



MD/EP 4107293 T2 2024.09.30

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 4107293 (13) T2

(51) Int. Cl.: C12R 1/01 (2006.01.01)  
A61K 35/74 (2015.01.01)  
C12N 1/20 (2006.01.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2022 1416	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 09/2024, 2024.09.30
(22) Data de depozit: 2021.02.18	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 17/2024, 2024.04.24
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 21711182.2, 2021.02.18	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2023, 2023.01.31
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 4107293, 2022.12.28	
(31) Numărul cererii prioritare: 202000003233	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2020.02.18	
(33) Țara cererii prioritare: IT	
(71) Solicitant: AILEENS PHARMA S.R.L., IT	
(72) Inventatori: VERGALITO Franca, IT; LONGO SORMANI Sonia, IT; MAGNIFICO Irene, IT; PIETRANGELO Laura, IT; DI MARCO Roberto Maria Antonio, IT; CUTULI Marco Alfio, IT; VENDITTI Noemi, IT; PETRONIO PETRONIO Giulio, IT	
(73) Titular: AILEENS PHARMA S.R.L., IT	
(74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

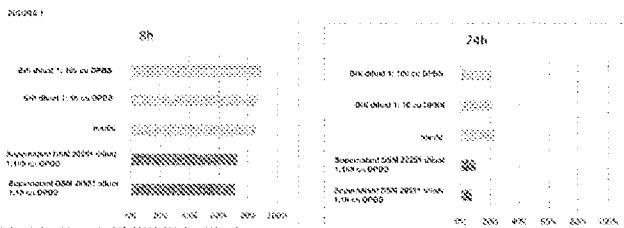
(54) Tulpina de *Cutibacterium acnes* și utilizări medicale asociate

## (57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină bacteriană selectată de *Cutibacterium acnes* și/sau un perete celular din aceasta sau la un postbiotic al tulpinii și la utilizările medicale sau nutriționale ale acesteia. Invenția se referă, de asemenea, la compoziții farmaceutice sau nutriționale care conțin tulpina, peretele celular sau postbioticul din acestea pentru prevenirea sau tratamentul bolilor inflamatorii cum ar fi dermatita sau psoriazisul sau infecțiile, în special infecțiile fungice sau bacteriene ale pielii sau ale mucoaselor.

Revendicări: 19

Figuri: 10



MD/EP 4107293 T2 2024.09.30

**Descriere:**

**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

**DOMENIUL INVENȚIEI**

5 Prezentă invenție se referă la o tulpină bacteriană selectată aparținând genului Cutibacterium, specie acnes și la utilizarea medicală a acesteia și la compoziții farmaceutice și nutriționale care conțin aceeași tulpină.

Prezentă invenție își are originea în domeniul microbiologic și își găsește aplicații în domeniul farmaceutic, cosmetic și nutrițional.

10 În mod specific, invenția se referă fie la o tulpină selectată de Cutibacterium acnes, fie la postbiotice și fragmente de perete celular ale tulpinii care, prin componente microbiene structurale și/sau prin producerea de substanțe, promovează creșterea celulelor fibroblaste. Tulpina conform invenției, fragmentele din peretele acesteia și postbioticele acesteia au activități antiinflamatorii și antibacteriene. De preferință, tulpina bacteriană selectată sau fragmentele din peretele său sunt pentru aplicare locală pentru  
15 tratarea afecțiunilor dermatologice, infecțiilor sau afecțiunilor pielii.

**CADRUL INVENȚIEI**

Inflamația este în esență un răspuns biologic la un stimul dăunător sau o leziune a unui țesut al organismului, care poate fi cauzată de cauze externe, cum ar fi contactul cu agenți iritanți sau  
20 microorganismele. Inflamația este considerată ca un răspuns protector al organismului care vizează eliminarea cauzei leziunilor tisulare, curățarea țesuturilor necrotice deteriorate de la insulta inițială și procesul inflamator și inițierea reparației țesuturilor. Acest răspuns al organismului implică celulele imune și mediatorii moleculari.

