad de la piel, la producción de sebo, las arrugas, las manchas y las impurezas pueden medirse utilizando un dispositivo analizador de la piel (p. ej., Dermo Prime (dp)/viso, CHOWIS, Corea del Sur). Un dispositivo analizador de la piel asistido por IA mide cuantitativamente los cambios en varios parámetros de la piel, como la hidratación, el sebo, los poros, las arrugas, las manchas o la pigmentación, las impurezas, la queratina, el tono de la piel, los puntos negros y la sensibilidad de la piel. El dispositivo está equipado con un sensor de humedad y utiliza tecnología óptica avanzada con lentes intercambiables para medir hasta 10 mediciones cutáneas diferentes y realiza un análisis preciso de imágenes de alta resolución mediante la aplicación DermoBella instalada en tabletas o teléfonos inteligentes Android o iOS. El dispositivo se utiliza según los protocolos expuestos en los ejemplos del presente documento. Las mediciones de los parámetros cutáneos se toman en la misma zona de la piel cada vez.

El grado de impurezas, como enrojecimiento, puede analizarse midiendo la cantidad de porfirina. Se indica como luz escarlata-naranja, en respuesta a una gama específica de longitudes de onda de la luz ultravioleta.

Las impurezas se ven de color escarlata o amarillo verdoso. Pueden analizarse por separado, pero el dispositivo las combina y las clasifica como impurezas. El índice se calcula mediante un porcentaje respecto al tamaño de la imagen. No existen valores arbitrarios que clasifiquen el grado de intensidad del enrojecimiento en función de la cantidad de porfirina detectada.

Por lo tanto, las principales ventajas que se obtienen de la composición postbiótica de la invención son las siguientes:

- se suplementan y/o complementan las funciones fisiológicas de la microbiota de los seres humanos y los animales;
- se restablecen las alteraciones que conducen a la disbiosis y repercuten en los procesos oxidativos e inflamatorios;
- el hecho de que el producto se administre por vía tópica, hace de la presente composición, y de su sorprendente efecto, una alternativa muy ventajosa a los tratamientos cutáneos actuales;
- la presente composición comprende lisados de microorganismos, es decir, no contiene organismos vivos, lo que hace que la presente composición sea una alternativa segura, ya que evita los posibles peligros de los organismos colonizadores y no tiene la toxicidad que puede tener un fármaco convencional.

Además, la invención comprende las siguientes cláusulas:

1. Una composición postbiótica que comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al peso total de los lisados de microorganismos de la composición:

- del 6 % al 19 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;
- del 4 % al 8 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- del 15 % al 25 % de lisados bacterianos del género *Lactobacillus*;
- del 50 % al 60 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- del 1,5 % al 7 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos.

2. La composición para su uso, de acuerdo con la cláusula anterior, que comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso con respecto al peso total de los lisados de microorganismos de la composición:

- del 13 % al 19 % de lisados bacterianos del género *Bacillus*;
- del 4 % al 8 % de lisados bacterianos del género *Bifidobacterium*;
- del 15 % al 25 % de lisados bacterianos del género *Lactobacillus*;
- del 50 % al 60 % de lisados de levadura del género *Saccharomyces*;
- del 1,5 % al 5 % de lisados bacterianos del género *Streptococcus*.

3. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, que se administra por vía oral o tópica.

4. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, que comprende entre el 1 % y el 99,5 % en peso de lisados de microorganismos, en particular el 5 %-99 % en peso de lisados de microorganismos, en particular el 10 %-96 % en peso de lisados de microorganismos, el 25 %-95 % en peso de lisados de microorganismos o en particular el 50 %±10 % en peso de lisados de microorganismos.

5. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Bacillus* son de las especies que se seleccionan del grupo que consiste en *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus paralicheniformes* y combinaciones de los mismos.

6. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados del género *Bacillus* son de *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*.

7. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* son de las especies *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* y combinaciones de las mismas.

8. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* son de la especie *Bifidobacterium*

*lactis*.

9. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Lactobacillus* son de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* y combinaciones de las mismas.

10. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Lactobacillus* son de las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*.

11. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados del género de levadura *Saccharomyces* son de las especies que se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* y combinaciones de las mismas.

12. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados del género de levadura *Saccharomyces* son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

13. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Streptococcus* son de la especie *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, preferentemente *Streptococcus thermophilus*.

14. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Bacillus* son aproximadamente del 13 % al 19 % de los lisados totales de la composición.

15. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el porcentaje en peso de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis* es aproximadamente igual y es mayor que el de *Bacillus coagulans*.

16. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en

donde los lisados bacterianos del género *Bifidobacterium* son aproximadamente del 5 % al 7 % de los lisados totales de la composición.

17. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados bacterianos del género *Lactobacillus* son aproximadamente del 20 % al 24 % de los lisados totales de la composición.

18. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el porcentaje en peso de *Lactobacillus rhamnosus* es menor que el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

19. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el porcentaje en peso de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* es aproximadamente igual, y es mayor que el de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que también es aproximadamente igual y mayor que el de *Lactobacillus rhamnosus*.

20. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados de levadura del género *Saccharomyces* son aproximadamente entre el 52 % y el 57 % de los lisados totales de la composición.

21. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los lisados de levadura del género *Streptococcus* son aproximadamente entre el 3 % y el 4 % de los lisados totales de la composición.

22. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición A.

23. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición B.

24. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21

anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición C.

25. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21 y 24 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición D.

26. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21 y 24 a 25 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición E.

27. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición F.

28. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21 y 24 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición G.

29. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21 y 24 a 25 y 28 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición H.

30. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 22 y 24 a 26 y 28 a 29 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición I.

31. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la

composición J.

32. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21 y 24 y 28 anteriores, en donde la composición comprende lisados de microorganismos probióticos en una cantidad en porcentaje en peso de los lisados totales de la composición de acuerdo con la composición K.

33. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los trastornos cutáneos son estrés oxidativo y/o enfermedades inflamatorias de la piel.

34. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde los trastornos cutáneos son uno o más de los siguientes: eccema, psoriasis, acné, rosácea, ictiosis, vitíligo, urticaria y dermatitis seborreica, y disbiosis.

35. Un proceso para obtener una composición postbiótica para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 34 anteriores, que comprende:

- Cultivar las especies microbianas seleccionadas
- Filtrar o centrifugar los cultivos hasta que se obtiene una biomasa adecuada de los microorganismos seleccionados
- Lisar mediante ciclos de congelación y descongelación y sonicación las biomasas obtenidas.

36. El proceso, de acuerdo con la cláusula anterior, que comprende secar por atomización o liofilización de las biomasas de lisados bacterianos obteniendo un producto en forma de un polvo seco.

37. Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéutica eficaz de la composición postbiótica, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 34 anteriores, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos.

38. La formulación farmacéutica para su uso, de acuerdo con la cláusula anterior, en donde el al menos un excipiente farmacéutico aceptable es adecuado para administración tópica

u oral.

39. La formulación farmacéutica para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 37 a 38 anteriores, en donde las formulaciones para administración tópica son pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, sérums, aceites líquidos y polvos.

