

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193160** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.01

(51) Int. Cl. *A61K 8/99* (2017.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.05

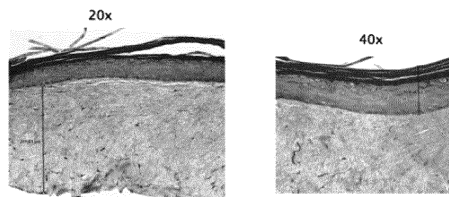
(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ LACTOBACILLUS PARACASEI И ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОЖИ

(31) **102019000008097**
(32) **2019.06.05**
(33) **IT**
(86) **PCT/IB2020/055326**
(87) **WO 2020/245797 2020.12.10**
(71) Заявитель:
ЛАК2БИОМЕ С.Р.Л. (IT)

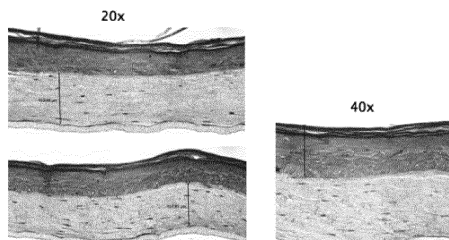
(72) Изобретатель:
Биффи Андреа (IT)
(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к композиции, содержащей пробиотики (живые и жизнеспособные или инактивированные бактериальные штаммы) и гиалуроновую кислоту или ее соль, для применения в предупреждении, в лечении (терапевтическом или косметическом куративном) или в облегчении по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного старением кожи, или уменьшением иммунной защиты кожи, или воспалением/инфекцией кожи, например воспалением, индуцированным или вызванным UV-лучами.

А



Б



202193160
A1

202193160
A1

PCT/IB2020/055326

МПК: *A61K 8/99* (2017.01) *A61Q 19/08* (2006.01)*A61K 8/73* (2006.01)

**КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ
LACTOBACILLUS PARACASEI И ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ, И ИХ
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОЖИ**

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пробиотики (живые и жизнеспособные или инактивированные бактериальные штаммы) и гиалуроновую кислоту или ее соль, для применения в предупреждении, в лечении (терапевтическом или косметическом куративном) или в облегчении по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного старением кожи или уменьшением иммунной защиты кожи или воспалением/инфекцией кожи, таким как воспаление, индуцированное или вызванное UV (ультрафиолетовыми) лучами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кожа представляет собой наружную оболочку организма человека, и она составляет первую линию защиты организма от агрессивных внешних факторов, учитывая, что она действует как анатомический барьер против потенциальных патогенов и возможных вредных агентов. Изменения кожи могут облегчать появление кожных заболеваний, особенно вызываемых патогенами. Например, по мере старения кожи она становится более тонкой и более ломкой вследствие того факта, что регенерация клеток происходит медленнее и изменяется от представляющих норму 3-4 недель до 4 или даже 6 недель. С течением времени кожа претерпевает структурные изменения, вызванные несколькими факторами различного происхождения, которые определяют потерю гидратации кожи, появление микроморщин, потерю эластичности, гиперкератоз и образование гиперпигментированных пятен.

Более того, богатый микробиом, который колонизирует кожу человека, выполняя важные и полезные функции по борьбе с адгезией и развитием кожных патогенов, таких как, например, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, может столкнуться с дисбалансами или дисбиозом, вызванным различными факторами.

Когда на коже возникает дисбиоз, пробиотики могут действовать в качестве модуляторов, восстанавливая баланс на уровне микробиоты кожи. За последнее десятилетие применение новых технологий облегчило таксономический анализ

микробиоты кожи, популяция бактерий которой может достигать приблизительно 1010 видов микроорганизмов, принадлежащих более чем 25 филумам, среди которых наиболее широко представлены *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Была обнаружена связь между изменениями микробиома кожи и различными заболеваниями кожи, например, считают, что *P. acnes* представляет собой патогенную бактерию, ассоциированную с кожной угревой сыпью. Следовательно, поддержание состояния гомеостаза микробиоты кожи или восстановление указанного гомеостаза после дисбиоза микробиоты является фундаментальным для предупреждения или лечения заболеваний кожи, в частности инфекций или воспалений кожи, еще более конкретно инфекций или воспалений, вызванных патогенными агентами, такими как бактерии или вирусы, а также вызванных облучением кожи UV-лучами или вызванных контактом кожи с неблагоприятными воздействиями.

Традиционно эти проблемы решают с использованием антибактериальных агентов, то есть с использованием дезинфицирующих средств и местных антибиотиков. С одной стороны, хотя антибиотики несомненно эффективны, наряду с устранением полезных бактерий применение антибиотиков создает риск сенсibilизации и потенциальных нежелательных побочных эффектов, особенно при длительном применении антибиотиков широкого спектра действия.

Кроме того, традиционный подход для предупреждения проблем повреждения или старения кожи вследствие облучения кожи UV-лучами, заключается в использовании кремов или продуктов для кожи, которые отражают или поглощают UV-лучи, обычно называемых солнечными фильтрами. Активные ингредиенты в так называемых “химических” солнечных фильтрах (салицилаты, циннаматы, *оксибензон*, *октилкрилен* и другие) благодаря своей структуре способны поглощать UV свет. С другой стороны диоксид титана и оксид цинка представляют собой инертные неорганические вещества с сильной покрывающей способностью, которые физически отражают солнечный свет и которые, следовательно, включены в состав так называемых физических экранов.

Однако указанные солнечные фильтры позволяют только предотвратить взаимодействие UV-лучей с кожей, в то время как они ни стимулируют поддержание гомеостаза микробиоты кожи, ни восстанавливают указанный гомеостаз в случае дисбиоза, или инфекций, или воспалений, вызванных указанными UV-лучами, которые могут быть не полностью экранированы солнечными фильтрами.

Благодаря интенсивной исследовательской деятельности и деятельности по разработке авторы настоящего изобретения поставили и решили вышеописанные технические проблемы путем обеспечения инновационных композиций (коротко, композиции(й) по изобретению), содержащих смесь (коротко, смесь по изобретению), содержащую живые и жизнеспособные или инактивированные бактерии штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированному как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и гиалуроновую кислоту или ее соль (коротко, НА) или, альтернативно, состоящую из них.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первый аспект настоящего изобретения относится к применению композиции, содержащей пробиотика и гиалуроновую кислоту или ее соль, для предупреждения, ослабления симптомов или лечения естественного старения кожи или старения кожи, вызванного воздействием внешних факторов, таких как, например, UV-лучи.

Второй аспект настоящего изобретения относится к применению композиции, содержащей пробиотика и гиалуроновую кислоту или ее соль, для предупреждения, ослабления симптомов или лечения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного уменьшением иммунной защиты кожи.

Третий аспект настоящего изобретения относится к применению композиции, содержащей пробиотика и гиалуроновую кислоту или ее соль, для предупреждения, ослабления симптомов или лечения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного или вызванного с воспалением/инфекцией кожи.

Особенно полезные для задач настоящего изобретения пробиотики представляют собой бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus*, предпочтительно виду *Lactobacillus paracasei*, например штамму *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

Авторы настоящего изобретения фактически обнаружили, что композиция, содержащая пробиотики, предпочтительно бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus*, и гиалуроновую кислоту, обладает способностью усиливать иммунную защиту, способствуя высвобождению антимикробных пептидов и хемокинов кожи, усиливая нормальный процесс дифференцировки и замены клеток эпидермиса и укрепляя структуру дермы.

Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что применение композиции, содержащей гиалуроновую кислоту и пробиотики, предпочтительно бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus*, способно оказывать

противовоспалительное действие и предупреждать активацию воспаления, индуцированного или вызванного UV-лучами.

В частности, композиции и смеси по настоящему изобретению обладают способностью:

- индуцировать механизмы защиты и/или заживления кожи, в частности иммуномодуляторные механизмы;
- предупреждать и/или лечить воспалительные или инфекционные состояния кожи, в частности таковые, вызванные UV-излучением, как UV-A, так и UV-B;
- бороться с пролиферацией бактерий, патогенных для кожи;
- поддерживать или восстанавливать состояние гомеостаза кожи и/или баланс микробиоты кожи;
- поддерживать, облегчать, стимулировать и/или усиливать процессы заживления ран и/или процессы реэпителизации и/или рубцевания;
- бороться со старением кожи и/или замедлять его.

Более того, композиции по изобретению обладают способностью индуцировать и/или стимулировать указанные положительные эффекты как на короткий срок, так и в течение длительного промежутка времени.

Дополнительно смеси и композиции по изобретению не имеют существенных побочных эффектов, и их можно вводить любым субъектам, в частности детям и беременным или кормящим женщинам.

Наконец, смеси и/или композиции по изобретению легки в изготовлении и рентабельны.

Решение этих и других задач, которые будут ясны из следующего подробного описания, достигается с помощью смесей и композиций (содержащих указанные смеси) по настоящему изобретению благодаря техническим характеристикам, указанным в прилагаемой формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно и проиллюстрировано примерами со ссылкой на приложенные графические материалы, где:

На Фиг. 1 представлено изображение гистологических срезов тканей, обработанных соответственно физиологическим раствором (А) и композицией,

содержащей штамм LPC-S01 (Б), окрашенных трихромно по Массону, с 20х и 40х увеличением;

На Фиг. 2 представлено изображение гистологических срезов тканей, окрашенных трихромно по Массону, обработанных соответственно композицией, содержащей гиалуроновую кислоту (А), и композицией, содержащей штамм LPC-S01 и гиалуроновую кислоту (Б), с 20х и 40х увеличением;

На Фиг. 3 представлен результат количественной оценки ядерных транслокаций NFκB (ядерный фактор каппа-В) в тканях, подверженных действию UV-излучения и обработанных композицией, содержащей штамм LPC-S01 (P1); композицией, содержащей штамм LPC-S01 и гиалуроновую кислоту (P2), и композицией, содержащей гиалуроновую кислоту (P3);

На Фиг. 4 представлено изображение гистологических срезов тканей, обработанных соответственно физиологическим раствором (А); композицией, содержащей штамм LPC-S01 (Б); композицией, содержащей гиалуроновую кислоту (В), и композицией, содержащей штамм LPC-S01 и гиалуроновую кислоту (Г), через 4 часа после UV-поражения, окрашенных гематоксилином-эозином, с 20х увеличением;

На Фиг. 5 представлено изображение гистологических срезов тканей, обработанных соответственно физиологическим раствором (А); композицией, содержащей штамм LPC-S01 (Б), композицией, содержащей гиалуроновую кислоту (В), и композицией, содержащей штамм LPC-S01 и гиалуроновую кислоту (Г), через 24 часа после UV-повреждения, окрашенных гематоксилином-эозином, с 20х увеличением;

На Фиг. 6а, 6б, 6в, 6г представлены изображения, полученные под микроскопом при гистоморфологическом анализе путем окрашивания Н&Е на модели гомеостаза в момент времени 24 часа (6а: NC (отрицательный контроль) через 24 часа, 6б: P3-і через 24 часа) и в момент времени 48 часов (6в: NC через 48 часов, 6г: P3-і через 48 часов).

На Фиг. 7 представлены результаты анализа экспрессии генов (qRT-PCR (количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией) в момент времени 24 часа (RQ, рассчитанный для NC через 24 часа равен 1; RQ менее 0,5 понижающая регуляция, RQ более 2 повышающая регуляция) на модели гомеостаза для продуктов P1-і, P2-і, P3-і.

На Фиг. 8 представлен протокол предобработки относительно UV-облучения на “поцарапанной” ткани композициями по изобретению, содержащими инактивированный штамм.

На Фиг. 9 представлен протокол пост-обработки относительно ультрафиолетового облучения на “поцарапанной” ткани композициями по изобретению, содержащими инактивированный штамм.

На Фиг. 10 и 11 показано уменьшение жизнеспособности патогенного *S. asnes* DMS1897, выраженное в Log10 КОЕ (колониеобразующие единицы) на кожных вставках *in vitro* в экспериментальных условиях: модель исключения и модель конкуренции, соответственно.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В контексте настоящего изобретения термин “кожа” используют для обозначения первой линии защиты в отношении окружающей среды; в частности, защита осуществляется благодаря действию кератиноцитов, рассеянных в наружном слое кожи (эпидермисе), где они могут индуцировать секрецию цитокинов и хемокинов для передачи предупреждающего сигнала в более глубокие слои кожи, генерируя противовоспалительный ответ.

В контексте настоящего изобретения выражение “старение кожи” используют для обозначения необратимого эволюционного процесса; он выражается в серии физиологических изменений, которые определяют потерю гидратации кожи, появление микроморщин, потерю эластичности, гиперкератоз и образование гиперпигментированных пятен, называемых “старческими веснушками”.

В контексте настоящего изобретения термин “пробиотик” используют для обозначения согласно определению, данному FAO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) и WHO (Всемирная организация здравоохранения): “*Живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают благоприятное воздействие на хозяина*”. Другими словами, пробиотики представляют собой микроорганизмы (бактериальные штаммы), для которых доказана их способность выполнять полезные для организма функции при приеме в подходящих количествах.

В контексте настоящего изобретения выражение “гиалуроновая кислота” используют для обозначения гликозаминогликана, состоящего из повторяющихся единиц глюкозамина и глюкуроновой кислоты, связанных вместе, альтернативно, гликозидными связями $\beta 1 \rightarrow 4$ и $\beta 1 \rightarrow 3$, а также внутримолекулярными водородными связями, которые стабилизируют их конформации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объект, составляющий настоящее изобретение, представляет собой композицию (коротко, композицию по изобретению или композицию), содержащую (I) смесь М, содержащую, или, альтернативно, состоящую из бактериального штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированного и депонированного как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (живого и жизнеспособного, или инактивированного, или его производного), и гиалуроновой кислоты или ее соли; и (II) по меньшей мере одной приемлемой добавки и/или по меньшей мере одного приемлемого эксципиента фармацевтического, или косметического, или пищевого класса.

Объект, составляющий настоящее изобретение, представляет собой указанные композиции или смеси М по изобретению, содержащие или, альтернативно, состоящие из бактериального штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированному и депонированному как штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, и гиалуроновой кислоты или ее соли (в соответствии с любым из описанных воплощений), для применения в качестве лекарственного средства.

Первый аспект настоящего изобретения относится к композиции (композиции по изобретению), содержащей пробиотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, жизнеспособные или инактивированные, или их производные), предпочтительно пробиотические бактерии, и гиалуроновую кислоту или ее соль, для применения в лечении (терапевтическом или косметическом), в предупреждении или облегчении по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного старением кожи (внутренним старением или внешним старением, как определено ниже).