În prezent, inflamația este tratată prin administrarea sistemică sau topică de medicamente antiinflamatoare nesteroidiene sau steroidiene. În ciuda răspândirii pe scară largă a agenților  
25 antiinflamatori, rămân unele riscuri reziduale ca inflamația să poată persista după tratamentul cu medicamente antiinflamatoare. În plus, tratamentul antiinflamator nu este lipsit de efecte secundare nici în cazul aplicării topice, cât și al administrării sistemice.

În ultimii ani apariția reacțiilor adverse în cazul administrării topice este crescută din cauza abuzului sau a utilizării greșite a cremelor cu steroizi care vizează tratarea inflamației pielii.

30 De aceea, în prezent există necesitatea de a avea noi produse prevăzute cu activitate antiinflamatoare a căror folosire chiar și pentru o perioadă îndelungată să nu fie afectată de efecte secundare grave.

Probleme similare apar și în domeniul dermatologic și ginecologic, în cazul infecțiilor cutanate sau mucoase.

35 Abuzul de produse antibiotice de uz local pentru tratarea infecțiilor cutanate a crescut numărul cazurilor de rezistență la antibioticoterapia locală, obligând medicul să prescrie antibiotice de a doua generație.

Prin urmare, în prezent există necesitatea de a avea noi produse prevăzute cu activitate antiinflamatoare și/sau eventual chiar antimicrobiană, care să fie alternative la medicamentele disponibile  
40 comercial.

Unul dintre scopurile prezentei invenții constă în furnizarea unui produs prevăzut cu activitate antiinflamatoare și posibil antimicrobiană sau antifungică a cărui utilizare este substanțial lipsită de efecte secundare. De asemenea, este de dorit să se furnizeze un produs care este activ în controlul microbiotei umane.

45 Un alt scop al invenției constă în furnizarea unui produs nesteroidian prevăzut cu activitate antiinflamatoare, care vizează în mod specific aplicarea topică pe piele sau pe mucoase cum ar fi mucoase vaginale.

Acesta din urmă este, în general, adresat împotriva bacteriilor și/sau ciupercilor patogeni, funcționând, în funcție de țintă, fie ca bactericid sau bacteriostatic, fie ca agent fungicid sau fungistatic.

50 Pe de altă parte, prin contrastarea agenților patogeni, se realizează o restabilire mai rapidă a condițiilor de homeostazie prin normalizarea microbiomului rezident.

**REZUMATUL INVENȚIEI**

Prezentă invenție provine din constatarea că o tulpină bacteriană selectată din genul Cutibacterium, specie acnes, promovează proliferarea fibroblastelor și are capacitatea de a interfera cu  
55 creșterea majorității bacteriilor și ciupercilor comune, în special a celor care afectează pielea umană.

În special, tulpina bacteriană de Cutibacterium acnes selectată, așa cum este definită în revendicarea 1, fragmente din peretele său celular sau postbiotice sau compoziția care le conține, așa cum este definită aici, prezintă o reglare a sistemului imunitar combinată cu un efect inhibitor îmbunătățit asupra

microorganismelor patogene ale pielii. Aceste efecte sunt în parte legate de o interferență a tulpinii cu atașarea agentului patogen la celulele gazdă.

În plus, inventatorii au constatat că tulpinile bacteriene vii sau ucise sau o parte din ele, cum ar fi fragmente din peretele lor conform invenției, produc substanțe sau produse secundare care promovează creșterea și migrarea celulelor fibroblaste. Această proprietate susține în continuare utilizarea tulpinii selectate sau a substanțelor produse prin aceasta ca agenți imunomodulanți și o face un candidat potrivit pentru aplicații în domeniul dermatologic sau ginecologic, în special în tratamentul infecțiilor bacteriene sau fungice ale pielii, în special cu *Candida Albicans* sau infecții bacteriene.