40. La formulación farmacéutica para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 37 a 39 anteriores, en donde la formulación se administra como una crema y comprende antiinflamatorios, regeneradores de la piel, antioxidantes, hidratantes, estimuladores del colágeno e ingredientes antienvjecimiento.

41. La formulación farmacéutica para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 37 a 38 anteriores, en donde las formulaciones para administración oral son polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos.

42. Un suplemento alimenticio que comprende la composición postbiótica, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 34 anteriores.

43. Uso cosmético de la composición postbiótica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 34 anteriores, o la formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 37 a 41 anteriores, mejorando el aspecto de la piel o al menos un signo de envejecimiento de la piel.

44. La composición para su uso, de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 33 a 34 anteriores, en donde el trastorno cutáneo es regeneración tisular, preferentemente regeneración tisular causada por una herida.

Cada una de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en" pueden reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos. El término "un" o "una" puede referirse a un o a una pluralidad de los elementos que modifica (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos) a menos que sea contextualmente claro que se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente" como se utiliza en el presente documento se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos 10 %; p. ej., un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir un peso entre 90 gramos y 110 gramos). El

uso del término "aproximadamente" al comienzo de un listado de valores modifica cada uno de los valores (p. ej., "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a "aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los valores intermedios y todos los valores fraccionarios de los mismos (p. ej., el listado de valores "80 %, 85 % o 90 %" incluye el valor intermedio 86 % y el valor fraccionario 86,4 %). Cuando un listado de valores va seguido de la expresión "o más", la expresión "o más" se aplica a cada uno de los valores enumerados (p. ej., el listado de "80 %, 90 %, 95 % o más" u "80 %, 90 %, 95 % o más" u "80 %, 90 % o 95 % o más" se refiere a "80 % o más, 90 % o más o 95 % o más"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados (p. ej., el listado de "80 %, 90 % o 95 %" incluye intervalos del "80 % al 90 %", del "80 % al 95 %" y del "90 % al 95 %"). En los ejemplos a continuación se exponen algunas aplicaciones de la tecnología.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Para ayudar a comprender mejor la invención, se incluye un conjunto de figuras como parte integrante de esta descripción, donde, con fines ilustrativos y no limitantes, en este documento se presentan gráficos de los resultados experimentales obtenidos en los siguientes ejemplos.

**Figura 1.** Porcentaje de viabilidad celular tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de la composición de la invención mediante ensayo MTT en las líneas celulares 3T3 (figura 1.a) y HaCaT (figura 1.b). Las barras representan la media de seis repeticiones técnicas y las barras de errores corresponden a la desviación estándar. El control negativo (C-) representa una condición en la que las células no se expusieron a ningún compuesto.

**Figura 2.** Secreción de las citocinas IL-8 (figura 2.a) y TNF- $\alpha$  (figura 2.b) por células THP-1 estimuladas con LPS con diferentes concentraciones de la composición de la invención en presencia del estímulo *Lipopolisacáridos* (LPS). Las barras representan la media de tres repeticiones técnicas y las barras de errores corresponden a la desviación estándar. El control negativo (C-) representa una condición en la que las células no se expusieron a ningún compuesto. El control positivo (C+) representa una condición en la que las células se expusieron al estímulo de LPS.

**Figura 3.** Ensayo de proliferación. Porcentaje de viabilidad celular tras 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de la composición de la invención medida por ensayo MTT en fibroblastos dérmicos humanos (HDF). Las barras representan la media de seis repeticiones técnicas y las barras de errores corresponden a la desviación estándar. El control negativo (C-) representa una condición en la que las células no se expusieron a ningún compuesto. El control positivo (C+) representa una condición en la que las células se cultivaron con medios suplementados con un 10 % de suero fetal bovino (FBS).

**Figura 4.** Porcentaje de actividad antioxidante del compuesto de ensayo medido mediante el ensayo *in vitro* H2DFFDA en la línea celular HaCaT. Los resultados se presentan en diferentes intervalos de concentración, y van de 500 µg/ml a 3,9 µg/ml (figura 4.a) y de 5 µg/ml a 0,0000005 µg/ml (figura 4.b). Las barras representan la media de seis repeticiones técnicas y las barras de errores corresponden a la desviación estándar. El control negativo (C-) representa una condición en la que las células no se expusieron a ningún producto. El hidroperóxido de *terc*-butilo (TBHP) es el agente generador de especies de oxígeno reactivo (ROS).

**Figura 5.** Imagen representativa de la región de la punta de la cola que muestra la región medida (flecha).

**Figura 6.** Resultados obtenidos en el ensayo de irritación cutánea. CN = control negativo; CP = control positivo.

**Figura 7.** Representación gráfica y de datos del ensayo de citotoxicidad de las diluciones de la composición postbiótica de la invención. (A) y SDS (B)

**Figura 8.** Curvas de viabilidad obtenidas en el ensayo de fototoxicidad. Composición postbiótica (A) y artículo de referencia CPZ (B)

## **EJEMPLOS**

Para contribuir a una mejor comprensión de la invención, y de conformidad con una realización práctica de la misma, se detalla una realización preferida de la presente invención como parte integrante de esta descripción.

### **EJEMPLO 1: ESTUDIO PARA DETERMINAR LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL COMPUESTO DE LA INVENCION MEDIANTE ESTUDIOS *IN VITRO*.**

En primer lugar, se realizó un estudio de citotoxicidad MTT para determinar las concentraciones más adecuadas de la composición de la invención con las que trabajar. A continuación, para evaluar las actividades antiinflamatorias, proliferativas y antioxidantes de las composiciones, se realizaron ensayos *in vitro* específicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Materiales

Se usaron los siguientes reactivos:

- Kit de desprendimiento primario. Innoprot, P6030.
- Suero de ternero recién nacido (NBCS). Gibco, 16010.159.
- Suero fetal bovino (FBS). Gibco, 10270-106.
- Sales equilibradas de Hank. Sigma, H-2387.
- L-glutamina 200 mM. Sigma, G7513.
- Penicilina/Estreptomicina (P/E). Gibco, 15140-122.
- Tripsina-EDTA (10X). Sigma, T4174.
- PBS; Solución salina tamponada con fosfato (10X). ROCHE 11666789001.
- Kit de detección de micoplasmas MycoAlert®. Lonza, LT07-318.
- Medio esencial mínimo de Dubelcco modificado (DMEM). Sigma, D6648-10X.
- Medio de cultivo de fibroblastos + Suplementos. Innoprot, P60108
- RPMI; Roswell Park Memorial Institute -1640. Sigma, R0883.
- Kit de ELISA para IL-8 humana para enzimoanálisis de adsorción. BD, 555244.
- Kit de ELISA para TNF-alfa humano. Invitrogen, EH3TNFA2.
- Dodecilsulfato de sodio (SDS). N.º CAS 151-21-3 Sigma, L4509.
- Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*. Sigma, L3012.
- PMA (12-miristato 13-acetato de forbol). Sigma, P1785.
- MTT. N.º CAS 298-93-1. Sigma; M2128.
- Carboxi-H2DFFDA. INVITROGEN; C-13293.
- Luperon® TBH70X, Solución de hidroperóxido de *terc*-butilo (TBHP). SIGMA; 458139.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de Hank, sin Ca<sup>2++</sup> ni Mg<sup>2++</sup>.
- Solución de MTT (50 µg/ml en DMEM).