Указанный признак или симптом старения кожи связан с серией модификаций, которые обычно приводят к истончению и/или деформации структуры кожи.

Предпочтительно указанное старение представляет собой внутреннее, или хронологическое, старение, которое зависит по существу от генетических (или внутренних) факторов. Внутреннее старение, в принципе, обычно начинается в возрасте после 25 лет. Предпочтительно указанный признак или симптом, ассоциированный с или вызванный внутренним старением кожи, выбран из: морщин, вялости кожи, потери или уменьшения целостности кожи, недостаточной эластичности кожи, недостатка тонуса кожи, истонченной кожи, шелушения кожи и обезвоживания

кожи, образования темных пятен или гиперпигментации кожи, также называемой “возрастными пятнами”.

Таким образом, объект настоящего изобретения представляет собой косметическое применение композиций или смесей М по настоящему изобретению, содержащих или, альтернативно, состоящих из бактериального штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированного и депонированного как штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, и гиалуроновой кислоты или ее соли и, возможно, первого вещества и/или второго вещества (согласно любому из описанных воплощений), для поддержания гомеостаза кожи и/или в качестве агента против старения кожи, например для косметического лечения морщин, потери эластичности кожи (солнечного эластола), сухой или обезвоженной кожи, шершавой кожи, фотостарения, красноты кожи, наличия расширенных капилляров на щеках, носу и/или ушах, веснушек, аномальной или неравномерной пигментации или гиперпигментации кожи, или для того, чтобы сделать кожу яркой и более натуральной.

Альтернативно, указанное старение кожи является внешним, то есть вызванным внешними факторами окружающей среды (внешними факторами). Внешнее старение может быть вызвано, например, агрессивными внешними агентами и/или такими факторами окружающей среды как UV-излучение (отвечающее за фотостарение), курение сигарет, злоупотребление алкоголем, загрязнение, длительный контакт с раздражителями, холод, ветер и их комбинации. Фотостарение представляет особый интерес, поскольку оно связано с многочисленными заболеваниями или повреждением кожи, которые также могут приводить к серьезным заболеваниям, таким как опухоли кожи.

Предпочтительно указанный признак или симптом, ассоциированный с или вызванный внешним старением кожи, выбран из: эритемы, солнечной пигментации или веснушек, кератоза, предпочтительно гиперкератоза, красноты кожи, солнечных ожогов, ожогов, фотостарения, солнечного эластола, кортикальной катаракты, птеригия, реактивации герпеса, повреждения кожи любой природы (язвы, раны или синяка), особенно повреждения губ и/или конъюнктивы, меланомы кожи, плоскоклеточной карциномы кожи, базально-клеточной карциномы (базалиомы), плоскоклеточной карциномы роговицы или конъюнктивы.

Старение кожи относится к изменению в структуре кожи, которое неизбежно приводит к повышенной чувствительности к воспалительным заболеваниям и/или инфекциям.

В одном воплощении композицию или смесь М по изобретению, содержащую пробиотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, живой и жизнеспособный, или инактивированный, или его производное) и гиалуроновую кислоту или ее соль, используют для лечения (способ терапевтического лечения), для предупреждения или для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного подавлением иммунной системы кожи или воспалительными заболеваниями и/или инфекциями кожи. Другими словами, композицию применяют для усиления иммунной защиты кожи.

Указанный по меньшей мере один признак или симптом, ассоциированный с или вызванный уменьшением иммунной защиты кожи или воспалительными состояниями кожи, выбран из: дерматита, предпочтительно ассоциированного с раздражением или экскориацией; угревой сыпи; скрытого или хронического дерматоза (например, розацеа или купероза); инфекции кожи; воспаления кожи; эритемы; язвы; псориаза; атопического дерматита; отита; трещин на коже; фистулы и геморроя.

Поражения или заболевания кожи могут быть ассоциированы с или вызваны патогенами. В этом случае патогены могут представлять собой бактерии, грибы, дрожжи, вирусы и их комбинации.

В одном воплощении композицию или смесь М по изобретению, содержащую пробиотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, жизнеспособные или инактивированные, или их производное) и гиалуроновую кислоту или ее соль, применяют для лечения (способ терапевтического лечения), для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с или вызванного воспалением/инфекцией кожи, например ассоциированного с или вызванного патогенным агентом.

Предпочтительно указанные патогены представляют собой бактерии, предпочтительно бактерии рода *Propionibacterium*, предпочтительно вида *acnes* (*Propionibacterium acnes* или *Cutibacterium acnes*, коротко *C. acnes*); *Staphylococcus*, предпочтительно вида *epidermidis*, *aureus*, *warneri*, *pyogenes*, *mitis*; *Corynebacterium ssp*; *Pseudomonas*, предпочтительно вида *aeruginosa*; *Acinetobacter*, предпочтительно вида *johnsonii*; *Streptococcus*, предпочтительно вида *pyogenes*; *Micrococcus ssp.*,

Brevibacterium ssp.

Экспериментальные данные, полученные авторами настоящего изобретения, показывают, что композиция или смесь М по изобретению, содержащая гиалуроновую кислоту и пробиотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, живой и жизнеспособный, или инактивированный, или его производное), обладает способностью оказывать противовоспалительный и/или иммуномодулирующий эффект на уровне кератиноцитов и, следовательно, кожи.

Не желая быть связанными теорией, отметим, что применения композиции обусловлены противовоспалительной способностью, иммуномодуляцией, обновлением клеток эпидермиса, дифференциацией эпидермиса и усилением структуры кожи, поддерживаемыми пробиотиками и гиалуроновой кислотой, содержащимися в композиции.

В частности, авторы настоящего изобретения показали, что, когда кожу подвергают действию композиции, содержащей гиалуроновую кислоту и пробиотики, она обладает способностью усиливать процесс дифференциации эпидермиса, в частности роговой слой становился толще. Кроме того, заметили, что коллагеновые волокна были плотнее и компактнее.

Более того, композиция по изобретению, содержащая пробиотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, жизнеспособные, или инактивированные, или их производное) и гиалуроновую кислоту или ее соль, обладает способностью оказывать иммуномодулирующий (или иммуностимулирующий) эффект на иммунную систему кожи, что очевидно по результатам оценки экспрессии генов, кодирующих хемокины и дефензины. В частности, повышение экспрессии дефензина $\beta 2$ наблюдали как под действием пробиотиков, так и под действием композиции по изобретению, содержащей гиалуроновую кислоту и пробиотики.

В одном воплощении настоящего изобретения пробиотики (присутствуют в композиции по изобретению вместе с гиалуроновой кислотой или ее солью) предпочтительно выбраны из бактерий, грибов, дрожжей и их комбинаций; предпочтительно бактерий, более предпочтительно бактериального штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei* и идентифицированного как *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (живого, инактивированного или его производного).

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения, бактерии принадлежат к по меньшей мере одному роду, выбранному из *Lactobacillus*,

Bifidobacterium, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* и *Enterococcus*.

Более предпочтительно, бактерии принадлежат роду *Lactobacillus*.

Согласно дополнительному предпочтительному аспекту настоящего изобретения, бактерии рода *Lactobacillus* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplanarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* и их комбинациям.

Более предпочтительно, лактобациллы принадлежат к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно штамму *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамму *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760.

Оба штамма выделены и депонированы SOFAR S.p.A.; в частности, бактериальный штамм *L. casei* DG[®] (торговая марка, зарегистрированная Sofar, Italy), депонирован SOFAR S.p.A. 5 мая 1995 года в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже с депозитарным номером CNCM I-1572. Первоначально штамм назывался *Lactobacillus casei* DG sub. *casei* (переклассифицирован как *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572).

Бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) с номером доступа DSM 26760 15/05/2017 SOFAR S.p.A. (дата заявки для перевода депонирования в соответствие с Будапештским соглашением; дата исходного депонирования 11/01/2013).

Штаммы *Lactobacillus paracasei* были переклассифицированы как *Lacticaseibacillus paracasei*.

В предпочтительном воплощении изобретения композиция содержит *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 и гиалуроновую кислоту или ее соль.

Согласно дополнительному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода *Bifidobacterium* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* и *B. tsurumiense*; более предпочтительно, выбранному из

Bacillus clausii, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* и *Bacillus marinus*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода *Propionibacterium* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* и *P. thoenii*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода *Streptococcus* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* и *Streptococcus zooepidemicus*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода *Lactococcus* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* и *L. taiwanensis*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода

Aerococcus принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaeequi* и *A. urinaehominis*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, бактерии рода *Enterococcus* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* и *Enterococcus solitarius*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения, дрожжи принадлежат роду *Saccharomyces*, более предпочтительно виду *Saccharomyces cerevisiae* и/или *Saccharomyces boulardii*.

В смеси или композиции по настоящему изобретению пробиотики, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, используют в живой форме (вместе с гиалуроновой кислотой или ее солью), то есть их используют в качестве пробиотиков.

Альтернативно, указанные пробиотики, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, являются мертвыми, и/или инактивированными, и/или тиндализованными.

Например, жизнеспособные бактериальные штаммы (пробиотики) по настоящему изобретению (например, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) можно инактивировать путем нагревания или тиндализации или с помощью гамма-излучения или ультразвука. Указанную инактивацию путем нагревания или тиндализации можно проводить при температуре, находящейся в диапазоне от 50°C до 120°C, предпочтительно от 65°C до 105°C, более предпочтительно от 75°C до 95°C, например приблизительно 85°C, в течение промежутка времени, находящегося в диапазоне от 30 минут до 120 минут, предпочтительно от 45 минут до 85 минут, например приблизительно 60 минут; или, альтернативно, путем тиндализации. Процесс нагревания, или тиндализации, или гамма-облучения, или обработки ультразвуком проводят в соответствии с методиками, процедурами и аппаратурой, известными специалисту в данной области техники.

Бактерии, подвергаемые указанному процессу инактивации путем нагревания или тиндализации, являются мертвыми (контроль путем подсчета на чашках и/или цитофлуориметрии), при этом клеточная стенка остается интактной, предпочтительно % бактерий находится в диапазоне от 70% до 99,5%, предпочтительно от 80% до 95% относительно общего числа бактерий, подвергаемых указанным методикам нагревания или тиндализации.

Еще в одном воплощении пробиотики, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, используют (вместе с гиалуроновой кислотой или ее солью) в форме лизата и/или экстракта, то есть их используют в качестве парaproбиотика.

Альтернативно, указанные пробиотики, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, используют (вместе с гиалуроновой кислотой или ее солью) в форме бактериальных продуктов, выбранных из супернатанта, метаболитов, метаболических биопродуктов, постбиотиков, клеточной стенки и ее компонентов, экзополисахарида, рибосом и гликопротеинов, глюканов и других полисахаридов, липополисахаридов и любого компонента супернатанта.

Коротко, в контексте настоящего изобретения выражение “производное(ые)” бактериального штамма, или жизнеспособного бактериального штамма, или пробиотиков (например, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) обозначает вышеупомянутые парaproбиотики (лизаты или экстракты) или любое производное и/или компонент бактериального штамма (супернатант, метаболиты, метаболические биопродукты, постбиотики, клеточную стенку и ее компоненты, экзополисахарид, рибосомы и гликопротеины, глюканы и другие полисахариды, липополисахариды или любой компонент супернатанта), которые при введении (пероральным или местным путем) в подходящих количествах, приносят пользу потребителю, представляющему собой человека или животное.

В контексте настоящего изобретения, термин “пробиотики”, если не указано иное, обозначает и включает бактериальные штаммы (например, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760), живые и инактивированные, и производные указанных бактериальных штаммов, как определено выше.

В целом, указанные пробиотики представлены отдельными микроорганизмами, или комбинациями микроорганизмов, или консорциумами любых видов

микроорганизмов, перечисленных в перечне QPS (квалифицированная презумпция безопасности) EFSA (Европейское агентство по безопасности продуктов питания).

Предпочтительно, композиция, как описано выше, содержит комбинацию описанных выше штаммов с другими микроорганизмами, как описано выше, предпочтительно выбранными из бактерий, грибов, дрожжей и их комбинаций.

Пробиотики, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, присутствуют в композиции (вместе с гиалуроновой кислотой или ее солью) в минимальном количестве, достаточном для обеспечения временной колонизации кожи, кишечника и/или других областей организма. Предпочтительно указанное количество варьирует по концентрации в диапазоне от 1×10^6 КОЕ до 1×10^{12} КОЕ, предпочтительно от 10^8 до 10^{12} единиц микроорганизмов, более предпочтительно от 10^9 до 10^{11} единиц микроорганизмов, например приблизительно или более 1×10^9 КОЕ (колониеобразующая единица), относительно ежесуточного приема (или одной дозы) композиции по изобретению.

Пробиотики по настоящему изобретению, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, предпочтительно вводят в количестве, варьирующем от 10^8 до 10^{12} единиц микроорганизмов, более предпочтительно от 10^9 до 10^{11} единиц микроорганизмов в каждый прием.

Согласно предпочтительному аспекту, прием пробиотиков, предпочтительно бактерий, выполняют по меньшей мере 1-2 раза в сутки.

Как описано выше, композиция или смесь М по изобретению содержит гиалуроновую кислоту или ее соль и их комбинацию. Указанная гиалуроновая кислота или ее соль (коротко, НА), содержащаяся в композиции по изобретению вместе со штаммом *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 и возможно по меньшей мере одним дополнительным первым или вторым веществом (согласно любому из описанных воплощений), предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне приблизительно от 10 кДа (килоДальтон равен 1000,00 Дальтон или 10^3 Дальтон) до 3000 кДа, предпочтительно приблизительно от 800 кДа до 2500 кДа, более предпочтительно приблизительно от 1000 кДа до 2000 кДа, например приблизительно 1300 кДа, 1400 кДа, 1500 кДа, 1600 кДа, 1700 кДа, 1800 кДа. В одном воплощении соль гиалуроновой кислоты (например, гиалуронат щелочного или щелочноземельного

металла) выбрана из гиалуроната натрия, гиалуроната калия, гиалуроната аммония, гиалуроната кальция, гиалуроната магния, гиалуроната цинка, гиалуроната кобальта и их комбинаций.

Более того, в контексте настоящего изобретения термин “гиалуроновая кислота или ее соль”, или “НА”, или просто “гиалуроновая кислота” используют для обозначения гиалуроновой кислоты как таковой и гидролизованной гиалуроновой кислоты (например, полученной путем ферментации), а также соли гиалуроновой кислоты (гиалуроната), как описано выше.