În consecință, prezenta invenție furnizează, într-un prim aspect, o tulpină bacteriană din genul *Cutibacterium specia acnes* depusă cu numărul de acces (sau numărul de înregistrare) DSM 28251 la Autoritatea Internațională de Depozit Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, sau la o variantă care este în esență derivată din respectiva tulpină.

Într-un aspect, invenția furnizează utilizări medicale ale tulpinii bacteriene *Cutibacterium acnes* menționate mai sus, depusă cu numărul de acces DSM 28251. În conformitate cu acest aspect, tulpina invenției este pentru administrare topică sau sistemică.

Administrarea sistemică înseamnă o cale de administrare a unui medicament, nutriție incluzând tulpina conform invenției în sistemul circulator astfel încât întregul organism este afectat. Administrarea poate avea loc prin administrare enterală, orală sau administrare parenterală, de exemplu prin injecție, perfuzie sau implantare.

Administrarea sau aplicarea topică este calea preferată de administrare a *Cutibacterium acnes* DSM 28251 conform prezentei invenții. *Cutibacterium acnes* DSM 28251, postbiotic, fragmente de perete celular și compoziții care conțin aceleași fragmente ale acestuia pot fi aplicate pe piele în orice forme adecvate pentru aplicare locală.

În conformitate cu un alt aspect, invenția furnizează tulpini sau variante ale tulpinii bacteriene DSM 28251 așa cum s-a identificat mai sus, care sunt derivate în esență prin mutație spontană, mutație și selecție induse, hibridizare și selecție sau alte metode de manipulare genetică și pot fi urmărite înapoi. Într-un alt aspect, invenția se referă la postbiotice ale tulpinii de mai sus și utilizări medicale sau nutriționale ale acestora.

Tulpina bacteriană, conform prezentei invenții, poate fi izolată și selectată din pielea sănătoasă, dintre multitudinea de tulpini care compun microbiomul pielii.

Conform încă unui alt aspect, invenția se referă la tulpina bacteriană *Cutibacterium acnes*, depusă cu numărul de acces DSM 28251 la Autoritatea Internațională de Depozit Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, sau o variantă derivată în principal din tulpina menționată, pentru utilizarea în prevenirea sau tratamentul unei boli sau infecții inflamatorii, în special de piele sau mucoase.

De preferință, tulpina bacteriană a invenției își găsește aplicații în domeniul dermatologic și ginecologic, de exemplu în tratamentul inflamației pielii sau mucoaselor sau al infecțiilor cu bacterii, ciuperci sau protozoare. În special, tulpina de mai sus este eficientă în prevenirea și/sau tratarea infecțiilor, în special ale pielii.

Tulpina selectată conform invenției este eficientă în tratamentul ciupercilor, în special a drojdiilor din genul *Candida* spp, în special *Candida Albicans*, sau dermatofite precum *Malassezia* spp, ambele fiind printre cei mai comuni agenți cauzali ai infecțiilor oportuniste ale corpului uman. În plus, tulpina selectată conform invenției este utilizată în tratamentul infecțiilor fungice care sunt rezistente la produsele antifungice disponibile pe piață.

Invenția prevede, de asemenea, utilizarea proctologică a *Cutibacterium acnes* DSM 28251, în special ucis termic, postbiotic sau fragment de perete al acestei tulpini, sau o compoziție topică a acesteia, în special în tratamentul hemoroizilor sau al rhașadelor anale sau al cicatricilor cutanate.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție de acid hialuronic cu un fragment din peretele bacterian al *C. acnes DSM 28251*, în special pentru utilizare în tratamentul rănilor, abraziunii, ulcerărilor pielii, de exemplu ulcere de presiune. Un alt aspect al invenției se referă la utilizarea cosmetică a tulpinii bacteriene identificate mai sus pentru ameliorarea unui aspect estetic al pielii, cum ar fi roșeața sau cuperoza.

Conform unui alt aspect, invenția se referă la utilizările nutriționale ale tulpinii identificate de mai sus sau ale unui postbiotic obținut prin aceasta.