## Equipo

Todos los equipos se calibraron siguiendo las normas de calidad de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 9001, UNE-EN ISO/IEC:17025 y las BLP (buenas prácticas de laboratorio):

- Pipetas automáticas.
- Balanza analítica
- Pipetas multicanal.
- Baño termostático con capacidad de agitación.
- Armario congelador a -80 °C.
- Frigorífico.
- Incubadora con CO<sub>2</sub>.
- Campanas de flujo laminar.
- Lector de microplacas Varioskan (fluorímetro y espectrofotómetro).
- Microscopio óptico invertido.
- Hemocitómetro.
- Agitador de microplacas.
- Microcentrifugadora.
- Simulador UV
- Lector de placas de ELISA

## Composición postbiótica de la invención:

Se utilizó un postbiótico compuesto por lisados de 12 cepas/especies de *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Streptococcus sp.* La composición de los extractos aparece en la tabla 2 en una cantidad en porcentaje en peso sobre el peso total de los lisados de la composición.

Tabla 2: Componentes de la composición postbiótica de la invención

| Especies/Cepas                   | % (p/p) |
|----------------------------------|---------|
| <i>Bacillus coagulans</i>        | 3       |
| <i>Bacillus licheniformis</i>    | 4       |
| <i>Bacillus mesentericus</i>     | 4       |
| <i>Bacillus subtilis</i>         | 4       |
| <i>Bifidobacterium lactis</i>    | 5       |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 4       |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i>   | 4  |
| <i>Lactobacillus casei</i>        | 5  |
| <i>Lactobacillus paracasei</i>    | 5  |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>    | 3  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 56 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3  |

A menos que se especifique otra cosa, se utilizó en todos los experimentos la composición de la tabla 2.

#### Preparación de las diferentes concentraciones del compuesto de la invención

Todas las concentraciones ensayadas se prepararon en fresco el día del ensayo, directamente en el medio de cultivo requerido para cada línea celular.

#### Condiciones de cultivo y sistemas experimentales para ensayos *in vitro*

En este experimento se utilizaron cuatro sistemas experimentales: fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF) y las líneas celulares THP-1, 3T3 y HaCaT. Estas líneas celulares se almacenaron en el banco de cultivos celulares y se comprobó la ausencia de micoplasmas contaminantes inmediatamente después de la descongelación. Para este fin se utilizó el kit de detección de micoplasmas MycoAlert®. Midiendo el nivel de ATP en la muestra antes (lectura A) y después de la adición del sustrato MycoAlert™ (lectura B), se obtiene una relación indicativa de la presencia (Relación > 1) o ausencia de contaminación por micoplasmas (Relación < 0,9).

#### HDF

Los fibroblastos dérmicos humanos (HDF) adquiridos en Innoprot (P10858) se aislaron por ScienCell Research Laboratories a partir de tejido dérmico humano. Los HDF se cultivaron en el medio de Fibroblastos + Suplementos en condiciones de cultivo estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aproximadamente al 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron las células con el kit de desprendimiento primario, se diluyeron en una proporción de 1:4 y se subcultivaron. En este estudio se utilizaron células subcultivadas entre 2 y 6 veces. Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad).

#### HaCaT

El sistema experimental utilizado para el estudio de la eficacia antioxidante fue el de

queratinocitos humanos inmortalizados (línea celular HaCaT). Esta línea celular fue suministrada originalmente por el Servicio de Líneas Celulares (CLS, Eppelheim, Alemania). La línea celular se mantuvo en medio de cultivo completo (DMEM + 10 % de FBS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se cultivó rutinariamente en monocapa en frascos de cultivo tisular. Cuando las células superaron el 70 % de confluencia (pero menos del 90 %), se subcultivaron en nuevos frascos de cultivo. Todos los cultivos de células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad).

### THP-1

El sistema experimental utilizado para el estudio de la eficacia antiinflamatoria fue la línea celular THP-1 (línea celular de monocitos humanos, ATCC® TIB-202). Estas células se almacenaron en el banco de cultivos celulares de Gaiker y se comprobó la ausencia de micoplasmas contaminantes inmediatamente después de la descongelación. Las células THP-1 se cultivan en suspensión a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se mantuvieron en medio de cultivo (RPMI + 10 % de FBSi + β-mercaptoetanol 50 μM), durante un mínimo de dos semanas antes de cualquier experimento. Las células se subcultivaron antes de alcanzar el 80 % de confluencia (concentración celular/volumen).

Se preparó una suspensión celular de 1x10<sup>5</sup> células/ml 24 horas antes del ensayo de eficacia antiinflamatoria. Se dispensaron 1x10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos en presencia de 0,31 μg/ml de PMA para diferenciar los monocitos en macrófagos. Las placas se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas.

### BALB/c 3T3

Las células BALB/c 3T3 adherentes (línea celular de fibroblastos de ratón, ATCC® CCL-163TM) se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo fue DMEM suplementado con un 5 % de FBS y un 5 % de suero de ternero recién nacido (NCBS), aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio. Las células se subcultivaron antes de alcanzar el 80 % de confluencia (concentración celular/volumen).

### Estudio de citotoxicidad

Se realizó un ensayo de viabilidad MTT para investigar la citotoxicidad de la composición postbiótica de la invención. Las células cultivadas en placas de 96 pocillos se trataron con 8 concentraciones de los productos de ensayo durante 24 horas (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). En

paralelo, se probaron 8 concentraciones de un control positivo (dodecilsulfato de sodio (SDS)) para validar el ensayo. Tras 24 horas de incubación con los productos de ensayo o el control positivo, las células se lavaron con PBS, se tiñeron con solución de MTT y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Al final de este período de incubación, se retiró el medio de tinción y se añadieron 100 µl de DMSO/pocillo para solubilizar el precipitado coloreado. La absorbancia se leyó a 540 nm en el lector de placas del espectrofotómetro.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó en relación con el control negativo, una condición en la que las células no estaban expuestas a ningún producto.

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \text{AbT}/\text{AbC} \times 100$$

AbT = absorbancia a 540 nm después de 72 horas de tratamiento

AbC = absorbancia a 540 nm después de 72 horas sin tratamiento (control negativo).

#### Ensayo antiinflamatorio

Para el ensayo antiinflamatorio, las células THP-1 diferenciadas con PMA se incubaron con los productos de ensayo a diferentes concentraciones durante 24 horas en presencia del estímulo inflamatorio de lipopolisacárido, LPS (20 µg/ml). Las células no inflamadas (medio de cultivo) se utilizaron como control negativo. La secreción celular de IL-8 y TNF-α se midió mediante ELISA.