Когда указанная гиалуроновая кислота по изобретению представляет собой биотехнологическую гидролизованную гиалуроновою кислоту, полученную путем ферментации, она может иметь среднюю молекулярную массу приблизительно 10 кДа. Когда указанная гиалуроновая кислота по изобретению представляет собой гиалуронат натрия (например, CAS № 9067-32-7, Mw (Молекулярная масса) 1000-1400 кДа или Mw 1000-1700 кДа) или гиалуронат калия, он может иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне приблизительно от 1000 кДа до 2000 кДа.

Кроме *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 и НА композиция по изобретению преимущественно дополнительно содержит фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или дополнительные вещества (например, первое вещество или второе вещество, как описано ниже) и/или носители.

Кроме *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 и НА и возможно второго вещества (определенного ниже) композиция по настоящему изобретению предпочтительно дополнительно содержит первое вещество, выбранное из плазмы крови; PRP (плазмы крови, обогащенной тромбоцитами); веществ, обладающих заживляющим действием; реэпителизирующих веществ; увлажнителей; гидратирующих агентов; смягчающих агентов; адсорбирующих агентов; анальгетиков; флеботоников; противовоспалительных агентов; миорелаксантов; антибиотиков; антибактериальных агентов; противогрибковых агентов; противовирусных агентов; пестицидов; пептидных и/или белковых веществ и/или белков, таких как коллаген; веществ, принадлежащих соединительной ткани, таких как гликозаминогликаны, предпочтительно хондроитинсульфат, и/или их комбинаций.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция приготовлена (например, в твердой, полутвердой или жидкой форме) для местного или кожного местного нанесения, предпочтительно в форме крема, геля, масла, эмульсий (или

пены), растворов, дисперсий (твердая фаза-жидкость или жидкость-жидкость), суспензий, двухфазных смесей, спреев (жидкостей для распыскивания), марли, пластырей, перевязочных материалов, лосьонов, мусса, масок (масок, применимых на коже), мазей или паст.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция приготовлена для перорального введения, предпочтительно в форме таблетки, капсулы, пластинки (bar), гранулированного порошка, оболочки, буккальной растворимой гранулы, саше или пилюли, суспензий (например, питьевых флаконов) или растворов (монофазных или двухфазных).

Альтернативно, композицию готовят непосредственно перед применением путем смешивания композиции с водой.

Альтернативно, композицию готовят непосредственно перед применением путем смешивания вместе двух компонентов, пробиотиков (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760) и гиалуроновой кислоты или ее соли, например для приготовления масок для нанесения на кожу или суспензий для перорального применения (питьевых флаконов). В частности, устройство для приготовления композиции по изобретению для немедленного применения может состоять из флакона, содержащего водный раствор гиалуроновой кислоты или ее соли, и части на одном конце флакона (например, для закупоривания флакона, например крышки), содержащей бактериальный штамм (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, жизнеспособный, или инактивированный, или его производное) в твердой форме порошка, гранулы или таблетки; приготовление композиции по изобретению для немедленного применения происходит путем высвобождения (например, под давлением) бактериального штамма в твердой форме из части на конце флакона в раствор гиалуроновой кислоты или ее соли, содержащийся во флаконе.

Согласно предпочтительному воплощению, кроме *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, и НА, и возможно указанного первого вещества композиция по изобретению содержит другие вещества (второе вещество), выбранные из аминокислот, добавок, витаминов, микроэлементов, таких как цинк и селен, макро- и микронутриентов, ферментов и/или пребиотических веществ, таких как фруктоолигосахариды (FOS), галактоолигосахариды (GOS), ксилоолигосахариды (XOS), инулин, гуаровая камедь или их комбинации.

Композиция по изобретению, содержащая *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, НА и

возможно первое или второе вещество, дополнительно содержит указанную (II) по меньшей мере одну добавку и/или по меньшей мере один эксципиент фармацевтического, или пищевого, или косметического класса, которая(ый) представляет собой вещество, не имеющее терапевтической активности, подходящее для фармацевтического или пищевого применения. В контексте настоящего изобретения добавки и/или эксципиенты, подходящие для фармацевтического, или пищевого, или косметического применения, содержат все дополнительные вещества, известные специалисту в данной области техники, для приготовления композиции в твердой, полутвердой или жидкой форме, например такие как разбавители, растворители (включая воду, глицерин, этиловый спирт), солюбилизаторы, подкислители, загустители, подсластители, усилители аромата, красители, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, консерванты, стабилизирующие рН буферы и их смеси.

Композиции по изобретению, содержащие штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновую кислоту или ее соль и возможно первое и/или второе вещество, могут представлять собой фармацевтические композиции (или *Живые Биотерапевтические Продукты*), композиции медицинского устройства, диетические добавки, пищевые продукты, *новые пищевые продукты*, пробиотические продукты, композиции пищевых продуктов для специальной медицинской цели (FSMP) или косметические композиции.

Воплощения (FRn) настоящего изобретения обозначены ниже:

FR1. Композиция, содержащая пробиотики и гиалуроновую кислоту или ее соль, для применения в лечении, в предупреждении или в облегчении по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с/вызванного старением кожи, или в лечении, в предупреждении или в облегчении по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с/вызванного ослаблением иммунной системы кожи.

FR2. Композиция для применения согласно FR1, где старение кожи выбрано из внутреннего старения кожи и внешнего старения кожи.

FR3. Композиция согласно FR2, где указанный по меньшей мере один признак или симптом, ассоциированный с/вызванный внутренним старением кожи выбран из морщин, вялости кожи, потери или уменьшения целостности кожи, потери эластичности кожи, потери тонуса кожи, истонченной кожи, шелушения кожи и обезвоживания кожи.

FR4. Композиция для применения согласно FR2, где по меньшей мере один признак или симптом ассоциированный с/вызванный внешним старением кожи выбран из эритемы, пигментации, кератоза, предпочтительно гиперкератоза, красноты кожи, ожогов, кортикальной катаракты, птеригия, реактивации герпеса, повреждения кожи любой природы, предпочтительно повреждения губ и/или конъюнктивы, меланомы кожи, плоскоклеточной карциномы кожи, базальноклеточной карциномы (базалиомы), плоскоклеточной карциномы роговицы или конъюнктивы.

FR5. Композиция для применения согласно FR1, где по меньшей мере один признак или симптом, ассоциированный с/вызванный ослаблением иммунной системы кожи, выбран из дерматита, предпочтительно связанного с раздражением или эксфолиацией, угревой сыпи, инфекции, воспаления кожи, эритемы, язвы, псориаза, атопического дерматита, отита, трещин на коже, фистулы и геморроя.

FR6. Композиция для применения согласно любому из FR1-5, где указанные пробиотики предпочтительно выбраны из бактерий, грибов, дрожжей и их комбинаций, предпочтительно они представляют собой бактерии, принадлежащие по меньшей мере к одному роду, выбранному из *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* и *Enterococcus*.

FR7. Композиция для применения согласно FR6, где бактерии рода *Lactobacillus* принадлежат к по меньшей мере одному виду, выбранному из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranoformis*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* и их комбинациям.

FR8. Композиция для применения согласно FR6 или FR7, где бактерии представляют собой бактерии вида *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-

S01 DSM 26760.

FR9. Композиция для применения согласно любому из предшествующих FR, где соль гиалуроновой кислоты выбрана из гиалуроната натрия, гиалуроната калия, гиалуроната аммония, гиалуроната кальция, гиалуроната магния, гиалуроната цинка, гиалуроната кобальта и их комбинаций.

FR10. Композиция для применения согласно любому из предшествующих FR, где указанные пробиотики являются живыми, и/или мертвыми, и/или инактивированными, и/или тиндализованными, и/или находятся в форме лизата и/или экстракта, и/или в форме бактериальных продуктов, выбранных из супернатанта, метаболитов, метаболических биопродуктов, постбиотиков, клеточной стенки и ее компонентов, экзополисахарида, рибосом и гликопротеинов, глюканов и других полисахаридов, липополисахаридов и любого компонента супернатанта.

FR11. Композиция для применения согласно любому из предшествующих FR, где указанные пробиотики присутствуют в количестве, варьирующем от 10^8 до 10^{12} единиц микроорганизма, предпочтительно 10^9 и 10^{11} единиц микроорганизма.

FR12. Композиция для применения согласно любому из предшествующих FR в форме крема, геля, масла, эмульсий, спреев, марли, пластырей, перевязочных материалов, лосьонов, мусса, масок, мазей, паст или жидких композиций для композиций для немедленного применения.

Термин “лечение”, или “терапевтическое лечение”, или “способ лечения” в контексте настоящего изобретения используют для обозначения вмешательства в организм нуждающегося в этом субъекта, включающего введение терапевтически эффективного количества композиции или смеси М по изобретению для устранения, снижения/уменьшения или предупреждения патологии или заболевания и их симптомов или расстройств.

Термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству активного соединения и/или бактериального штамма, которое вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе, организме млекопитающего или человека, который ожидает и определяет индивидуум, исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист или работник здравоохранения.

В контексте настоящего изобретения выражение “субъекты” используют для обозначения субъектов-людей или субъектов-животных (например, домашних животных, таких как собаки, или кошки, или другие млекопитающие).

Предпочтительно, композиции по изобретению предназначены для использования в способах медицинского лечения или для косметического применения у субъектов-людей.

В контексте настоящего изобретения термин “медицинское устройство” используют в значении согласно Законодательному акту № 46 от 24 февраля 1997 г., или согласно новому Регламенту о медицинских изделиях (EU) 2017/745 (MDR).

В контексте настоящего изобретения термин “*новые пищевые продукты*” используют в значении согласно Регламенту ЕС 258 от 1997 года.

Если не указано иное, выражение композиция, или смесь, или другое, содержащая(ее) компонент в количестве “содержащемся в диапазоне от x до y”, используют для обозначения того, что указанный компонент может присутствовать в композиции, или смеси, или экстракте, или другом в любых количествах, находящихся в указанном диапазоне, даже если не определено конкретно, причем границы диапазона включены.

ПРИМЕР

Пример-А

Крем по изобретению, содержащий штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновую кислоту или ее соль:

для получения указанного крема штамм LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособный или инактивированный), лиофилизированный в форме порошка или капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ), растворяли в 13 мл крема на основе гиалуроновой кислоты (коротко, крем НА).

Пример композиции крема НА (% масс./масс.):

- вода (растворитель) сколько потребуется до 100%;
- функциональные вещества: октокрилен (фильтр UV-B) 2-8% (4,5%), инкапсулированный BMDBM, стабилизированный октокриленом (фильтр UV-B) 0,1-5% (2%), органическое масло ши (*butyrospermum parkii* – ши) (CAS N° 194043-92-0) 0,1-4% (1%), коллагеновый комплекс и пантенол 0,1-4% (1%), бутилметоксидибензоилметан (UV-A фильтр) 0,1-4% (1%), витамин Е 0,01-1% (0,3%), стебли *gardenia jasminoides* 0,01-1% (0,1%), низкомолекулярная гиалуроновая кислота (например, CAS N° 9004-61-9) 0,005-1% (0,05%), средне/высокомолекулярная гиалуроновая кислота (например, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,02%);
- эксципиенты и добавки (2-10% масс./масс., согласно техническим

требованиям, известным специалисту в данной области техники): антиоксиданты (например, токоферилацетат), консерванты (например, феноксиэтанол, сорбат калия), поверхностно-активные вещества-эмульгаторы (например, цетеарилглюкозид, цетиловый спирт), стабилизатор эмульсии (например, карбомер), растворители (например, 1,2-гександиол), абразивы (например, диоксид кремния), связывающее вещество (например, PVP (поливинилпирролидон)), увлажнитель (например, глицерин) и/или агенты для кондиционирования кожи (например, диметикон, ксантановая камедь, трополон).

Пример-Б

Маска по изобретению, содержащая штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновую кислоту или ее соль:

для приготовления указанной маски штамм LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособный или инактивированный, предпочтительно жизнеспособный), лиофилизированный в форме порошка или капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ), растворяли в водном растворе гиалуроновой кислоты или ее соли, например в растворе, содержащем компоненты, перечисленные в Таблице А, в котором низкомолекулярная гиалуроновая кислота (например, CAS N° 9004-61-9) 0,01-2% (0,1%) и средне/высокомолекулярная гиалуроновая кислота (например, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,05%) присутствуют в количестве % масс./масс. (относительно общей массы указанного водного раствора гиалуроновой кислоты) .

Ингредиент	CAS N°
вода	7732-18-5
пропандиол	504-63-2
гиалуронат натрия	9067-32-7
феноксиэтанол	122-99-6
1,2-гександиол	6920-22-5
каприлилгликоль	1117-86-8
гидролизованная гиалуроновая кислота	9004-61-9
гидроксид натрия	1310-73-2
добавки/эксципиенты	-

Таблица А

- Штамм *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, инактивированный нагреванием:

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ – (1)

МОДЕЛЬ Episkin T-Skin™ (3D-модель кожи)

Episkin T-Skin™ (коротко, T-Skin или “Кожа полной толщины” или кожа 3D) представляет собой 3D-модель кожи, реконструированную *in vitro*, включающую дерму и эпидермис (модель кожи полной толщины).

Episkin T-Skin™ представляет собой реконструированную *in vitro* кожу, состоящую из эквивалента кожи с фибробластами человека, наложенным на хорошо дифференцированный многослойный эпидермис, имеющий происхождение от нормальных кератиноцитов человека, культивированных на инертном поликарбонатном фильтре.

Модели реконструированной кожи человека *in vitro* ближе с точки зрения морфологических (многослойный эпителий), биохимических и физиологических свойств к тканям человека *in vivo*, и теперь они представляют наиболее многообещающую альтернативу животным, эксплантатам *ex vivo* и погруженным монослоям клеток для оценки эффективности и безопасности продуктов при местном нанесении (Gordon et al. 2015, Zuang V. 2016).

Биологическая значимость и прогностичность этих моделей обусловлены присутствием ткани, организованной из различных слоев живых клеток, которая позволяет оценить продукты при местном нанесении в практически применимых клинических дозах и условиях воздействия. Обработка кожи человека наносимыми местно продуктами, такими как косметические средства, ведет к геномному ответу, который имеет динамический путь и представляет первый клеточный сигнал на уровне транскрипции, отвечающий за каскад событий. 3D-ткани человека представляют собой релевантные системы тестирования для изучения механизма действия и оценки эффективности продукта с учетом как прямого геномного ответа, так и результатов клеточной и перекрестной коммуникации посредством растворимых медиаторов и экспрессии специфических биомаркеров.

I. ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ (не воспалительная) на модели Episkin T-Skin™

В настоящем исследовании гомеостатической модели *in vitro* на модели Episkin T-Skin™ эффективность композиций по изобретению, содержащих гиалуроновую

кислоту (НА) и жизнеспособный или инактивированный бактериальный штамм LPC-S01 DSM 26760, с точки зрения пользы для гомеостаза кожи оценивали для изучения их потенциального применения и эффективности для ухода за кожей.