#### 55 SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Invenția va fi descrisă acum în detaliu și cu referire la figurile atașate, în care:

Figura 1 prezintă grafice cu bare care raportează valorile septului din Exemplul 1, calculate cu software-ul imagine j;

Figura 2 prezintă grafice cu bare cu aria septului din Exemplul 1, calculate cu software-ul imagine j;

Figura 3 prezintă grafice cu bare care ilustrează efectele *in vitro* asupra curbei de creștere a *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans* prin adăugarea în mediile de cultură a diferitelor concentrații de *C. acnes* DSM 28251 ucis termic.

Figura 4 ilustrează prepararea supernatantului și a *Staphylococcus aureus* utilizat în testul din Exemplul 3.

5 Figurile 5A și 5B prezintă grafice care ilustrează rata de supraviețuire a larvelor de *Galleria mellonella* după injectarea cu supernatanți din culturile *S. aureus* ATCC BAA1680 (At) și *S. aureus* ATCC 29213 (B) pre-incubate cu formulări testate timp de 1 oră conform Exemplului 4. Supernatanți+formaA" înseamnă supernatant incubat cu LimpiAD A, „Supernatanți+formaD" pentru supernatant incubat cu formula LimpiAD D, supernatant „Supernatanți+perete" incubat cu componente active LimpiAD, „Supernatanți" pos control, „Medium" pentru mediu de cultură singur (fără cultură bacteriană), „Ser fiziologic" pentru tratament simulat.

10 Figurile 6A și 6B prezintă grafice care ilustrează rata de supraviețuire a larvelor de *Galleria mellonella* după injectarea cu supernatanți din culturile *S. aureus* ATCC BAA1680 (A) și *S. aureus* ATCC 29213 (B) pre-incubate cu formulări testate timp de 4 ore, conform exemplului 4 „Supernatanți+formaA" înseamnă supernatant incubat cu formularea LimpiAD A (așa cum este definit în Exemplul 4), „Supernatanți+formaD" pentru supernatant incubat cu LimpiAD D, supernatant „Supernatanți+perete" incubat cu componente active LimpiAD, „Supernatanți" control poz., „Mediu" numai pentru mediul de cultură (fără cultură bacteriană), „Soluție salină" pentru tratament simulat.

15 Figura 7 prezintă expresia genelor țintă „normalizate" la control, exprimată prin creșterea sau descreșterea orificiilor, așa cum este raportat în Exemplul 4.

Figura 8 prezintă cinci grafice, fiecare ilustrând curbele de creștere comparative ale tulpinilor de *Staphylococcus aureus* (trei tulpini diferite), *Staphylococcus epidermidis* și *Candida albicans* inoculate cu supernatanți (plus control fără tulpini) din șapte tulpini cunoscute de *Cutibacterium acnes* și din tulpina (comparativă) *Cutibacterium acnes* DSM 28251;

25 Figura 9 prezintă cinci grafice, fiecare ilustrând curbele de creștere comparative a trei tulpini de *Staphylococcus aureus*, o tulpină de *Staphylococcus epidermidis* și o tulpină de *Candida albicans* fiecare într-un mediu inoculat cu șapte tulpini cunoscute diferite ucise termic de *Cutibacterium acnes* și cu tulpina *Cutibacterium acnes* DSM 28251 (tulpină comparativă ucisă termic);

30 Figura 10 prezintă cinci grafice, fiecare ilustrând curbele de creștere comparative a trei tulpini de *Staphylococcus aureus*, o tulpină de *Staphylococcus epidermidis* și o tulpină de *Candida albicans* fiecare într-un mediu inoculat cu fragmente de perete bacterian obținute prin omogenizarea și după separarea în gradient a șapte tulpini cunoscute diferite de *Cutibacterium acnes* și de tulpină *Cutibacterium acnes* DSM 28251 (fragment comparativ de perete bacterian).

#### DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

35 Într-un prim aspect, invenția se referă la o tulpină aparținând genului *Cutibacterium species acnes*, depusă cu numărul de acces DSM 28251 (ID 19-401) la Autoritatea Internațională de Depozit Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, sau o variantă derivată în esență din tulpina menționată.

40 Invenția se referă, de asemenea, la un postbiotic așa cum este definit în revendicările 2, 3 și un perete celular așa cum este definit în revendicările 4, 5.

Tulpina bacteriană de mai sus este prevăzută atât cu o activitate antiinflamatoare *in vivo*, cât și cel puțin cu o activitate antimicrobiană *in vitro*. Un perete celular sau un postbiotic din tulpina de mai sus sunt furnizate și cu aceste activități.

45 Activitățile de mai sus sunt dovedite prin testele experimentale efectuate de inventatori și raportate în următoarele exemple. Aceste teste oferă o bază științifică pentru utilizarea tulpinii bacteriene identificate mai sus ca agenți antiinflamatori, imunomodulatori și antimicrobieni, în special pentru aplicații topice.

În anumite aspecte ale invenției, este furnizată aici o compoziție, în special o compoziție farmaceutică sau nutritivă, care conține o tulpină/perete sau postbiotic așa cum este definit aici.

50 În conformitate cu un alt aspect, invenția se referă la utilizarea tulpinii/peretelui/postbioticului identificate mai sus ca medicament și la utilizări medicale ale acestora, în special așa cum sunt definite în revendicările 9-13.

Proprietățile intrinseci ale tulpinii bacteriene selectate asigură o acțiune antiinflamatoare permițând medicului să trateze o gamă largă de boli, în special pe cele localizate pe piele sau pe mucoasa corpului uman.

55 În plus, proprietățile antibacteriene și/sau bacteriostatice ale tulpinii selectate o fac utilă în tratamentul infecțiilor, în special al infecțiilor cutanate și ale mucoasei. Tulpina selectată s-a dovedit a fi eficientă împotriva bacteriilor comune, în special bacteriilor gram pozitive, în special bacteriilor coci, cum ar fi *Staphylococcus aureus*, sau împotriva *Escherichia coli* și a ciupercilor, de exemplu din genul *Candida*.

Tulpina conform prezentei invenții este caracterizată genotipic și este identificabilă într-o manieră clară și definită prin trăsături specifice identificate în genom. Această tulpină a evoluat spontan, fără nicio intervenție directă sau manipulare genetică și are caracteristicile relevante pentru aplicare industrială. Pentru a verifica și a stabili caracteristicile tulpinii DSM 28251 și pentru a exclude posibila suprapunere a acestei tulpini cu tulpinile descrise în stadiul tehnicii, a fost realizată o caracterizare a genotipului de către DSMZ.

Într-un aspect, invenția prevede utilizarea cosmetică a unei compoziții topice așa cum este definită în revendicările 7, 8, în special pentru tratamentul cosmetic sau prevenirea pielii sensibile, a pielii roșii, a cuperozei, a schiului uscat, în special a feței unei ființe umane.

În anumite aspecte, invenția se referă, de asemenea, la o tulpină sau perete sau postbiotic al tulpinii DSM 28251 C. acnes pentru utilizări medicale în tratamentul pentru:

- o boală ginecologică precum vaginita, infecția sau inflamația vaginală, sau
- o tulburare proctologică, de exemplu hemoroizi, ragade anale sau cicatrici ale pielii sau zona perianală, sau
- răni, răni, abraziune, ulceratii ale pielii, de exemplu ulcere de presiune sau pentru vindecarea rănilor.

#### **Definiții în prezenta invenție:**

„Tulpina DSM 28251” este menită să includă o tulpină bacteriană din genul Cutibacterium, specia acnes, depusă la 18 decembrie 2013 (referința de identificare ULTIMO) și transformată într-un depozit conform Tratatului de la Budapesta la 22 decembrie 2019 cu numărul de acces DSM 28251 la Autoritatea Internațională de Depozit Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; De obicei, Cutibacterium acnes este o bacterie gram-pozitivă.