#### Estudio de la actividad antioxidante: detección de ROS mediante H2DFFDA

La actividad antioxidante se estudió mediante H2DFFDA, un método utilizado para determinar la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos y se incubaron con H2DFFDA durante 45 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se expusieron a tBHP (agente generador de ROS) en presencia o ausencia de los productos de ensayo. Después de un período de incubación de 4 horas, la fluorescencia se midió en un lector de microplacas (Ex = 485 nm; Em = 535 nm). El porcentaje de actividad antioxidante (% AA) se calculó comparando los valores de fluorescencia del control (control negativo) y de las muestras de ensayo mediante la siguiente fórmula

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(F^{485/535}_{CX} - F^{485/535}_{B-CX}) \times 100}{F^{485/535}_{Control}} \right]$$

**F<sup>485/535</sup> Cx:** Fluorescencia a Ex/Em = 485/535 nm de la composición postbiótica de la invención a una concentración dada expuesta a H2DFFDA y tBHP.

**F<sup>485/535</sup> B-Cx:** Fluorescencia a Ex/Em = 485/535 nm del producto de ensayo a una concentración dada expuesto a tBHP pero no a H2DFFDA (blanco).

**F<sup>485/535</sup> Control:** Fluorescencia a Ex/Em = 485/535 nm del tampón de ensayo expuesto a H2DFFDA y tBHP (C-).

## EJEMPLO 2: REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN UN MODELO DE PEZ CEBRA

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la eficacia de la composición postbiótica de la invención (administrada en la dieta) para promover la regeneración tisular de la aleta caudal tras la amputación

Los peces cebra adultos se alojaron y mantuvieron siguiendo procedimientos estándar. Brevemente, se mantuvieron en acuarios de 3 litros calentados a 28,5 °C, con aproximadamente 20 peces por tanque y agua filtrada continuamente. El agua se mantuvo a un pH de 7-7,8, una conductividad a 500-800 µS, y saturación de O<sub>2</sub> entre el 80-100 %. Las condiciones del agua se controlaron y regularon convenientemente. Los peces se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 14:10 horas de luz:oscuridad. Se alimentó a los adultos con gránulos secos molidos y alimento vivo, siguiendo una práctica habitual en el campo.

Los embriones se criaron en medio E3 con ampicilina (100 µg/ml) y azul de metileno (0,0001 %), y se mantuvieron en placas en la incubadora a 28,5 °C hasta que alcanzaron los 5 dpf (días postfecundación). En ese momento, se transfirieron a tanques de 3 litros hasta el día del experimento. A partir de los 5 dpf, estas larvas fueron alimentadas con sus correspondientes dietas experimentales (dietas estándar y suplementadas) diariamente (3 veces al día) hasta el final del experimento. El día de la amputación, se alimentó una sola vez a las larvas.

Tamaño de la muestra: 30 larvas por grupo experimental, distribuidas en 2 nidos (15 larvas/nido, 2 nidos por tanque de 3 litros).

- dos grupos experimentales (cada grupo en un tanque).
- Los siguientes acuarios (tanques) se distribuyeron aleatoriamente sobre el soporte
  - Grupo 1: Dieta estándar (control negativo).
  - Grupo 2: Dieta suplementada (50 % de dieta estándar + 50 % de composición postbiótica de la invención).
- La alimentación con las dietas de prueba tuvo lugar entre el 5 dpf al 15 dpf, 3 veces al día, excepto el día de la amputación (12 dpf), cuando se les alimentó una sola vez
- La amputación parcial de la aleta caudal se realizó a los 12 dpf y se tomaron fotografías a los 15 dpf. Se midió la longitud del tejido regenerado.

#### *Producción y alojamiento de las larvas*

Los embriones sincronizados se suministraron al laboratorio y se mantuvieron a 28,5 °C en una incubadora hasta que alcanzaron los 5 dpf. En ese momento, las larvas se transfirieron a tanques de 3 litros y se alimentaron manualmente. Se empleó un sistema automático de recirculación de agua con una reposición diaria del 10 % del agua hasta los 12 dpf.

#### *Preparación de la dieta y régimen de alimentación*

Las larvas se alimentaron con sus respectivas dietas tres veces al día (excepto el día de la amputación, en que se alimentaron únicamente una vez) con una cantidad total de 18 mg/día y depósito. La dieta estándar consistió en alimento en polvo para larvas de pez cebra (Sera Micron). La dieta suplementada consistió en un 50 % de dieta estándar más un 50 % de la composición de la invención y se preparó mezclando bien los polvos.

Todas las dietas se rociaron con aceite vegetal y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro. Las dietas se mantuvieron a 4 °C durante la duración del ensayo para evitar la degradación de los compuestos de ensayo. Se preparó inicialmente una cantidad total de 792 mg de Sera Micron y una mezcla de 396 mg de Sera Micron más 396 mg de la composición postbiótica de la invención para la dieta estándar y la dieta suplementada, respectivamente.

#### *Amputación de la cola, tratamiento y análisis*

A los 12 dpf, se anestesió con tricafina a las larvas de todos los grupos experimentales y se amputó parcialmente la aleta caudal con una cuchilla estéril. Se tomaron imágenes de campo claro y de fluorescencia (utilizando un microscopio estereoscópico Leica) de la zona lesionada justo antes de la amputación y a los 15 dpf. Se anestesió a los peces y se les sumergió en metilcelulosa al 3 % antes de la obtención de imágenes. Posteriormente, se devolvió a las larvas al sistema de agua sin tricafina y una vez se habían recuperado, se transfirieron a sus tanques respectivos para continuar con el experimento.

Se midió la longitud del tejido regenerado a los 15 dpf y se realizó una comparación durante el tiempo de regeneración entre los dos grupos experimentales.

### **EJEMPLO 3: ENSAYO DE IRRITACIÓN CUTÁNEA Y ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD**

El sistema de prueba utilizado en el ensayo de irritación cutánea fue el modelo RHE (epidermis humana reconstruida), proporcionado por Skinethic (Referencia RHE/S/17). Los tejidos se expusieron a la composición postbiótica de la invención durante 42 minutos. A continuación, cada tejido se enjuagó exhaustivamente y se transfirió a medio fresco, donde se incubaron durante otras  $42 \pm 4$  horas. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular de los tejidos tratados, mediante el ensayo MTT.