Задача настоящего исследования заключается в исследовании профиля толерантности кожи к композициям по настоящему изобретению после подвергания воздействию высоких концентраций и в оценке ее эффективности при:

- усилении собственной защиты кожи путем индуцирования антимикробных пептидов,
- стимуляции ответа врожденного иммунитета у кератиноцитов, обновления и дифференцировки эпидермиса,
- индуцирование положительного обновления компартментов эпидермиса и дермы, действующего как агент против старения.

I.1. ЖИЗНЕСПОСОБНЫЙ бактериальный штамм – ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

I.1.1. Анализируемые продукты и контроль.

- Отрицательный контроль (NC): физиологический раствор 0,9% NaCl.
- P1: жизнеспособный штамм LPC-S01 DSM 26760, ресуспендированный в физиологическом растворе;
- P2: водный раствор на основе гиалуроновой кислоты (как в Примере-Б (маска), изложенном выше);
- P3: жизнеспособный штамм LPC-S01 DSM 26760, ресуспендированный в водном растворе на основе гиалуроновой кислоты;

Для приготовления P3 содержимое капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ) лиофилизированного жизнеспособного штамма LPC-S01 DSM 26760 растворяли в 13 мл водного раствора на основе гиалуроновой кислоты.

Для приготовления P1 (только штамм) содержимое капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ) лиофилизированного жизнеспособного штамма LPC-S01 DSM 26760 ресуспендировали в 13 мл физиологического раствора.

I.1.2. Оценка методологии увеличения способности к собственной защите и обновлению клеток

Увеличение способности к собственной защите и обновлению клеток пробиотического штамма LPC-S01 (*Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, жизнеспособного; P1), пробиотического штамма LPC-S01 (жизнеспособного) с

гиалуроновой кислотой (P3) и гиалуроновой кислоты (P2) оценивали на реконструированной *in vitro* 3D-модели кожи полной толщины, которая воспроизводит компартменты дермы и эпидермиса, и следовательно позволяет изучать модификации экстраклеточного матрикса дермы и дифференциацию жизнеспособных слоев кожи (модель “кожи в полную толщину”).

Это исследование направлено на оценку эффекта штамма LPC-S01 DSM 26760, гиалуроновой кислоты и композиции, содержащей штамм LPC-S01 и гиалуроновую кислоту, на активацию иммунного ответа, дифференцировку клеток эпидермиса и обновление клеток дермы. Штамм LPC-S01 DSM 26760, гиалуроновую кислоту и композицию, содержащую штамм LPC-S01-пробиотик и гиалуроновую кислоту, наносили (30 мкл) непосредственно на поверхность 3D-модели кожи, инкубировали в течение 8 часов и затем промывали физиологическим раствором для удаления избытка продукта. До анализа ткани культивировали дополнительно в течение 16 часов для имитации реального 24-часового воздействия маски для лица.

Физиологический раствор использовали в качестве отрицательного контроля (NC).

Следующие параметры анализировали в сравнении с отрицательным контролем (в соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники):

- Гистологический анализ путем трихромной окраски по Массону;
- Экспрессия генов (qRT-PCR) основных биомаркеров защиты кожи (HBD2 и CCL27), врожденного иммунного ответа (TLR2), дифференцировки эпидермиса (KRT14, LOR и IVL), обновления эпидермиса (HAS-2, CD44, Коллаген III, IV и XIII, KGF и EGF);
- Повреждение клеток путем количественной оценки высвобождения аденилаткиназы (коротко, АК) (Toxilight assay).

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

I.1.2.1. Гистоморфологический анализ путем трихромной окраски по Массону

В конце обработки ткани промывали физиологическим раствором и фиксировали в 10% формалине. Срезы тканей окрашивали с помощью набора для трихромной окраски по Массону (Abscam 150686) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для каждого образца 3 микроскопических изображения получали на 3 различных частях среза. Гистологические образцы анализировали с помощью

оптического микроскопа (увеличение 20x и 40x) и оценивали морфологические модификации ткани.

I.1.2.2. Анализ PCR в реальном времени

В конце обработки ткани собирали в буфер для лизиса для выделения РНК и обратной транскрипции с получением кДНК (комплементарная ДНК). Целостность РНК оценивали путем анализа выделенной РНК в 1% агарозном геле: определяли полосы рибосомных 18S и 28S. GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) использовали в качестве эндогенного гена контроля для нормализации начальных количеств. Анализ полученных данных проводили способами, известными специалисту в данной области техники.

I.1.3. Результаты активации способности к собственной защите и обновлению клеток

I.1.3.1. Результаты гистоморфологического анализа после трихромной окраски по Массону.

После инкубации в физиологическом растворе отрицательный контроль (Фиг. 1А) не демонстрировал никаких морфологических и/или структурных изменений ни в эпидермисе, ни в дерме. Распределение коллагеновых волокон было ориентированным и включало фибробласты.

Обработка штаммом LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособным) не индуцировала существенных изменений в структуре эпидермиса и дермы. Коллагеновые волокна и их распределение демонстрировали уменьшенную толщину и уменьшенную плотность волокон по сравнению с отрицательным контролем (Фиг. 1Б).

Обработка гиалуроновой кислотой не индуцировала существенных изменений в структуре эпидермиса и дермы. Коллагеновые волокна демонстрировали уменьшенную плотность по сравнению с отрицательным контролем (Фиг. 2А).

Обработка пробиотическим штаммом LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособным) и гиалуроновой кислотой обладала способностью модифицировать морфологию эпидермиса, в частности роговой слой, который был тоньше, увеличивая процесс дифференциации (Фиг. 2Б).

I.1.3.2. Результаты PCR в реальном времени (qRT-PCR).

В Таблице 1 показаны результаты относительной количественной оценки (RQ) относительно отрицательного контроля, значений, полученных посредством PCR в реальном времени, тканей, обработанных LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособных),

гиалуроновой кислотой и LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособным) с гиалуроновой кислотой.

Таблица 1

Компартмент	Функция	Биомаркер	LPC-S01	Гиалуроновая кислота	Гиалуроновая кислота и LPC-S01
Эпидермис	Защита кожи	Дефензин β 2 человека	5,80	0,59	2,18
		CCL27	1,12	0,87	0,96
	Врожденный иммунный ответ	TLR2	1,94	0,93	1,38
	Дифференциация эпидермиса	Цитокератин 14	1,11	0,96	1,23
		Лорикрин	0,59	1,35	1,68
		Инволюкрин	1,50	0,98	1,30
	Структура эпидермиса	Коллаген XIII	0,91	1,06	0,92
		KGF	0,61	1,08	0,37
		EGF	0,95	1,09	1,61
	Дерма	Обновление клеток, действие против старения, клеточный матрикс	HAS-2	0,53	1,08
CD44			1,09	1,00	1,10
Коллаген III			0,45	0,75	0,33
Коллаген IV			1,00	1,01	0,12

Обработка пробиотиком LPC-S01 DSM 26760 индуцирует увеличение дефензина $\beta 2$ человека (HBD2) и TLR2. Эти данные согласуются с иммуномодуляторными свойствами пробиотика, и они указывают на его способность запускать защиту кожи и усиливать врожденный иммунный ответ кожи.

Обработка гиалуроновой кислотой не может индуцировать модуляцию экспрессии генов-субъектов оценки.

Обработка гиалуроновой кислотой с LPC-S01 DSM 26760 вызывает увеличение экспрессии HBD2 в сравнении с обработкой гиалуроновой кислотой. Наблюдали уменьшение значений для Коллагена III и HAS-2 (как уже наблюдали при обработке только пробиотиком), в то же время наблюдали уменьшение KGF.

В целом, полученные результаты показывают, что при применении пробиотика LPC-S01 DSM 26760 в отдельности он оказывает положительное действие на кожу путем укрепления ее врожденного иммунитета (на основе TLR2 и HBD-2).

Гиалуроновая кислота, нанесенная отдельно, не оказывает положительного действия на кожу; напротив, LPC-S01, введенный в такую же композицию с гиалуроновой кислотой, обладает способностью поддерживать основную активность по усилению врожденной защиты кожи.

I.1.3.4 Результаты по высвобождению аденилаткиназы (Toxilight-анализ).

Уровни аденилаткиназы, высвобождаемой тканями, обработанными продуктами, являющимися объектом исследования, показывают хорошую биосовместимость продуктов через 8 и 16 часов инкубации.

I.1.4. Выводы

Полученные результаты показывают, что обработка гиалуроновой кислотой с LPC-S01 DSM 26760 (живым и жизнеспособным) была наиболее перспективной, демонстрируя положительную эффективность по улучшению процесса дифференциации кожи, обновления кожи и общее укрепление структуры компартмента дермы путем увеличения коллагеновой сети. Следовательно, комбинированное введение гиалуроновой кислоты и пробиотика LPC-S01 DSM 26760 (P3) показало синергический эффект в укреплении структуры дермы, действуя на ключевые факторы дифференцировки и обновления клеток. Этот синергический эффект не был предсказуемым, поскольку введение гиалуроновой кислоты и пробиотика LPC-S01 DSM 26760 по отдельности не показывало существенного эффекта на дифференциацию кожи.

I.2. ИНАКТИВИРОВАННЫЙ бактериальный штамм – ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

I.2.1. Анализируемые продукты и Контроль.

- отрицательный контроль (NC): физиологический раствор 0,9% NaCl;
- P1-i.: инактивированный штамм LPC-S01 DMS 26760, ресуспендированный в физиологическом растворе (10^9 клеток/ткань), используемая концентрация 2 г LPC-S01/мл;
- P2-i.: крем на основе гиалуроновой кислоты (как в Примере-А (крем), изложенном выше);
- P3-i.: инактивированный штамм LPC-S01 DSM 26760, ресуспендированный в креме на основе гиалуроновой кислоты (подобном P2-i.) (10^9 клеток/ткань), используемая концентрация 2 г клеток/мл.

Для приготовления P3-i. содержимое капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ) лиофилизированного инактивированного штамма LPC-S01 DSM 26760 растворяли в креме на основе гиалуроновой кислоты.

Для приготовления P1-i. (только штамм) содержимое капсулы с порошком (приблизительно 8×10^9 КОЕ) лиофилизированного инактивированного штамма LPC-S01 DSM 26760 ресуспендировали в физиологическом растворе.

I.2.2. Инактивация анализируемого бактериального штамма.

Исходный материал: жизнеспособные бактериальные клетки штамма LPC-S01 DSM 26760 в лиофилизированной форме с числом жизнеспособных клеток $2 * 10^{11}$ клеток/г порошка.

В сутки, предшествующие обработке, 2 г порошка взвешивали и ресуспендировали в 4 мл физиологического раствора для получения суспензии 10^{11} бактериальных клеток/мл физиологического раствора. 30 мкл этой суспензии использовали для верификации эффективности бактериальной нагрузки путем подсчета на агаре MRS (Де Ман, Рогоза, Шарп).

В сутки обработки суспензию клеток бактериальных штаммов, приготовленную в физиологическом растворе, инактивировали нагреванием путем инкубирования бактериальной суспензии при 85°C в течение 1 часа. После этого периода бактерии разделяли на 4 тестовых пробирки Эппендорф (каждая по 1 мл, что соответствует 10^{11} бактериальных клеток) и центрифугировали. Затем осадок ресуспендировали в:

- 1 мл физиологического раствора, получая P1-i.

- 1 мл крема на основе гиалуроновой кислоты, получая P3-i.

I.2.3. Методология.

Анализируемые продукты и отрицательный контроль (P1-i., P2-i., P3-i., NC: 15 мкл) наносили непосредственно на поверхность тканей модели T-Skin на 24 часа и 48 часов в условиях гомеостаза. Путем нанесения 15 мкл суспензии P1-i и P3-i. наносили 10^9 бактерий/ткань.

Анализировали следующие параметры в сравнении с необработанным контролем (отрицательный контроль, NC):

- Гистоморфологический анализ с окраской H&E (Гематоксилин & Эозин);
- Экспрессию генов (посредством RT-qPCR) основных биомаркеров защиты кожи (дефензина $\beta 2$ человека (DEFB4)), врожденного иммунного ответа (TLR2, TNF α), дифференциации и обновления эпидермиса (TGMS-1, CCND1, TGF- $\beta 1$).

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

I.2.4. Результаты.

I.2.4.1. Результаты гистоморфологического анализа H&E через 24 часа и 48 часов

Три вертикальных среза ткани (составляющих 3 повторности) получали на каждом гистологическом препарате; получали 5 микроскопических изображений выбранного среза. Для каждой биологической повторности приводили наиболее репрезентативное изображение выбранного вертикального среза. Среднюю толщину рассчитывали на основании 5 микроскопических изображений.

Результаты приведены ниже:

СН через 24 часа (Фиг. 6а):

- Эпидермис: полностью жизнеспособный и с регулярной ламеллярной структурой SC (роговой слой);
- Соединение Дерма-Эпидермис: наблюдали целостность структуры;
- Распределение волокон и коллагена: ориентированы и содержат много фибробластов.

P1-i. через 24 часа (не показано на Фиг.):

- Эпидермис: различия наблюдали в одной и той же повторности, вероятно, связанные с неомогенным распределением; видно много клеток, демонстрирующих метаболическую активацию и пролиферацию; несколько пикнотических ядер; ламеллярная структура SC не выглядит существенно модифицированной;

РЗ-і. через 24 часа (Фиг. 6б):

- Эпидермис: различия наблюдали в одной и той же повторности, вероятно, связанные с негомогенным распределением; видно много клеток, демонстрирующих метаболическую активацию и пролиферацию; мало пикнотических ядер; ламеллярная структура SC (роговой слой) выглядит существенно модифицированной;

- Соединение Дерма-Эпидермис: наблюдали целостность структуры;

- Распределение волокон и коллагена: ориентированные плотные, компактные и включающие много фибробластов.

NC через 48 часов (Фиг. 6в):

- Эпидермис: полностью жизнеспособный и с регулярной ламеллярной структурой SC (роговой слой);

- Соединение Дерма-Эпидермис: наблюдали разъединение и потерю целостности (внутреннюю хрупкость тканей);

- Распределение волокон и коллагена: ориентированы и содержат много фибробластов.

Р1-і. через 48 часов (не показан на Фиг.):

- Эпидермис: наблюдали полностью дифференцированный эпидермис; ткань демонстрирует модифицированный с точки зрения структуры и толщины SC вследствие более высокой степени пролиферации и дифференциации.