„manipularea genetică” este menită să includă orice intervenție tehnică care vizează direcționarea procesului de achiziție a unor caracteristici genetice specifice care sunt exprimate ca trăsături fenotipice corespunzătoare, în care intervențiile tehnice cuprind (Sturley & Young, 1986): (i) încrucișarea unor tulpini naturale, urmată de selecție; (ii) producerea de hibridi urmată de selecție; (iii) transformare, adică inserarea ADN-ului exogen în cromozomi sau în genomul mitocondrial sau alte elemente genetice, cum ar fi plasmidele. (iv) Mutageneza aleatorie indusă, urmată de obicei de selecția și/sau producerea de hibridi (Nevoigt 2008) poate fi adăugată ca mod suplimentar de manipulare;

„variantă derivată” este menită să includă o variantă de tulpină a tulpinii Cutibacterium acnes, depusă la DSMZ cu numărul de acces DSM 28251, care poate fi urmărită înapoi la aceasta prin profilarea ADN-ului microsatelit sau datorită unei trăsături genetice distincte detectabile de secvențierea genomului și analiză comparativă.

„mediu de creștere” (sinonime: mediu, mediu de creștere / bulion de cultură/ bulion de creștere) se referă la un substrat care conține toți compușii (factorii) necesari unui microorganism, în special o bacterie, cum ar fi o bacterie Gram+, pentru replicarea celulară, ceea ce duce la creșterea a numărului de celule individuale și a creșterii populației. Factorii necesari microorganismelor pentru creșterea lor în mediu aparțin în principal categoriilor: sursa de carbon, sursa similară de azot (constituită atât din amoniac, cât și din aminoacizi liberi, ultimul cunoscut și sub denumirea de FAN), vitamine și săruri (oligoelemente). Sursele tipice de carbon sunt melasa de trestie de zahăr, melasa de sfeclă, extractul de malț de orz și extractul de malț de grâu.

Compoziția celulelor nevital/celulelor neviabile, a extractelor celulare, a lizatului celular este strict legată de proprietățile metabolice și fiziologice unice ale tulpinii DSM 28251.

„Postbiotice” înseamnă produse bacteriene neviabile, inclusiv produse secundare metabolice secretate de un microorganism, cum ar fi tulpina depusă la DSMZ cu numărul de acces DSM 28251, care au activitate biologică în gazdă sau atunci când sunt aplicate pe un țesut al corpului uman, cum ar fi pielea.

Postbiotica cuprinde, de asemenea, materiale ale tulpinii Cutibacterium DSM 28251, inclusiv celule ucise termic, supernatantul celulelor lizate mecanic sau fragmente de perete celular. Postbioticele oferă beneficii fiziologice gazdei și pot fi utilizate pentru a formula o compoziție pentru utilizări medicale sau cosmetice și pentru administrare orală și/sau topică așa cum este descris aici.

Postbiotica tulpinii Cutibacterium DSM 28251 poate fi obținută conform unei proceduri generale / a unui proces general care include următoarele etape: tulpina bacteriană este crescută în mediu sau în bulion pentru a se obține o suspensie.

Suspensia este centrifugată în eprubete, folosind tehnologia convențională.

La sfârșitul centrifugării se obține o stratificare a suspensiei. Pe fundul eprubetei se depun pelete care conțin celulele cu un strat superior care conține supernatantul, care este lichidul/mediul de cultură.

Supernatantul este apoi îndepărtat lăsând peletul depus pe fundul eprubetei, care este colectat și spălat cu apă. Peletul este apoi resuspendat într-o soluție fiziologică (salină) pentru a obține celulele și apoi

centrifugat pentru a îndepărta mediul de cultură rămas. Celulele suspendate în apă sunt tratate mecanic cu un agitator mecanic, cum ar fi Ultraturrax (liză mecanică).

Odată cu liza mecanică a peretelui celular se eliberează conținutul celular și se obține postbioticul (supernatant).