En el ensayo de fototoxicidad se utilizaron células 3T3 como sistema de ensayo. El objetivo de este estudio era obtener el factor de fotoirritación (PIF) para la composición postbiótica de la invención. Se trataron células 3T3 con la composición postbiótica de la invención a ocho concentraciones diferentes durante 1 hora. Posteriormente, la mitad de las muestras se expusieron a irradiación solar simulada, mientras que la otra mitad se mantuvo en la oscuridad. La viabilidad celular se calculó tras 24 horas de incubación mediante el ensayo del rojo neutro. Para estos ensayos se utilizaron los siguientes reactivos. Tabla 3

Tabla 3 Reactivos utilizados en este ejemplo.

| IRRITACIÓN CUTÁNEA                    |                        |
|---------------------------------------|------------------------|
| Reactivo                              | Referencia             |
| MTT                                   | Sigma M2128-1G         |
| Isopropanol                           | MTT-100-EXT            |
| SDS al 5 % (control positivo)         | TC-5%-SDS              |
| dPBS (10X)                            | Sigma D1408-500ML      |
| dPBS                                  | TC-PBS                 |
| Medio de cultivo (mantenimiento)      | 21 SMM 049             |
| Medio de cultivo (crecimiento)        | 21 SGM 135             |
| FOTOTOXICIDAD                         |                        |
| MTT                                   | Sigma M2128-1G         |
| PBS                                   | Roche 11666789001      |
| SDS                                   | Sigma L6026            |
| Azul tripano                          | Gibco 15250-061        |
| DMEM                                  | Sigma D5648            |
| Penicilina/estreptomicina             | Gibco 141540-122       |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | Sigma 58875-500G       |
| Sal de Hank con rojo de fenol         | Sigma H2387            |
| Sal de Hank sin rojo de fenol         | Sigma H1387            |
| Tripsina 10X                          | Sigma T4174            |
| DMSO                                  | Panreac 131954.1616    |
| Ácido acético                         | Fisher 161954.161612   |
| Suero de ternero recién nacido (NBCS) | Gibco 16010-159        |
| Rojo neutro                           | Sigma N2889-20ml       |
| Etanol                                | Panreac 131085.1212    |
| Ácido acético                         | Panreac 131008.1611    |
| SDS                                   | Sigma-Aldrich L6026    |
| CPZ                                   | Sigma-Aldrich C0982-5G |
| HEPES                                 | Sigma-Aldrich H3375    |
| NaOH 1 M                              | 1.09137.1003           |

El mismo equipo utilizado en el ejemplo anterior se empleó también para los ensayos de irritación cutánea y fototoxicidad.

Se prepararon las siguientes soluciones: dPBS 1X, MTT 1 mg/ml, DMEM suplementado + NBCS al 10 %, HBSS con y sin Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, tripsina 1X, HEPES 1 M, azul tripano, DMEM suplementado + NBCS al 10 % + DMSO al 5 %, DMEM suplementado + NBCS al 10 % + HEPES 25 mM, solución de rojo neutro y solución de desorción de rojo neutro.

#### *Sistemas de ensayo: ensayo in vitro de irritación cutánea*

El modelo RHE se utilizó como sistema de ensayo. Este modelo consiste en queratinocitos epidérmicos humanos normales, que se han cultivado a partir de un modelo multicapa altamente diferenciado de la epidermis humana. Consta de capas basales, epidermoides y granulares organizadas, y de un estrato córneo multicapa que contiene capas lipídicas

lamelares intercelulares dispuestas en patrones análogos a los encontrados *in vivo*. Para preparar el sistema, el día de la recepción, los tejidos se acondicionaron mediante incubación con el medio de ensayo para liberar compuestos relacionados con el estrés de transporte y los residuos durante una noche.

#### *Sistemas de ensayo: ensayo de fototoxicidad in vitro*

Se utilizaron células Balb/c 3T3 como sistema de ensayo. Una vez descongelados, se cultivaron en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de suero de ternero recién nacido (NCBS) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). Las células se incubaron en condiciones de cultivo estándar ( $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %/aire), cambiando el medio cada 2-3 días y subcultivando antes de alcanzar el 80 % de confluencia. De acuerdo con la directriz, las células 3T3 utilizadas en este estudio se sometieron a ensayos de detección de micoplasmas y únicamente se utilizaron células libres de micoplasma a lo largo del estudio.

Para preparar el sistema, después de descongelar, las células se propagaron a partir de cultivos madre y se cultivaron en medio de cultivo durante dos semanas. Para cada ensayo, cuando la densidad celular alcanzó el 80 % de confluencia, se tripsinizaron y se contaron utilizando tinción de azul tripano. El día anterior a la exposición a la composición postbiótica de la invención, se tripsinizaron y contaron las células. Se preparó una suspensión de 100.000 células/ml y se añadieron 200 µl de la suspensión a cada pocillo de las placas de 96 pocillos (20.000 células/pocillo), excepto en los pocillos periféricos.

#### *Preparación de la composición postbiótica de la invención*

Cada ensayo requirió diferentes concentraciones de la composición postbiótica.

- En el ensayo de irritación cutánea se utiliza la composición pura, por lo que no fue necesaria ninguna preparación. El protocolo para el ensayo de irritación cutánea se describe en las Directrices de la OCDE para el ensayo de productos químicos: Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo en epidermis humana reconstruida, protocolo n.º 439 (2019)

Para preparar el sistema, el día de la recepción, los tejidos se acondicionaron mediante incubación con el medio de ensayo para liberar compuestos relacionados con el estrés de transporte y los residuos durante una noche. Los insertos que contenían epitelio humano

reconstituido se colocaron sobre 1 ml del medio SGM en placas de 6 pocillos. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

Al día siguiente, los tejidos se transfirieron a placas de 24 pocillos que contenían 300 µl de medio SMM. Se añadieron 10 µl de agua estéril a la parte superior de los tejidos y, a continuación, se añadieron aproximadamente 16 mg de la composición postbiótica de prueba de la invención a cada tejido. Se aplicaron 16 µl del control negativo (dPBS) y del control positivo (SDS al 5 %) a los tejidos correspondientes. Después de la administración al último tejido, todos los insertos se incubaron durante 42 minutos a temperatura ambiente. Al final de la exposición, los tejidos se enjuagaron con dPBS. A continuación, los insertos se incubaron con 2 ml de medio SGM durante 42 horas en condiciones de cultivo estándar. El ensayo MTT se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1, la viabilidad relativa se obtuvo a partir de los valores de densidad óptica. Los valores de DO se corrigieron restando los valores del blanco (isopropanol). A continuación, la viabilidad celular relativa se calculó del siguiente modo: Viabilidad relativa (%) = DO de la composición postbiótica / DO media del control negativo \*100.

- Antes del ensayo de fototoxicidad, se determinó la solubilidad de la composición, se decidió partir de 20 mg/ml en los medios de cultivo. A partir de esta concentración, se realizó un experimento de determinación de dosis (ensayo de citotoxicidad). A partir de 20 mg/ml en medios de cultivo, se prepararon ocho concentraciones en diluciones 1/10: 20 mg/ml; 2 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,002 mg/ml; 0,0002 mg/ml; 0,00002 mg/ml; y 0,000002 mg/ml

De acuerdo con las Directrices de la OCDE para el análisis de productos químicos: Ensayo de fototoxicidad de 3T3 NRU *in vitro*, protocolo n.º 432 (2019), la concentración máxima a analizar es de 1 mg/ml. Como el ensayo de citotoxicidad expuso las células a la composición durante 24 horas, y el ensayo de fototoxicidad incluye una exposición de 1 hora, se decidió realizar el ensayo de fototoxicidad a partir de 1 mg/ml. A partir de esta concentración, se prepararon ocho concentraciones en diluciones 1/3. Esta solución se preparó en solución de Hank con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y HEPES. (C1) 1 mg/ml; (C2) 0,33 mg/ml; (C3) 0,11 mg/ml; (C4) 0,037 mg/ml; (C5) 0,0123 mg/ml; (C6) 0,0041 mg/ml; (C7) 0,00137 mg/ml; y (C8) 0,000457 mg/ml de SDS se utilizó como control positivo, se prepararon 8 concentraciones: 400 µg/ml; 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; y 3,125 µg/ml

A partir del límite de solubilidad obtenido (20 mg/ml) se estableció un experimento de búsqueda de intervalos de dosis para determinar el valor de la  $CI_{50}$  (si se obtenía). Las células 3T3 se sembraron a 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se prepararon siete concentraciones más siguiendo un factor de dilución 1/10. Las células se expusieron a la composición postbiótica de la invención durante 24 h. Se utilizó SDS como control positivo y se determinó la viabilidad mediante el método MTT.