РЗ-і. через 48 часов (Фиг. 6г):

- Эпидермис: различия наблюдали в одной и той же повторности, вероятно, связанные с негомогенным распределением; видно много клеток, демонстрирующих метаболическую активацию, и они пролиферируют; мало пикнотических ядер; ламеллярная структура SC (роговой слой) выглядит модифицированной вследствие более высокой степени пролиферации;

- Соединение Дерма-Эпидермис: наблюдали целостность структуры;

- Распределение волокон и коллагена: ориентированы и содержат много фибробластов; более плотные и компактные по сравнению с отрицательным контролем.

Приведенные выше данные показывают, что композиция РЗ-і. (инактивированный штамм и НА) действует через более короткое время и с большей эффективностью, чем композиция Р1-і (только инактивированный штамм), принимая во внимание, что после нанесения на ткань РЗ-і через 24 часа ламеллярная структура

SC (роговой слой) выглядит модифицированной, в то время как после нанесения P1-i. необходимо ждать 48 часов до наблюдения модификации ламеллярной структуры SC.

I.2.4.2. Результаты PCR в реальном времени

I.2.4.2.1. Результаты PCR в реальном времени через 24 часа

На Фиг. 7 показаны результаты экспрессии генов (qRT-PCR) через 24 часа (RQ, рассчитанный для NC через 24 часа равен 1; RQ менее 0,5 – понижающая регуляция, RQ более 2 – повышающая регуляция).

Результаты относительной количественной оценки (RQ) экспрессии генов (qRT-PCR), полученные для тканей, обработанных анализируемыми композициями (P1-i., P2-i., P3-i.) в течение 24 часов, суммированы на Фиг. 7 ниже. Результаты выражены относительно отрицательного контроля (NC через 24 часа равен 1; RQ менее 0,5 – понижающая регуляция, RQ более 2 – повышающая регуляция).

В целом, не полностью гомогенное нанесение анализируемых композиций приводит к высокой биологической вариабельности между тремя повторностями.

Через 24 часа обработки:

- Анализируемый инактивированный пробиотический штамм, в отдельности (P1-i) или включенный в композицию, содержащую НА (P3-i), индуцировал повышающую регуляцию дефензина $\beta 2$ (DEFB4) человека. Эти данные согласуются с наблюдаемыми иммуномодулирующими свойствами жизнеспособного штамма LPC-S01 DMS 26760, изложенными в разделе I.1.3.1., и они указывают на его способность запускать защиту кожи даже в условиях отсутствия жизнеспособности. Следовательно, эта иммуномодуляторная активность может коррелировать с наружно расположенными элементами бактериальной клеточной стенки.

- Композиция, содержащая только НА (P2-i.) не модулировала дефензин $\beta 2$ (DEFB4) человека: этот результат подтверждает, что повышающая регуляция DEFB4 при обработке P3-i. (штамм и НА) связана исключительно с присутствием бактерии.

- композиция P3-i. (штамм и НА) индуцировала повышающую регуляцию дефензина $\beta 2$ человека (DEFB4) через 24 часа в большей степени (хотя не существенно) по сравнению с P1-i. (только штамм). Количественная оценка существенной регуляции TNF α выявила, что индуцирование воспалительного ответа, вероятно, является следствием иммунного распознавания бактерий на поверхности кожи. Поскольку этот эффект не наблюдали в ткани, обработанной P2-i. (только НА), этот результат может

быть связан с высокой дозой штамма LPC-S01 DMS 26760, включенной в композицию P3-i.

I.2.4.2.2. Результаты PCR в реальном времени через 48 часов

Подтвердили индуцирование дефензина $\beta 2$ (DEFB4) человека анализируемым инактивированным бактериальным штаммом (как в P1-i., так и в P3-i.), со значениями выше, чем в контрольной точке 24 часа (раздел I.2.4.2.1.), что указывает на стабильный биологический ответ и укрепление защиты кожи, приводящие к эффективному механизму защиты.

I.2.5. Выводы.

В гомеостатической (невоспалительной) модели композиция по изобретению P3-i. (инактивированный штамм и HA), содержащая комбинацию инактивированного бактериального штамма LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновой кислоты, была хорошо переносимой на 3D-модели кожи и обладала способностью стимулировать защиту организма и процессы дифференцировки клеток по сравнению с индивидуальными компонентами и/или отрицательным контролем.

В частности, композиция по изобретению P3-i. (инактивированный штамм и HA) достигала уровней эффективности через более короткое время по сравнению с бактериальным штаммом не в комбинациях с гиалуроновой кислотой (P1-i.).

II. ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ на модели Episkin T-Skin™

Способность композиций по изобретению, содержащих бактериальный штамм LPC-S01 DMS 26760 (жизнеспособный или инактивированный) и гиалуроновую кислоту, уменьшать повреждения, вызванные UV излучением, оценивали на полной 3D-модели кожи, реконструированной *in vitro*, которая воспроизводит компартменты дермы и эпидермиса (модель T-Skin™), таким образом позволяя исследовать изменения экстраклеточного матрикса дермы и дифференциации жизнеспособных слоев (модель кожи полной толщины).

Указанную оценку проводили в соответствии с двумя моделями, воспалительной моделью А (предобработка на неповрежденной ткани) и воспалительной моделью Б (пред- и пост-обработка на поврежденной ткани), описанными ниже.

II.A. ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ А для жизнеспособного или инактивированного бактериального штамма

II.A.1. Анализируемые продукты и Контроли.

- P1: жизнеспособный LPC-S01 DMS 26760, ресуспендированный в физиологическом растворе,
- P2: раствор на основе гиалуроновой кислоты (см. I.1.1. Маска);
- P3: жизнеспособный LPC-S01 DMS 26760, ресуспендированный в растворе на основе гиалуроновой кислоты,
- P1-i.: инактивированный LPC-S01 DMS 26760 и ресуспендированный в физиологическом растворе,
- P2-i.: раствор на основе гиалуроновой кислоты (см. I.1.1. Маска);
- P3-i.: инактивированный LPC-S01 DMS 26760, ресуспендированный в растворе на основе гиалуроновой кислоты,
- Положительный контроль (PC): ткань, обработанная физиологическим раствором 0,9% NaCl, подвергнутая эксфолиации и действию UV излучения.
- Отрицательный контроль (NC): ткань, обработанная физиологическим раствором 0,9% NaCl, не подвергнутая действию UV излучения.

P1 (только жизнеспособный штамм) и P3 (жизнеспособный штамм и HA) получали путем ресуспендирования содержимого капсулы с лиофилизированным бактериальным штаммом ($\text{КОЕ } 8 \times 10^9$) в 13 мл физиологического раствора, содержащего гиалуроновую кислоту, соответственно.

P1-i. (только инактивированный штамм) и P3-i. (инактивированный штамм и HA) получали путем ресуспендирования содержимого капсулы с лиофилизированным бактериальным штаммом ($\text{КОЕ } 8 \times 10^9$) в физиологическом растворе и инкубировали при 85°C в течение 1 часа. После этого периода бактерии центрифугировали и осадок ресуспендировали в 13 мл физиологического раствора (или крема) на основе гиалуроновой кислоты, соответственно.

II.A. Способ оценки уменьшения UV-повреждения

Уменьшение UV-повреждения пробиотическим штаммом LPC-S01 DSM 26760 (живым и жизнеспособным или инактивированным) оценивали на модели “кожа полной толщины”, как описано выше. В этом исследовании рассматривали эффект штамма LPC-S01, гиалуроновой кислоты и композиции, содержащей штамм LPC-S01 DSM 26760 и гиалуроновую кислоту, на морфологию тканей, окрашенных гематоксилином-эозином, и активацию инфламмосомы в ответ на UV-излучение. Штамм LPC-S01 DSM 26760, гиалуроновую кислоту и композицию, содержащую пробиотический штамм LPC-S01 DSM 26760 и гиалуроновую кислоту, наносили

непосредственно на поверхность 3D-модели кожи, инкубировали в течение ночи и затем промывали физиологическим раствором для удаления избытка продукта (стадия предобработки). Ткань слегка подвергали эксфолиации и затем подвергали действию 1 MED (минимальная эритемогенная доза) UV для имитации нормального воздействия солнца. Активацию воспаления тестировали через 4 и 24 часа после воздействия UV-лучей. Ткань, обработанную физиологическим раствором и подвергнутую действию UV-лучей, использовали в качестве положительного контроля. Ткань, обработанную физиологическим раствором и не подвергнутую действию UV, использовали в качестве отрицательного контроля.

Эффективность анализируемых композиций по уменьшению повреждения, вызванного UV-лучами, оценивали в соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники, посредством:

- метода иммуноокрашивания на NFκB;
- гистоморфологического анализа с окрашиванием гематоксилином/эозином (H&E); и
- методом количественной оценки IL-1β (только на жизнеспособном штамме).

II.A.3. Результаты уменьшения UV-повреждения (Воспалительная модель A)

II.A.3.1. Результаты иммуноокрашивания NFκB

На Фиг. 3 обобщены результаты количественной оценки транслокации NFκB через 4 часа после воздействия UV-лучами (анализируемые композиции, содержащие жизнеспособные штаммы).

Через 4 часа после облучения положительный контроль (PC) демонстрировал большое число транслокаций NFκB, особенно в супрабазальном слое эпидермиса.

Обработки LPC-S01 DSM 26760 (P1), штаммом LPC-S01 DSM 26760 с гиалуроновой кислотой (P2) и гиалуроновой кислотой (P3) существенно ингибировали транслокацию NFκB в ядро по сравнению с положительным контролем.

Следовательно, обработка пробиотиком LPC-S01 DSM 26760, LPC-S01 DSM 26760 с гиалуроновой кислотой и гиалуроновой кислотой показала способность предупреждать активацию воспаления путем ингибирования транслокации NFκB в ядро в клетках, подвергнутых воздействию UV-лучей.

Дополнительно, в Таблице 2 показаны полуколичественные данные по ядерной транслокации NFκB, определенные для времени предобработки 16 часов (продолжительная), для анализируемых композиций, содержащих жизнеспособные

штаммы (P3) или инактивированные штаммы (P3-i), и оценке параметров через 4 часа после воздействия UV-лучей, полезных для оценки эффекта продолжительной обработки.

Биологическую релевантность и воспроизводимость указанной модели инфламмосомы (воздействие UV 1 MED, минимальная эритемогенная доза) подтверждали по увеличению транслокации NFkB в ядро клетки в облученных образцах (положительный контроль) по сравнению с необлученными образцами (отрицательный контроль).

Относительное увеличение транслокации NFkB (разница в процентах) в исследовании композиции P3-i с инактивированными штаммами (+ 70,7%, w = 0,01) сравнимо с таковым, количественно оцененным в исследовании с композицией P3 с жизнеспособными штаммами (+83,7, w = 0,01).

Таблица 2

		Транслокация NFkB (Среднее±стандарт.отклон.)	
Отрицательный контроль	NC	11,0±2,1	25,7±8,3
Положительный контроль	PC	18,8±4,8 (+70,7% w=0,01)	47,2±6,2 (+83,7 w=0,01)
Обработка		16 ч (ON)	16 ч (ON)
Штамм (жизнеспособный) + НА	P3	-	29,6 ± 6,3 (-37,3%w=0,00)
Штамм (неактивный) + НА	P3-i	16,0±3,2 (+14,8)	-

Более того, через 24 часа P3 демонстрировал уменьшение содержания NFkB в цитоплазме по сравнению с положительным контролем (данные не оценивали для P3-i).

II.A.3.2. Гистоморфологические результаты по окрашиванию H&E.

На Фиг. 4 и 5 показаны ткани, обработанные физиологическим раствором (положительный контроль) (А), пробиотиком LPC-S01 DSM 26760 (Б), гиалуроновой кислотой (В) и LPC-S01 DSM 26760 (жизнеспособным) и гиалуроновой кислотой (Г), соответственно, через 4 и 24 часа после воздействия ультрафиолетовых лучей (гистоморфология с окрашиванием H&E).

Как можно видеть как на Фиг. 4, так и на Фиг. 5, обработка гиалуроновой кислотой и обработка пробиотиком LPC-S01 DSM 26760 не способна уменьшать повреждение, индуцированное UV-лучами. В частности, признаки солнечных ожогов, индуцированных UV-лучами, видны в базальном слое и в шиповатом слое эпидермиса. Более того, соединение дерма-эпидермис повреждено UV-лучами, и эпидермис не полностью присоединен к дерме, это признак измененной структуры кожи (Фиг. 4А, 4Б, 5А и 5Б).

Обработка гиалуроновой кислотой и пробиотиком LPC-S01 DSM 26760 способна уменьшать повреждение, индуцированное UV через 4 и 24 часа после индуцирования повреждения. В частности, структура как дермы, так и эпидермиса является более компактной по сравнению с обработкой гиалуроновой кислотой и пробиотиком LPC-S01 DSM 26760, введенными по отдельности. Более того, структура соединения дерма-эпидермис лучше поддерживается, что способствует лучшей адгезии эпидермиса и дермы (Фиг. 4Г и 5Г).

Этот синергический эффект совместного введения гиалуроновой кислоты и пробиотика LPC-S01 DSM 26760 не был предсказуемым, принимая во внимание, что ни гиалуроновая кислота в отдельности, ни пробиотик в отдельности не обладали способностью уменьшать “разъединение” эпидермиса и дермы, и, следовательно, они не могли поддерживать физиологическую структуру кожи.

II.A.3.3. Результаты по количественной оценке IL-1 β

IL-1 β количественно оценивали через 4 часа для композиции по изобретению P3, содержащей жизнеспособный штамм и гиалуроновую кислоту, в сравнении с отрицательным контролем и положительным контролем (Таблица 3). Эти результаты нельзя рассматривать как количественные данные, принимая во внимание, что сигнал был ниже порога определения набора (порог 3,91 пг/мл). Результаты приведены, чтобы показать общую тенденцию.

Таблица 3

	NC	PC	P3a
IL-1 β (пг/мл)	2,12	2,74	1,84

II.A.4. Выводы

Экспериментальную модель T-skinTM (кожа полной толщины) на основе воспалительных путей, индуцированных UV-A и UV-B (доза 1 MED) использовали для оценки эффективности композиций по изобретению P3 и P3-i, содержащих бактериальный штамм LPC-S01 DMS 26760 (жизнеспособный или инактивированный, соответственно) и гиалуроновую кислоту, при применении до индуцирования стресса инфламмосомы (предобработка).

Композиции по изобретению P3 (жизнеспособный штамм и HA) и P3-i (инактивированный штамм и HA) демонстрировали хорошую эффективность по уменьшению транслокации NFκB при продолжительной предобработке (16 часов).