5 Realizări specifice ale acestei proceduri sunt descrise în următoarea descriere detaliată și în Exemple.

- „ Purtător ” se referă la un excipient, vehicul, diluant sau adjuvant, care poate sau poate fi prezent în compoziția invenției.
- „ produs nutrițional ” înseamnă un produs care îmbunătățește starea nutrițională și poate fi utilizat pentru a susține sau îmbunătăți activitatea funcțională a unui sau mai multor organe sau funcționalitatea corpului uman în limitele fiziologice.
- „ tulpina bacteriană selectată ” sau „ tulpina ” așa cum este menționat aici înseamnă tulpina invenției depusă la DSMZ cu numărul de acces DSM 28251.
- „ peretele celular ” sau „ peretele tulpinii bacteriene (din invenție) ” înseamnă peretele celular al tulpinii bacteriene *Cutibacterium acnes* depus cu numărul de acces DSM 28251.

15 Peretele tulpinii conform invenției poate fi rupt în părți sau fragmente. Termenul „ fragment ” înseamnă o parte a peretelui tulpinii DSM 28251 conform invenției. Un fragment poate desemna, de asemenea, un lizat celular al peretelui tulpinii DSM 28251.

20 Un fragment sau lizat de perete celular al tulpinii DSM 28251 poate fi obținut prin metode convenționale sau generale de distrugere a celulelor, de exemplu așa cum este dezvoltat mai jos:

Bacteriile din bulion sau mediu de cultură sunt spălate și delipidate în mod obișnuit cu ajutorul unui extractor Soxhlet. Bacteriile delipidate sunt apoi suspendate în apă și apoi supuse lizei mecanice, de exemplu cu un agitator mecanic, de exemplu folosind un Ultraturrax și conținutul este tratat cu sulfat de amoniu pentru a precipita fragmentele peretelui bacterian.

25 Fragmentele pot fi apoi curățate de exemplu prin spălare cu apă pentru a obține fragmente de perete.

Un procedeu specific pentru obținerea unui fragment de perete al tulpinii de *C. acnes* DSM 28251 este descris în Exemplul 6.

30 O distrugere/ruptură adecvată a tulpinii sau a peretelui acesteia poate fi realizată fie prin supunerea tulpinii conform invenției la metode mecanice/tratamente de liză, fie prin metode nemecanice/tratamente de liză.

#### **Dezmembrarea tulpinii prin metode/aparate mecanice**

Metodele mecanice adecvate pentru dezmembrarea (lizarea) celulei de perete a prezentei tulpini și obținerea de fragmente de perete includ fie metode de forfecare solidă, fie metode de forfecare fluidă.

35 Forfecarea solidă include utilizarea morii cu granule, X-press sau presa Hughes.

Forfecarea lichidă include metode de sonicare și de înaltă presiune, inclusiv presa Hughes sau presa franceză și/sau omogenizarea cu un omogenizator sau utilizarea unui omogenizator cu microfluidizor.

Tehnica cu moară cu granule (sau abraziune) include de obicei agitarea unei suspensii de tulpină cu granule de sticlă.

40 În mod obișnuit, dezmembrarea peretelui celular cu o metodă de moară cu granule este realizată într-o moară cu granule care include o cameră de măcinare învelită cu un arbore rotativ care trece prin centrul său. Arborele este echipat cu un agitator (agitatoare) care transmite energie cinetică granulelor din cameră, forțându-le să se ciocnească între ele (Chisti și Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995). Granulele potrivite pot avea un diametru de 0,10-0,15 mm pentru dezmembrarea eficientă a bacteriilor. Aparatele industriale mari pot folosi granule de 0,4-0,6 mm în diametru datorită mecanismului de separare a granulelor de suspensie (Kula & Shutte, 1987). Viteza de vârf adecvată este de cel puțin  $10 \text{ m}^{-1}$  pentru dezmembrarea bacteriilor (Kula & Shutte, 1987). Concentrațiile celulare pot varia de la 40-50% greutate umedă în bulionul introdus în cameră.