El ensayo de citotoxicidad mostró signos de toxicidad hasta 2 µg/ml. Como el tiempo de exposición en el ensayo de fototoxicidad era más corto, se decidió iniciar este ensayo a partir de la concentración más alta permitida: 1 mg/ml. Se prepararon siete concentraciones más en diluciones 1/3. Las células 3T3 se sembraron a 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se expusieron a las ocho concentraciones de la composición postbiótica de la invención definida anteriormente durante 1 hora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se prepararon dos placas de 96 pocillos para la composición postbiótica de la invención, la composición postbiótica y el control de referencia (CPZ). Una placa de cada condición (+IRR) se irradió durante 52 minutos a 5 J/cm<sup>2</sup> mientras que las otras placas (-IRR) se mantuvieron en la oscuridad durante el mismo tiempo. A continuación, se retiró el medio de cultivo, Las células se lavaron con solución de Hank sin rojo de fenol y se añadieron 100 µl de rojo neutro a cada pocillo. Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % y a continuación se lavaron de nuevo. Finalmente, el rojo neutro se solubilizó añadiendo 100 µl a cada pocillo de una solución de ácido acético/etanol. Las placas se incubaron 10 minutos a la temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm.

## RESULTADOS

### Ensayo de micoplasma

Los resultados obtenidos en la prueba de micoplasma se muestran en la tabla 4:

Tabla 4: relación de MycoAlert obtenida a partir del cultivo celular

| Células: | Medida A | Medida B | Relación (B/A) |
|----------|----------|----------|----------------|
| THP-1    | 1183     | 723,1    | 0,611          |
| 3T3      | 1906     | 953,0    | 0,500          |
| HaCaT    | 702,9    | 355,7    | 0,506          |
| HDF      | 1451     | 882,0    | 0,608          |

Las proporciones obtenidas en kit de detección de micoplasmas MycoAlert® para todas las líneas celulares fueron inferiores a 0,9, lo que indica que las células no estaban contaminadas por micoplasmas. Por lo tanto, todos los sistemas experimentales estaban en perfectas condiciones para realizar todos los ensayos.

### Estudio de citotoxicidad

El efecto citotóxico de la composición postbiótica de la invención se probó en un ensayo *in vitro* utilizando el ensayo MTT en líneas celulares HaCaT y 3T3. Se probaron ocho concentraciones del compuesto de ensayo: 20.000 µg/ml, 2.000 µg/ml, 200 µg/ml, 20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml y 0,002 µg/ml o 100.000 µg/ml, 50.000 µg/ml, 25.000 µg/ml, 12.500 µg/ml, 6.250 µg/ml, 3.125 µg/ml, 1562,5 µg/ml y 781,25 µg/ml y se ensayaron en las líneas celulares 3T3 y HaCaT, respectivamente. En paralelo, se usaron diferentes concentraciones de dodecilsulfato de sodio (SDS) como control positivo (no mostrado). Los resultados se muestran en la figura 1 y la tabla 5.

**Tabla 5: Citotoxicidad de la composición postbiótica**

| MTT de 3T3                 |        | Composición postbiótica de la invención (µg/ml) |       |       |       |       |       |        |        |
|----------------------------|--------|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Repeticiones               | c-     | 20000                                           | 2000  | 200   | 20    | 2     | 0,2   | 0,02   | 0.002  |
| 1                          | 107,14 | 8,32                                            | 50,31 | 54,74 | 67,49 | 83,49 | 96,97 | 103,95 | 106,03 |
| 2                          | 99,2   | 36,7                                            | 53,92 | 50,86 | 58,01 | 70,37 | 87,53 | 84,09  | 89,39  |
| 3                          | 103,62 | 55,56                                           | 53,02 | 64,01 | 68,52 | 77,45 | 85,75 | 108,33 | 111,75 |
| 4                          | 93,33  | 52,76                                           | 61,27 | 57,01 | 65,17 | 98,04 | 99,38 | 105,19 | 102,59 |
| 5                          | 97,76  | 43,21                                           | 57,2  | 55,9  | 55,73 | 75,75 | 94,59 | 107,59 | 101,56 |
| 6                          | 98,94  | 49,08                                           | 48,6  | 44,79 | 39,86 | 75,16 | 72,14 | 85,24  | 106,77 |
|                            |        | Composición postbiótica de la invención (µg/ml) |       |       |       |       |       |        |        |
|                            | c-     | 20000                                           | 2000  | 200   | 20    | 2     | 0,2   | 0,02   | 0.002  |
| <b>Promedio</b>            | 100    | 40,94                                           | 54,05 | 54,55 | 59,13 | 79,97 | 89,39 | 99,06  | 103,02 |
| <b>Desviación estándar</b> | 4,8    | 17,36                                           | 4,62  | 6,42  | 10,76 | 9,75  | 9,98  | 11,27  | 7,58   |

| MTT de HaCaT |        | Composición postbiótica de la invención (µg/ml) |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------|--------|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Repeticiones | c-     | 100000                                          | 50000 | 25000 | 12500 | 6250  | 3125  | 1563  | 781   |
| 1            | 98,83  | -11,85                                          | 3,68  | 39,94 | 45,47 | 43,77 | 48,35 | 59,45 | 60,14 |
| 2            | 101,99 | -10,51                                          | 23,53 | 41,52 | 45,2  | 50,57 | 52,01 | 61,66 | 61,92 |
| 3            | 96,26  | -24,31                                          | 1,21  | 34,94 | 42,39 | 43,1  | 47,08 | 48,89 | 52,65 |
| 4            | 101,34 | -36,29                                          | -8,47 | 36,74 | 40,54 | 44,9  | 45,3  | 50,14 | 53,44 |

|                            |           |                                                        |              |              |              |             |             |             |            |
|----------------------------|-----------|--------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>5</b>                   | 105,86    | -35,23                                                 | 1,03         | 30,78        | 42,61        | 50,27       | 52,22       | 57,01       | 60,46      |
| <b>6</b>                   | 95,71     |                                                        | 1,47         | 29,66        | 39,38        | 44,96       | 46,24       | 55,53       | 59,11      |
|                            |           | <b>Composición postbiótica de la invención (µg/ml)</b> |              |              |              |             |             |             |            |
|                            | <b>c-</b> | <b>100000</b>                                          | <b>50000</b> | <b>25000</b> | <b>12500</b> | <b>6250</b> | <b>3125</b> | <b>1563</b> | <b>781</b> |
| <b>Promedio</b>            | 100       | 0                                                      | 3,74         | 35,6         | 42,6         | 46,26       | 48,54       | 55,45       | 57,95      |
| <b>Desviación estándar</b> | 3,84      | 12,31                                                  | 10,58        | 4,78         | 2,44         | 3,3         | 2,95        | 5,06        | 3,92       |

La figura 1 muestra que concentraciones inferiores a 2 µg/ml dieron lugar a una viabilidad celular superior al 80 % en el sistema experimental 3T3. Las concentraciones cercanas a 700 µg/ml y 20 µg/ml redujeron la viabilidad celular al 60 % en los sistemas experimentales HaCaT y 3T3, respectivamente. Estas concentraciones se utilizaron para los siguientes ensayos de eficacia.