Более того, композиция по изобретению P3 (жизнеспособный штамм и HA) демонстрировала хорошую способность к защите структуры соединения дерма-эпидермис от UV-лучей в гистоморфологическом исследовании с окрашиванием H&E.

П.Б. ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ Б для ИНАКТИВИРОВАННОГО ШТАММА

Экспериментальную модель T-skinTM (кожа полной толщины) на основе воспалительных путей, индуцированных UV-A и UV-B (доза 1 MED) использовали для оценки эффективности композиции по изобретению P3-i, содержащей инактивированный бактериальный штамм LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновую кислоту, нанесенной на поврежденную ткань до и после индуцирования стресса инфламмосомы (предобработка или пост-обработка относительно UV-облучения).

Анализируемые композиции (см. П.Б.1) оценивали с использованием высокой концентрации анализируемого инактивированного бактериального штамма (10^7 или 10^9 клеток/ткань) для изучения их потенциального применения и эффективности на модели инфламмосомы T-Skin в соответствии с 2 протоколами:

Б.І. ПРОТОКОЛ ПРЕДОБРАБОТКИ: T-skin, поврежденную путем механического напряжения поверхности эпидермиса и предобработанную в течение 45 минут или 4 часов исследуемыми композициями, затем подвергали облучению UV-A и UV-B (1 MED). Через 4 часа после указанного облучения (после инкубации) ткани собирали для анализа.

Б.ІІ. ПРОТОКОЛ ПОСТ-ОБРАБОТКИ: T-skin, поврежденную путем механического напряжения поверхности эпидермиса и подверженную облучению UV-A и UV-B (1 MED), затем обрабатывали в течение 45 минут или 4 часов исследуемыми композициями и немедленно собирали для анализа.

Задача этого исследования заключалась в изучении эффективности анализируемого инактивированного бактериального штамма в высоких дозах (отдельно или в смеси с НА), по модулированию активации и транслокации NF κ B в ядро.

II.B.1. Анализируемые композиции и Контроли.

- P3-i.-10⁹: инактивированный LPC-S01 DMS 26760 (10⁹ клеток/ткань) ресуспендированный в креме на основе гиалуроновой кислоты (см. I.2.1.), что соответствует 30% конечной композиции;

- P3-i.-10⁷: инактивированный LPC-S01 DMS 26760 (10⁷ клеток на ткань) ресуспендированный в креме на основе гиалуроновой кислоты (см. I.2.1.), что соответствует 0,03% конечной композиции;

- Положительный контроль (PC): ткань, обработанная физиологическим раствором 0,9% NaCl, подвергнутая эксфолиации и действию UV излучения.

- Отрицательный контроль (NC): ткань, обработанная физиологическим раствором 0,9% NaCl, не подвергнутая действию UV-облучения.

P3-i. (инактивированный штамм и НА) получали путем ресуспендирования содержимого капсулы с лиофилизированным бактериальным штаммом (КОЕ 10⁹) в физиологическом растворе и инкубировали при 85°C в течение 1 часа. После этого периода бактерии центрифугировали и осадок ресуспендировали в 13 мл крема на основе гиалуроновой кислоты.

II.B.2. Дизайн исследования

II.B.2.1. Изготовление анализируемых композиций

Анализируемый инактивированный штамм в лиофилизированной форме в количестве 2 * 10¹¹ клеток/г порошка взвешивали и ресуспендировали в подходящих растворителях следующим образом:

- 2 г в 4 мл крема на основе НА (см. I.2.1.), получая P3-10⁹. 10⁹ бактерий/ткани наносили посредством нанесения 15 мкл суспензий.

- 0,02 г в 4 мл крема на основе НА (см. I.2.1.), получая P3-10⁷. 10⁷ бактерий/ткани наносили посредством нанесения 15 мкл суспензий.

II.B.2.2. Индуцирование и обработка инфламмосомы T-skin

II.B.2.2.1. Протокол предобработки

Экспериментальный дизайн обобщен на Фиг. 8: в сутки эксперимента ткани повреждали путем легкого механического напряжения (n прикосновений устройством Algerbrush равно 2) и обрабатывали 15 мкл анализируемых композиций (P3-i.), которые

наносили непосредственно и равномерно на ткани T-Skin™ и инкубировали в течение 45 минут или 4 часов.

Затем ткани облучали 1 MED (эквивалентно 0,025 Дж/см²) в PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с помощью солнечного имитатора Oriel 1 кВт с ксеноновой дуговой лампой и интенсивностью излучения WG320 [мВт/см²] эритемным фильтром, (0,035 мВт/см², согласно калибровочному сертификату n° 16121, выпущенному Opto.Cal GmbH). После индуцирования инфламмосомы ткани подвергали пост-инкубации в условиях гомеостаза в течение 4 часов и затем фиксировали в формалине и заливали парафином (FFPE) для иммуноокрашивания в отношении NFκB. Также ткани собирали для дальнейшего анализа посредством RT-qPCR. Носители собирали и хранили при -20°C.

II.B.2.2.2. Протокол пост-обработки

Экспериментальный дизайн обобщен на Фиг. 9: в сутки эксперимента ткани повреждали путем легкого механического напряжения (n прикосновений устройством Algerbrush равно 2) и облучали 1 MED (эквивалентно 0,025 Дж/см²) в PBS. После индуцирования инфламмосомы ткани обрабатывали 15 мкл анализируемых композиций и инкубировали в течение 45 минут или 4 часов. Немедленно после обработки ткани собирали и фиксировали в формалине для иммуноокрашивания в отношении NFκB. Также ткани собирали для дальнейшего анализа RT-qPCR.

II.B.3. Результаты иммуноокрашивания NFκB

В Таблице 4 ниже показаны результаты по транслокации NFκB (выраженные как общее число ядер, выявленных в 3 биологических повторностях) в отрицательном контроле относительно положительных контролей в каждом протоколе. Как изложено в Таблице 4, индуцирование в модели инфламмосомы было подтверждено увеличением транслокации NFκB в ядро клетки в облученных образцах относительно отрицательного контроля.

Однако в этой партии T-skin наблюдали более раннюю активацию NFκB после облучения, хотя транслокацию наблюдали в каждой контрольной точке. В частности, самое сильное индуцирование NFκB наблюдали через 45 минут после облучения.

Принятые протоколы основаны на считывании после UV-облучения в модели пост-обработки и считывании после пост-инкубации в модели предобработки, учитывая, что задача заключается в оценке эффективности продуктов в восстановлении после острого воспалительного процесса.

Таблица 4

Отрицательный контроль	0
Положительный контроль 45 мин предобработки плюс 4 часа после UV-инкубации	7
Положительный контроль 4 часа предобработки плюс 4 часа UV-инкубации	5
Положительный контроль 45 минут после UV-облучения	9
Положительный контроль 4 часа после UV-облучения	4

А) 45-минутная предобработка

В Таблице 5 полуколичественный анализ ядерной транслокации NFкВ (выраженной как общее число ядер, выявленных во всех биологических повторностях) представлен для 45-минутной предобработки с 4-часовой инкубацией после UV-облучения.

Таблица 5.

Отрицательный контроль	NC	0
Положительный контроль	PC	7
инактивированный штамм 10^9 и НА*	P3-i.(10^9)	1
инактивированный штамм 10^7 и НА*	P3-i.(10^7)	5

* композиция по изобретению

Б) 4-часовая предобработка

В Таблице 6 полуколичественный анализ транслокации NFкВ в ядро (выраженный как общее число ядер, выявленных во всех биологических повторностях) представлен для 4-часовой предобработки с 4-часовой инкубацией после UV-облучения.

Таблица 6.

Отрицательный контроль	NC	0
Положительный контроль	PC	5
инактивированный штамм 10^9 и НА*	P3-i.(10^9)	1
инактивированный штамм 10^7 и НА*	P3-i.(10^7)	2

* композиция по изобретению

Анализ результатов из Таблицы 5 и 6:

- Когда ее применяли для предобработки, композиция P3-i., содержащая инактивированный штамм LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновую кислоту, обладала способностью уменьшать транслокацию NFκB в ядро, что указывает на превентивную эффективность по защите кожи от воспалительного стресса, индуцированного UV-лучами.

- При концентрации штамма 10^9 в модели 45-минутной предобработки композиция P3-i. (инактивированный штамм и HA) обладала способностью сильно уменьшать транслокацию NFκB в ядро, что указывает на синергическое и/или высокоэффективное действие между инактивированным штаммом LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновой кислотой.

- Ответ ткани на предобработку композициями P3-i.(10^9) и P3-i.(10^7) с двумя различными концентрациями инактивированного LPC-S01 DMS 26760 позволяет предположить механизм доза-ответ: меньше NFκB-положительных ядер выявляли при увеличении концентраций штамма в композиции.

В) 45-минутная пост-обработка

В Таблице 7 представлен полуколичественный анализ транслокации NFκB в ядро (выраженной как общее число ядер, выявленных во всех биологических повторностях) для 45-минутной предобработки после UV-облучения.

Таблица 7.

Отрицательный контроль	NC	0
Положительный контроль	PC	9
инактивированный штамм 10^9 и HA *	P3-i.(10^9)	3
инактивированный штамм 10^7 и HA *	P3-i.(10^7)	0

* композиция по изобретению

Д) 4-часовая пост-обработка

В Таблице 8 представлен полуколичественный анализ транслокации NFκB в ядро (выраженной как общее число ядер, выявленных во всех биологических повторностях) для 4-часовой предобработки после UV-облучения.

Таблица 8.

Отрицательный контроль	NC	0
Положительный контроль	PC	4

инактивированный штамм 10^9 и НА*	P3-i.(10^9)	1
инактивированный штамм 10^7 и НА*	P3-i.(10^7)	9

* композиция по изобретению

- Композиция P3 (инактивированный штамм и НА) продемонстрировала быстрое и эффективное восстановление исходных уровней NFKB, особенно на коротком сроке (когда воспалительный ответ находится на своем максимальном уровне), что позволяет предположить синергию/эффект улучшения для комбинации инактивированного штамма LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновой кислоты в восстановлении гомеостаза воспаленных тканей.

П.Б.4. Вывод

Эти результаты подтверждают, что композиция P3-i, содержащая комбинацию инактивированного LPC-S01 DMS 26760 и гиалуроновой кислоты, является эффективной как в условиях гомеостаза (см. раздел I.2.), так и в условиях воспаления кожи (например, вызванного UV-излучением), особенно в острой фазе воспаления, принимая во внимание, что она особенно эффективна в краткосрочном периоде развития воспаления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (2)

Оценка адгезии *Cutibacterium acnes* DSM 1897 в 3D-модели “Кожи полной толщины” в присутствии композиции по изобретению (штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и гиалуроновая кислота)

1. Задача исследования.

Задача данного исследования заключалась в оценке способности пробиотического штамма *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, в отдельности и/или в комбинации с гиалуроновой кислотой (НА), бороться с адгезией *C. acnes in vitro* в модели “кожа полной толщины”.

Cutibacterium acnes (коротко *C. acne*, также известная как *Propionibacterium acnes* или *P. acne* (Douglas et Günter, 1946)) представляет собой медленно растущую грамположительную анаэробную бактерию, связанную с определенными кожными заболеваниями, такими как угревая сыпь; также она может быть причиной блефарита и эндофтальмита.

Для оценки ситуаций различных возможных инфекций выполняли модель конкуренции и исключения на основе адаптации метода, описанного Coman et al. в 2015 г.

2. Экспериментальный дизайн.

Штамм *C. acnes* DSM 1897 использовали для имитации инфекции в 3D-модели “Кожі полной толщины”, приобретенной, в количестве всего 30 вставок, от Phenion (Henkel).

Тесты проводили, рассматривая разные условия обработки, перечисленные ниже:

1) без обработки, для оценки эффективной адгезивной способности *C. acnes* DSM1897 в 2 моделях исключения и конкуренции;

2) профилактическая или сопутствующая обработка *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 в течение 24 часов;

3) профилактическая или сопутствующая обработка 0,5% гиалуроновой кислотой в течение 24 часов (Sigma-Aldrich 41897);

4) профилактическая или сопутствующая обработка гомогенной смесью гиалуроновой кислоты и *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 в течение 24 часов;

5) профилактическая или сопутствующая обработка бензоилпероксидом в течение 24 часов (Benzac 10%, положительный контроль).

Получали суспензию штамма *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и 50 мкл суспензии приводили в контакт с поверхностью вставки.

Получали суспензию 0,5% гиалуроновой кислоты, и 50 мкл суспензии приводили в контакт со вставками.

Кроме того, 50 мкл штамма *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 смешивали с 0,25 мг гиалуроновой кислоты для получения комбинированного препарата пробиотика и гиалуроновой кислоты при такой же концентрации гиалуроновой кислоты (0,5%) и при такой же начальной нагрузке, используемой в тестах с индивидуальными веществами.

50 мкл геля Benzac 10% (бензоилпероксид) приводили в контакт со вставками в качестве положительного контроля.

Все 5 условий, перечисленных выше, тестировали в двух повторностях, и 10 вставок инкубировали в течение 24 часов при 37°C в присутствии CO₂.

2.а. Проведение теста исключения

Тест исключения, предложенный для предобработки вставок пробиотическим штаммом (или гиалуроновой кислотой, или смесью того и другого), последующее инфицирование патогенном и последующая верификация возможного уменьшения % адгезии патогена к вставке относительно идеальных условий инфицирования (модель превентивной обработки пробиотиком *in-vitro*).

2.б. Проведение теста конкуренции

Тест конкуренции, предложенный для сопутствующей обработки вставок пробиотическим штаммом (или гиалуроновой кислотой, или смесью того и другого) и патогеном и последующей верификации возможного уменьшения % адгезии патогена и вставки относительно идеальных условий инфицирования (модель пробиотической обработки во время курса инфекции *in vitro*).

3. Результаты

3.1 Тест исключения

На Фиг. 10 показано уменьшение жизнеспособности патогена *S. acnes* DMS1897, выраженное в Log₁₀ КОЕ, в то время как в Таблице 9 показана та же ситуация в форме процента уменьшения (%) жизнеспособности патогенов в различных условиях тестирования.

Таблица 9

Условия тестирования	% уменьшения патогена
LPC-S01	19,1
LPC-S01 и гиалуроновая кислота	19,5
Гиалуроновая кислота	0,8
Benzac	17,0

Как видно из приведенных результатов, обработки, проведенные с Benzac 10%, LPC-S01 DSM 26760 и комбинацией LPC-S01 DSM 26760 в присутствии 0,5% гиалуроновой кислоты уменьшали число жизнеспособных *S. acnes* DSM1897 на приблизительно 1,0-1,4 Log₁₀, что соответствует приблизительно 20%-ному уменьшению жизнеспособности патогена. Кажется, что обработка только 0,5% гиалуроновой кислотой не способна уменьшить жизнеспособность патогена в какой-либо степени.

3.2. Тест конкуренции

На Фиг. 11 и в Таблице 10 показаны графики подсчета среднего числа жизнеспособных клеток на вставке, полученного для двух повторностей для каждого тестируемых условий, выраженного в логарифмах уменьшения \log_{10} КОЕ *C. acnes* DSM1897, и в форме процента уменьшения, полученного в тесте конкуренции.

Таблица 10

Условия тестирования	% уменьшения патогена
LPC-S01	18,0
LPC-S01 и гиалуроновая кислота	17,3
Гиалуроновая кислота	0,0
Benzac	15,3

На основании представленных данных подтверждено, что обработки, проведенные с Benzac 10%, LPC-S01 DSM 26760 и комбинацией LPC-S01 DSM 26760 в присутствии 0,5% гиалуроновой кислоты, уменьшают число жизнеспособных *C. acnes* DSM1897 на 1,0-1,3 \log_{10} КОЕ. Что касается теста исключения, кажется, что обработка только 0,5% гиалуроновой кислотой не способна уменьшать жизнеспособность патогена.

4. Заключение

Все проведенные тесты *in vitro* демонстрируют эффективность положительного контроля Benzac 10% в сдерживании инфекции *C. acnes* с % уменьшения жизнеспособности популяции патогена на 15-23%.

Тесты исключения и конкуренции показали, что обработки, проведенные с комбинацией LPC-S01 и 0,5% гиалуроновой кислоты (композиции по изобретению) уменьшают инфекцию *C. acnes* DSM1897 приблизительно на 18-19%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая

смесь М, содержащую (I) бактериальный штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 и депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) с номером доступа DSM 26760, и (II) гиалуроновую кислоту или ее соль; или, альтернативно, состоящую из них,

и возможно содержащая по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или по меньшей мере один приемлемый эксципиент фармацевтического, или косметического, или пищевого класса.

2. Композиция по п. 1, где указанный бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 представляет собой жизнеспособный бактериальный штамм.

3. Композиция по п. 1, где указанный бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 представляет собой термически инактивированный, или тиндализованный, или обработанный ультразвуком, или обработанный гамма-излучением бактериальный штамм, предпочтительно термически инактивированный.

4. Композиция по любому из п.п. 1-3, где указанная композиция приготовлена для местного применения на коже, предпочтительно в форме крема или маски.

5. Композиция по любому из п.п. 1-3, где указанная композиция приготовлена для перорального применения, предпочтительно в форме суспензии или препарата для образования суспензии для немедленного применения.

6. Композиция по любому из п.п. 1-5 для применения в качестве лекарственного средства.

7. Композиция по любому из п.п. 1-5 для применения в способе профилактического и/или куративного лечения воспаления и/или инфекции кожи, или ассоциированного заболевания или симптома, где указанное лечение включает введение композиции нуждающемуся в этом субъекту.

8. Композиция для применения по п. 7, где указанные воспаление и/или инфекция кожи индуцированы UV(ультрафиолетовыми)-лучами.

9. Композиция для применения по п. 7, где указанные воспаление и/или инфекция кожи индуцированы патогенными агентами, предпочтительно *Cutibacterium*

acnes или *Propionibacterium acnes*.

10. Композиция по любому из п.п. 1-5 для применения в способе профилактического и/или куративного лечения повреждения, вызванного или индуцированного в коже:

- UV-излучением; и/или

- неблагоприятными для кожи погодными условиями, предпочтительно солнечными лучами, холодом или ветром; и/или

- вредными для кожи условиями жизни, предпочтительно загрязнением, курением или употреблением алкоголя;

и/или ассоциированного заболевания или симптома, где указанная обработка включает введение композиции нуждающемуся в этом субъекту.

11. Композиция для применения по любому из п.п. 7-10, где указанные воспаление и/или инфекция кожи или указанное повреждение, индуцированное в коже, или указанные ассоциированные заболевания или симптомы выбраны из группы, включающей острые или хронические воспаление или инфекцию кожи; бактериальную, или вирусную, или грибковую инфекцию кожи; абсцесс; гнойник; эмпиему, флегмону, панариций, фурункул, карбункул, гнойный гидраденит, рожистое воспаление, псориаз, атопический дерматит, угревую сыпь, острый или хронический дерматоз, розацеа, купероз, эритему, красноту кожи, ожог, солнечный ожог, реактивацию орального герпеса, пролежни, язвы, трещины на коже, фистулу, открытое поражение кожи, рану, синяк, ссадину, экхимоз, гематому, эксфолиацию, кератоз, гиперкератоз, келоид, или, альтернативно, состоящей из них.

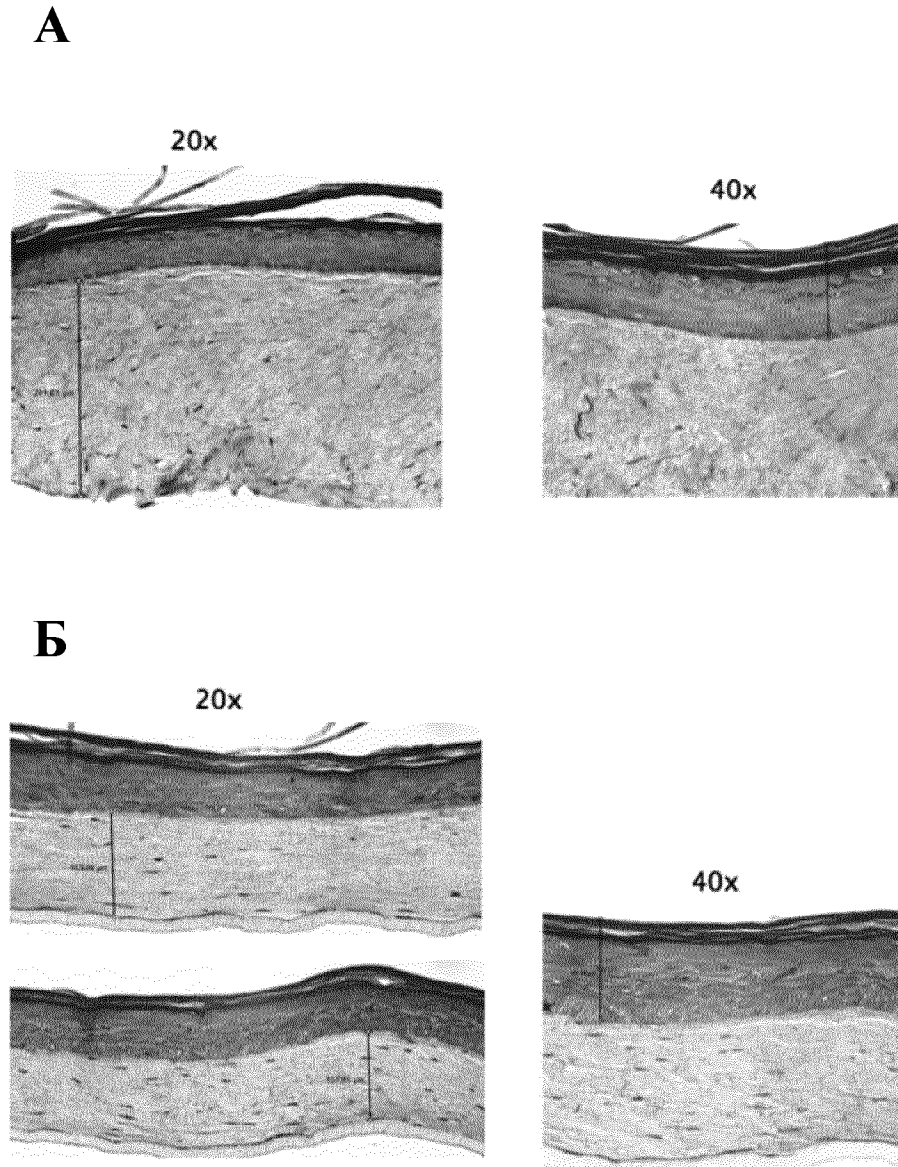
12. Местное косметическое применение на коже композиции по любому из п.п. 1-4, где указанное применение предназначено:

- для поддержания гомеостаза кожи и/или

- в качестве агента против старения кожи.

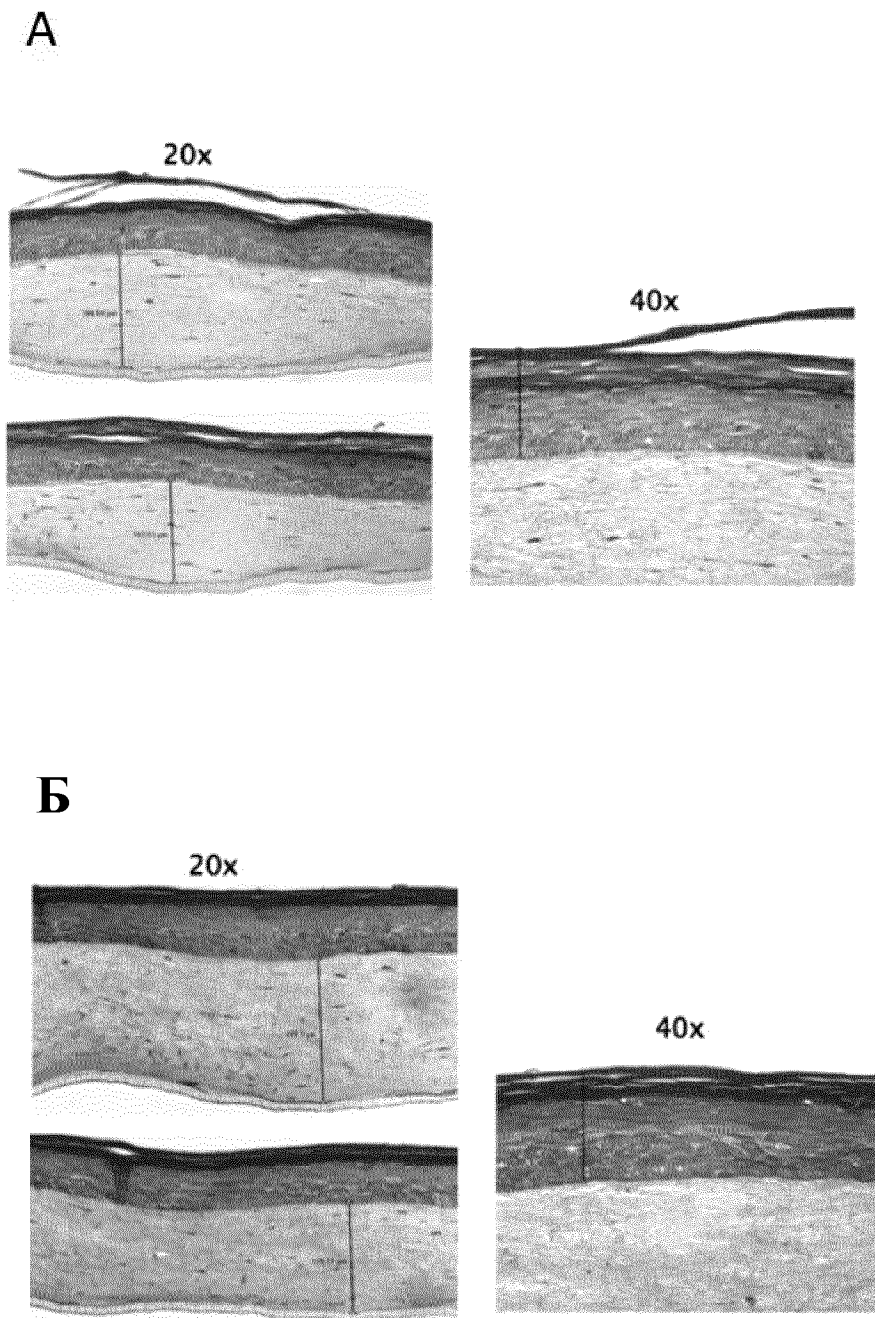
13. Косметическое применение по п. 12, где указанная композиция предназначена для местного косметического применения для лечения морщин, потери эластичности кожи или солнечного эластоза, сухой кожи, грубой кожи, фотостарения, красноты кожи, наличия расширенных капилляров на щеках, носу и/или ушах, веснушек, аномальной или неравномерной пигментации или гиперпигментации кожи.