#### Eficacia antiinflamatoria

Las células THP-1 diferenciadas en macrófagos se expusieron simultáneamente a la agresión inflamatoria, LPS y diferentes concentraciones de la composición postbiótica de la invención (seleccionadas de acuerdo con los resultados de citotoxicidad) durante 24 horas. Después de este tiempo de exposición, se recogieron y analizaron los sobrenadantes celulares. El efecto antiinflamatorio del compuesto de ensayo se analizó cuantificando los niveles de secreción de IL-8 y TNF-α mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 2. El compuesto de ensayo mostró una capacidad antiinflamatoria dependiente de la dosis a concentraciones comprendidas entre 250 µg/ml y 62,5 µg/ml.

#### Actividad proliferativa

Investigar más a fondo el efecto de la composición postbiótica de la invención sobre la proliferación celular, se realizó un ensayo de proliferación *in vitro* utilizando MTT en fibroblastos dérmicos humanos primarios. Como control positivo, se cultivaron en medios con un 10 % de FBS. Los resultados se muestran en la figura 3. En general, el compuesto de ensayo no muestra ningún efecto proliferativo a concentraciones comprendidas entre 0,5 µg/ml y 0,00005 µg/ml. Las concentraciones superiores a 0,5 µg/ml provocaron citotoxicidad celular, que afecta a la viabilidad celular.

#### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la composición postbiótica de la invención se evaluó en un ensayo *in vitro* en la línea celular HaCaT midiendo la inhibición de la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Todos los grupos experimentales, excepto el control negativo, incluían TBHP (agente generador de ROS). Se realizaron dos ensayos independientes con diferentes intervalos de concentración. De 500 µg/ml a 3,9 µg/ml y de 5 µg/ml a 0,0000005 µg/ml. Los resultados se muestran en la figura 4a, 4b y la tabla 6. La composición postbiótica de la invención muestra actividad antioxidante a concentraciones en el intervalo de 0,5 µg/ml a 0,005 µg/ml. El resto de las concentraciones probadas no muestran actividad antioxidante (ROS).

Tabla 6. Actividad antioxidante

|                   |            | Composición postbiótica de la invención (µg/ml) + TBPH |            |            |            |            |            |            |             |              |  |
|-------------------|------------|--------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|--|
| Repeticiones      | C-         | 500                                                    | 250        | 125        | 62,5       | 31,25      | 15.62<br>5 | 7,812<br>5 | 3,9062<br>5 | C+(TBP<br>H) |  |
| 1                 | -<br>11,94 | 106,2<br>9                                             | 162,6<br>9 | 163,2<br>5 | 163,3<br>6 | 157,1<br>4 | 118,9<br>6 | 124,3<br>9 | 115,23      | 102,44       |  |
| 2                 | -6,22      | 119,6<br>9                                             | 140,5<br>1 | 158,3<br>9 | 176,8<br>3 | 140,7<br>9 | 146,6<br>8 | 101,8<br>8 | 124,9       | 103,8        |  |
| 3                 | 2,94       | 114,8<br>9                                             | -          | 104,7      | 156,6<br>9 | 142,0<br>9 | 131,7<br>4 | 107,3<br>1 | 126,54      | 116,98       |  |
| 4                 | 0,17       | 116,1<br>3                                             | 168,3<br>4 | -          | 161,8<br>4 | 155,5<br>6 | 151,0<br>9 | 130,6<br>7 | 126,77      | 105,84       |  |
| 5                 | -5,15      | 70,99                                                  | 113,8<br>1 | -          | -          | 183,1<br>1 | 134,6<br>3 | 118,6<br>8 | 112,34      | 94,13        |  |
| 6                 | 20,19      | -                                                      | 114,3<br>2 | -          | 151,1<br>5 | 120,0<br>9 | 108,3<br>8 | 87,56      | 91,98       | 76,82        |  |
|                   |            | Composición postbiótica de la invención (µg/ml) + TBPH |            |            |            |            |            |            |             |              |  |
|                   | C-         | 500                                                    | 250        | 125        | 62,5       | 31,25      | 15.62<br>5 | 7,812<br>5 | 3,9062<br>5 | C+(TBP<br>H) |  |
| Promedio          | 0          | 105,6                                                  | 139,9<br>3 | 142,1<br>1 | 161,9<br>7 | 149,8      | 131,9<br>1 | 111,7<br>5 | 116,29      | 100          |  |
| Desv.<br>estándar | 11,17      | 19,96                                                  | 25,8       | 32,49      | 9,59       | 21,07      | 16,21      | 15,92      | 13,39       | 13,53        |  |

La composición postbiótica de la invención muestra una actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis en la línea celular THP-1 a concentraciones en el intervalo de 250 µg/ml a 62,5 µg/ml. El compuesto de ensayo no muestra ningún efecto proliferativo en fibroblastos dérmicos humanos primarios a concentraciones en el intervalo de 0,5 µg/ml a 0,00005 µg/ml.

Regeneración de tejidos en un modelo de pez cebra

Tres días después del día de la amputación (12 dpf), es decir, 15 dpf, se midió la longitud desde la parte distal de la notocorda hasta la parte más distal de la aleta caudal de cada larva (como se muestra en la figura 5 y la tabla 7) utilizando la línea recta y herramientas de medición del software ImageJ.

Tabla 7. Valor medio obtenido para el recrecimiento de la cola en todos los grupos experimentales

| Medias de la longitud de la cola a los 15 dpf (media) |          |
|-------------------------------------------------------|----------|
| Dieta estándar                                        | 0,173 mm |
| Dieta suplementada                                    | 0,185 mm |

El objetivo principal de este Estudio fue evaluar el valor potencial de la composición postbiótica de la invención sobre la capacidad de regeneración tisular en un modelo de resección de la cola de pez cebra. Para este fin, se administró la composición postbiótica en la dieta a larvas de pez cebra de 5 a 15 dpf. Se realizó una amputación de la aleta caudal el día 12 después de la fecundación y se analizó el tejido rebrotado utilizando parámetros de distancia. La dieta postbiótica dio una ventaja significativa en el ritmo de regeneración de las colas amputadas en comparación con los grupos de dieta estándar a partir del punto de tiempo de 15 dpf entre los grupos 1 y 2 (dieta estándar y suplementada respectivamente). Si la medición del rebrote de la cola se hubiera hecho después de los 15 dpf, la diferencia entre la dieta estándar y la dieta suplementada habría sido mayor. Además, una cantidad superior a 18 mg/día y tanque mostraría una mayor diferencia entre la dieta estándar y la dieta suplementada en este experimento

### Ejemplo 3: Ensayo de irritación cutánea y ensayo de fototoxicidad

#### *Ensayo de irritación cutánea: OCDE 439*

Los resultados obtenidos en el ensayo de irritación cutánea se muestran en la Fig. 6. Se predice un irritante si la viabilidad tisular relativa media de tres tejidos individuales expuestos al elemento de ensayo (composición postbiótica de la invención) se reduce por debajo del 50 % de la media de los controles negativos. La tabla 8 muestra el resultado obtenido para la composición de la invención. La composición postbiótica de la invención se clasifica como No irritante (SGA Sin Categoría)

Tabla 8 Porcentajes de viabilidad

|                         | Media de viabilidades (%) | Clasificación                    |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Control negativo (CN)   | 100                       | No irritante (NI)                |
| Control positivo (CP)   | 2,0                       | Irritante (I) (R30 o SGA cat. 2) |
| Composición postbiótica | 90,4                      | No irritante (NI)                |

### *Ensayo de fototoxicidad in vitro*

#### *Determinación de dosis*

Para establecer las concentraciones que deben probarse en el ensayo de fototoxicidad, se decidió comprobar la composición postbiótica de la invención en un ensayo de búsqueda de dosis utilizando SDS como control positivo. Partiendo de 20 mg/ml disueltos en medio de cultivo, se decidió preparar las concentraciones indicadas anteriormente en la sección de materiales y métodos. Utilizando el software estadístico Graphpad Prism 8, se calcularon los valores de  $CI_{50}$  mediante una curva logística de 4 parámetros (4PL). Esta ecuación utiliza valores  $\log(\text{dosis})$ . Este modelo no asume una pendiente estándar, sino que se ajusta a la pendiente de Hill a partir de los datos de la figura 7. De acuerdo con los resultados, la composición postbiótica de la invención mostró una  $CI_{50}$  de 2,44  $\mu\text{g/ml}$  (valor calculado a partir de Graph Pad Prism). El SDS mostró resultados dentro del intervalo conocido.

#### *Ensayo de fototoxicidad*

Una vez obtenidos los resultados de citotoxicidad, el ensayo de fototoxicidad para la composición postbiótica de la invención se realizó utilizando 1 mg/ml como dosis más alta. Aunque se observaron signos de toxicidad a esta concentración, el tiempo de exposición durante el ensayo de citotoxicidad fue mayor que en el ensayo de fototoxicidad. Por lo tanto, se decidió utilizar la concentración más alta permitida de acuerdo con la guía 432 de la OCDE. En total, se prepararon 8 concentraciones como se describe en la sección de materiales y métodos anterior. En paralelo, también se prepararon 8 concentraciones del artículo de referencia, clorpromazina (CPZ): (C1) 200  $\mu\text{g/ml}$ ; (C2) 66,67  $\mu\text{g/ml}$ ; (C3) 22,22  $\mu\text{g/ml}$ ; (C4) 7,407  $\mu\text{g/ml}$ ; (C5) 2,47  $\mu\text{g/ml}$ ; (C6) 0,823  $\mu\text{g/ml}$ ; (C7) 0,274  $\mu\text{g/ml}$ ; y (C8) 0,091  $\mu\text{g/ml}$ . Como puede observarse en la figura 8 y en la tabla 9, las placas no irradiadas (-IRR) mostraron buenos resultados en comparación con las placas irradiadas (+IRR) y pudieron calcularse los valores de  $CI_{50}$  para la CPZ.

**Tabla 9 Curvas de viabilidad obtenidas en el ensayo de fototoxicidad**

| % de viabilidad         |             |             |             |             |             |             |             |             |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                         | C1          | C2          | C3          | C4          | C5          | C6          | C7          | C8          |
| Posbiótico<br>a<br>-IRR | 102,43<br>% | 104,02<br>% | 104,09<br>% | 103,96<br>% | 104,98<br>% | 103,37<br>% | 103,43<br>% | 100,29<br>% |
| Posbiótico<br>a<br>+IRR | 102,34<br>% | 101,95<br>% | 103,06<br>% | 103,02<br>% | 104,38<br>% | 102,65<br>% | 102,75<br>% | 101,69<br>% |
| CPZ<br>-IRR             | 0,41 %      | 0,01 %      | 97,82 %     | 104,06<br>% | 105,32<br>% | 105,22<br>% | 103,56<br>% | 102,22<br>% |
| CPZ<br>+IRR             | 2,57 %      | 0,32 %      | 1,62 %      | 1,75 %      | 1,31 %      | 83,43 %     | 103,77<br>% | 103,42<br>% |

De acuerdo con la guía 432 de la OCDE, si no se puede calcular una  $CI_{50}$ , no se puede determinar un valor de PIF para la composición postbiótica de la invención. Por tanto, se calcula el fotoefecto medio (MPE). En este estudio, no se pudo determinar el valor de  $CI_{50}$  para las células expuestas a la composición postbiótica, mientras que la  $CI_{50}$  de la CPZ fue de 31,406 para las placas no irradiadas y de 0,974 para las irradiadas. El cálculo de los valores de MPE y PIF para los controles y la composición postbiótica se realizó con un software desarrollado en el marco de la guía 432 de la OCDE y disponible en <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>.

Para predecir el potencial fototóxico, se compararon las respuestas a la concentración obtenidas en presencia (+Irr) y en ausencia (-Irr) de irradiación solar y se calculó el factor de fotoirritación (PIF) y/o el fotoefecto medio (MPE), los resultados figuran en la tabla 10.

**Tabla 10 Valores de cálculo de la PIF (y del error máximo permitido)**

| Muestra            | PIF                                   | MPE                                                 |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                    | $\frac{CI_{50}(-Irr)}{CI_{50}(+Irr)}$ | $\frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{ci}}{\sum_{i=1}^n w_i}$ |
| <b>Postbiótica</b> | No disponible                         | 0.005                                               |
| <b>CPZ</b>         | 32,303                                | 0,401                                               |

De acuerdo con los criterios definidos en las Directrices de la OCDE para el ensayo de productos químicos, Protocolo n.º 432 los resultados obtenidos deben cumplir los siguientes

criterios: Tras la irradiación con dosis de UVA de  $5 \text{ J/cm}^2$  la viabilidad celular del control con disolvente fue  $>80 \%$  de las células no irradiadas. En este experimento, la diferencia en % entre los controles con disolvente y los controles medios con disolvente (es decir, las placas no irradiadas) fue del  $1,61 \%$  para la composición postbiótica y del  $2,74 \%$  para la CPZ. El valor de PIF para la referencia positiva (CPZ) se indica en la tabla anterior. De acuerdo con estos resultados, la composición postbiótica de la invención se clasifica como no fototóxica