1 Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи



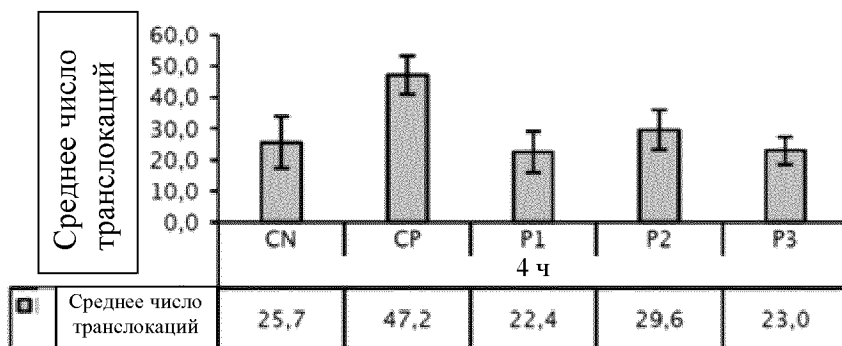
Фиг. 1

2 Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи



Фиг. 2

3 Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи



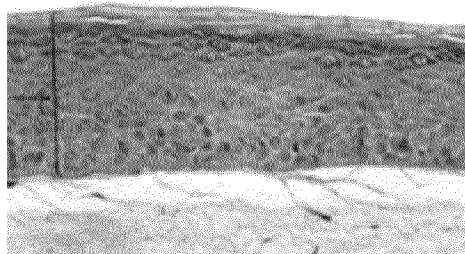
Фиг. 3

4 Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи

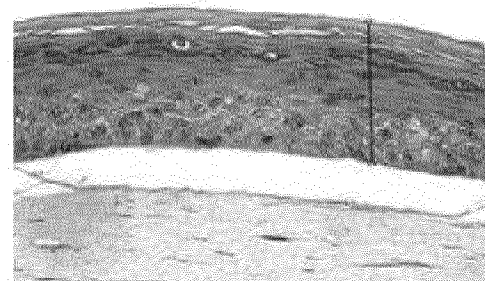
А



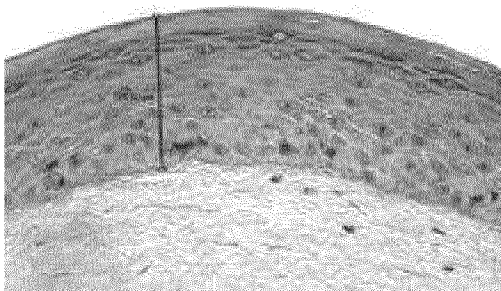
Б



В



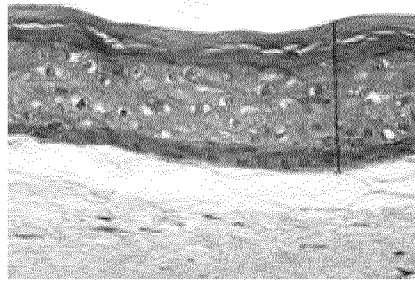
Г



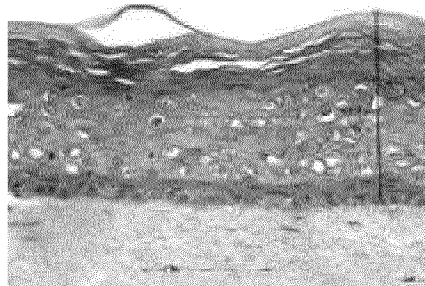
Фиг. 4

5
Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи

А



Б



В

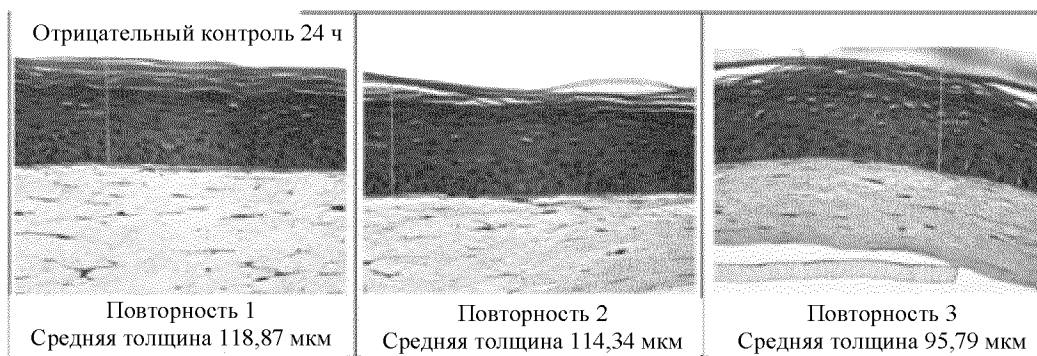


Г



Фиг. 5

6
Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи

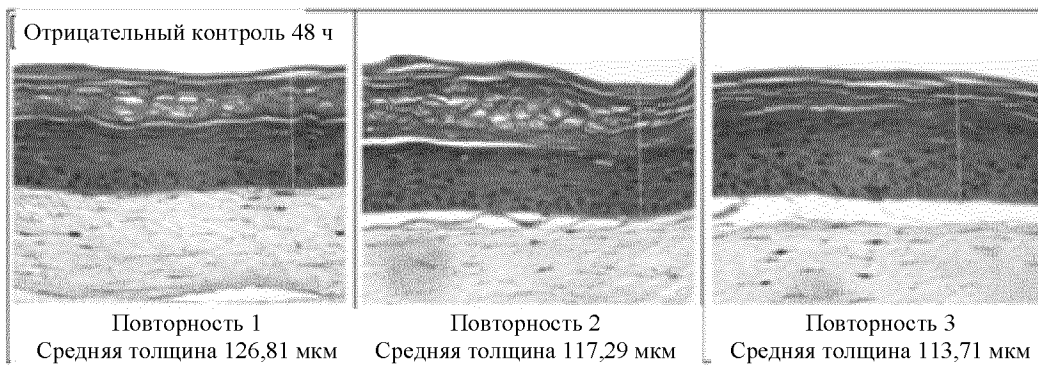


Фиг. 6а

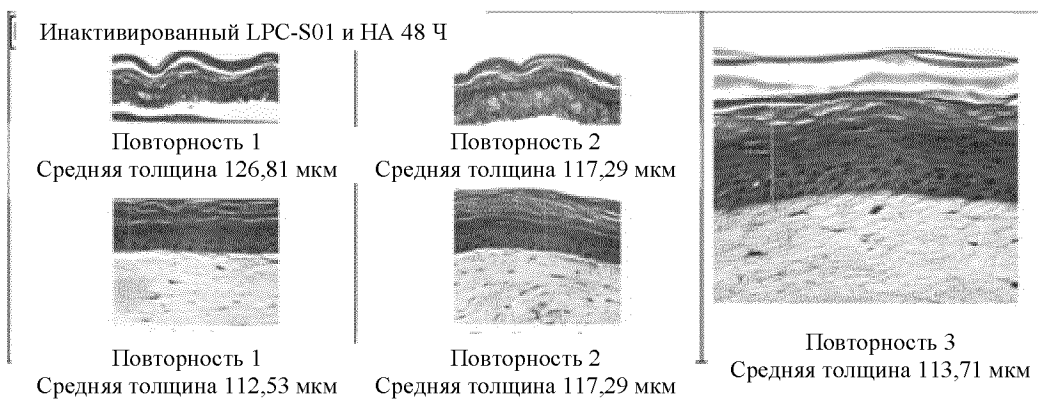


Фиг. 6б

7
Композиции, содержащие
бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
и гиалуроновую кислоту,
и их применение для лечения кожи

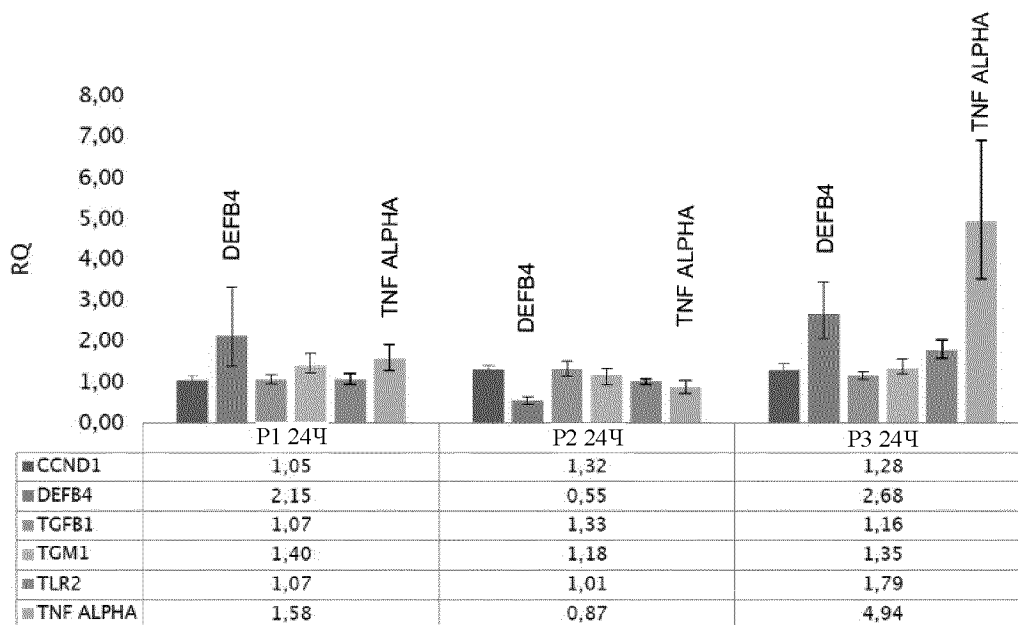


Фиг. 6в

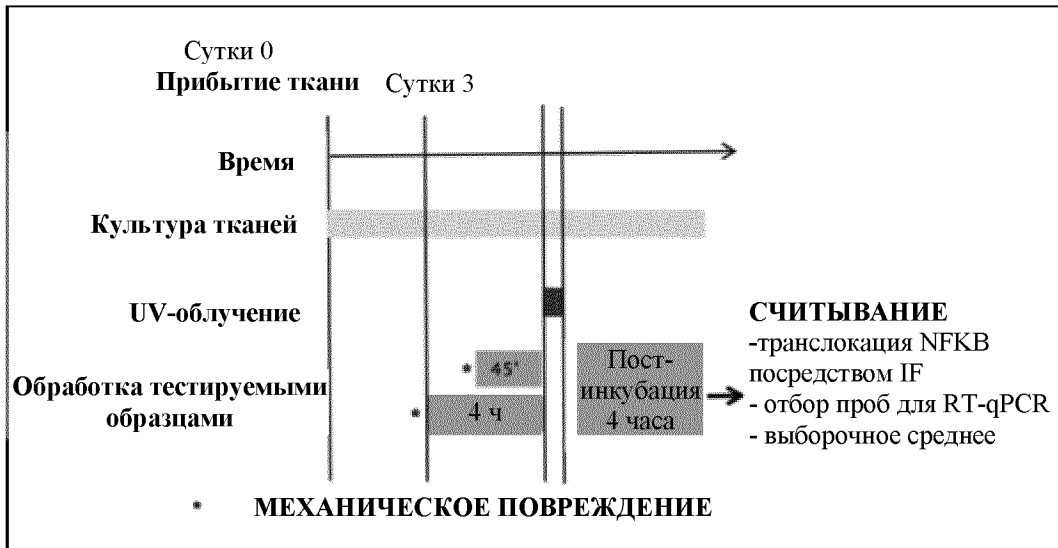


Фиг. 6г

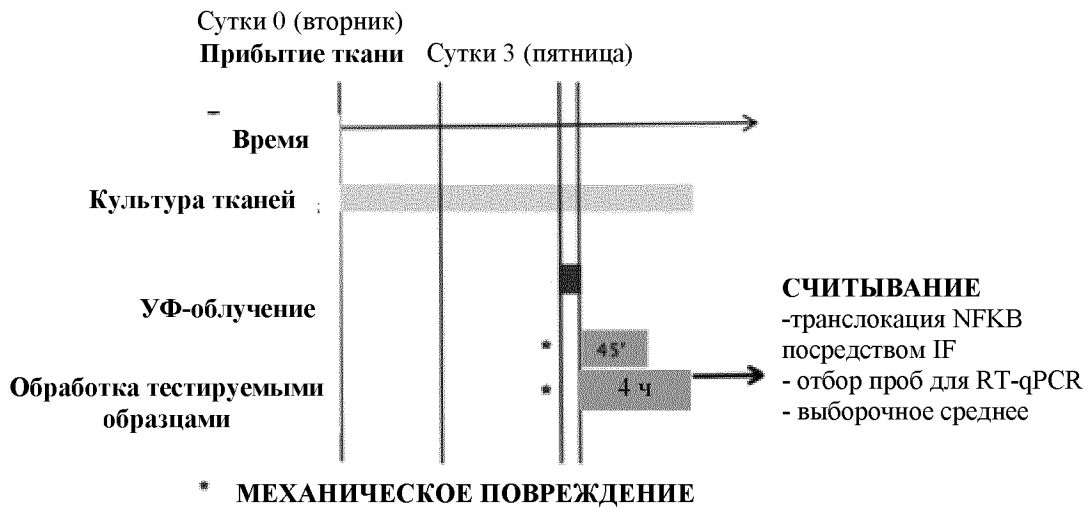
8 Композиции, содержащие
 бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei*
 и гиалуроновую кислоту,
 и их применение для лечения кожи



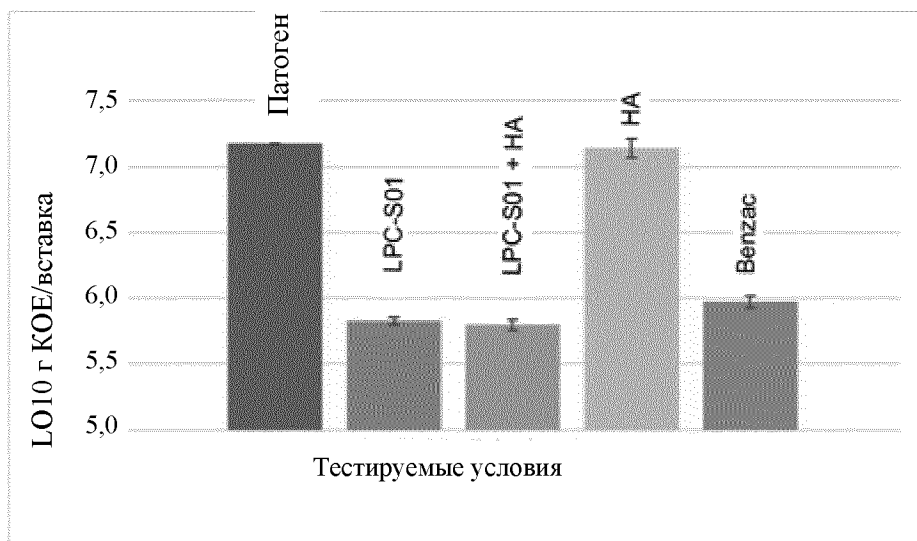
Фиг. 7



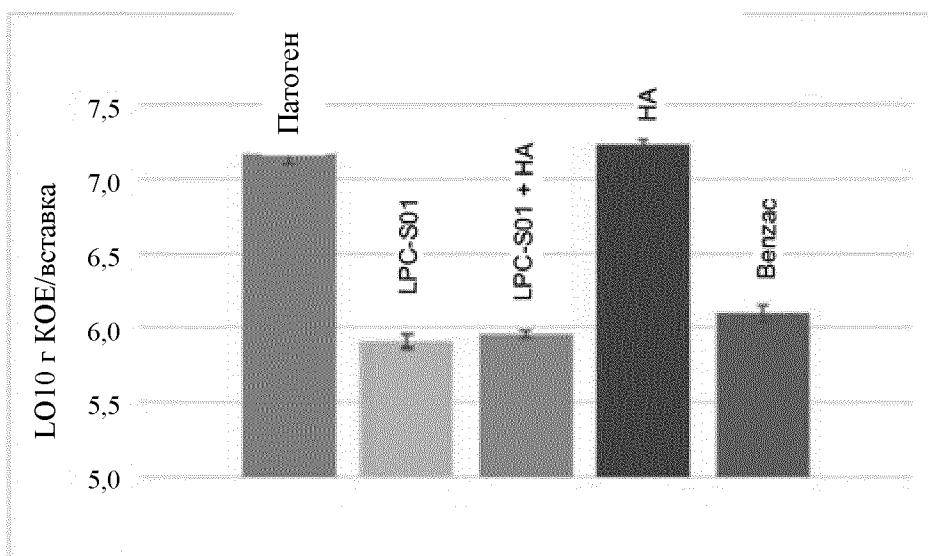
Фиг. 8



Фиг. 9

Уменьшение числа жизнеспособных клеток *S. acnes*

Фиг. 10

Уменьшение числа жизнеспособных клеток *S. acnes*

Фиг. 11