50 Forfecările solide adecvate includ, de asemenea, metode de sonicare și de înaltă presiune, inclusiv presa Hughes sau presa franceză, în care o suspensie înghețată de celule este forțată printr-o deschidere mică prin presiuni mari (Engler, 1985).

55 Sonicarea include utilizarea ultrasunetelor, unde sonore de obicei cu o frecvență mai mare de 15-20 kHz, care pot dezmembra peretele celular în suspensie. Puterea acustică adecvată, de exemplu, la sonicarea a 5-30 ml dintr-o suspensie bacteriană 20% într-un mediu lichid convențional, folosește 35-95 W de putere acustică.

Alternativ, întreruperea mecanică poate fi obținută într-un omogenizator cu supapă de înaltă presiune prin trecerea unei suspensii celulare a tensiunii la presiune înaltă printr-o supapă de descărcare cu orificiu reglabil, restrâns, așa cum este raportat de Engler, 1985. De obicei, un model de omogenizator de bază cuprinde un pompă de deplasare care forțează o suspensie de celule prin centrul unui scaun de supapă

și peste fața scaunului. Reglarea forței asupra supapei controlează presiunea. Fluidul curge radial prin supapă și lovește un inel de impact (Middelberg, 1995). Dezmembrarea rezultă din ruperea nespecifică a peretelui celular.

Tipul de omogenizator exemplificator este modelul APV Manton-Gaulin (Middelberg, 1995). De exemplu, temperatura este crescută cu aproximativ 21°C la 10MPa într-un omogenizator. Există o influență puternică a presiunii de funcționare asupra procesului de dezmembrare în omogenizator. Prin operarea omogenizatorului la presiuni mai mari, este posibilă scăderea numărului de treceri ale suspensiei celulare prin omogenizator pentru un anumit grad de dezmembrare (Chisti & Moo-Young, 1986; Bury și colab., 2001).

Un omogenizator cu microfluidizor poate fi, de asemenea, utilizat ca echipament pentru obținerea peretelui celular fragmentat. În acest aparat, două fluxuri de suspensie celulară sunt lovite cu viteză mare de o suprafață staționară, iar aportul de energie este disipat aproape instantaneu în punctul de impact, ducând la dezmembrarea celulelor (Middelberg, 1995; Agerkvist & Enfors, 1990). Timpul de rezidență al suspensiei de tulpini în camera de dezmembrare a Microfluidizoarelor, care este cea mai fierbinte parte a dispozitivului, este de 25-40 ms. Răcirea în loc poate fi realizată prin imersarea camerei de dezmembrare într-o baie de gheață (Sauer și colab., 1989; Geciova, experiență personală). Frația de celule dezmembrate crește odată cu creșterea presiunii și a numărului de treceri.

#### **Dezmembrarea tulpinii prin metode nemecanice**

O metodă nemecanică se bazează pe decompresia obținută prin introducerea unui gaz subcritic sau supracritic sub presiune în celule care provoacă dezmembrarea după eliberarea presiunii aplicate prin expansiune.

O altă dezmembrare nemecanică a peretelui celular poate fi obținută prin șoc osmotic în care o suspensie de tulpină celulară este diluată într-un mediu/bulion lichid după echilibrare la presiune osmotică ridicată în condiții convenționale.

O metodă alternativă pentru liza celulară este termoliza care implică tratamentul termic al celulelor în condiții convenționale. O altă liză celulară nemecanică poate fi obținută prin permeabilizare chimică, în special cu o substanță selectată dintre antibiotice, cum ar fi antibioticul beta-lactamic de exemplu penicilina, agenți de chelare de exemplu EDTA, haotropi de exemplu uree, guanidină, etanol, detergenți de exemplu seria Triton X, dodecil sulfat de sodiu, lauril sarcosinat de sodiu, solvenți cum ar fi toluen, acetona, cloroform, hidroxizi cum ar fi hidroxid de sodiu, hipocloriți cum ar fi hipoclorit de sodiu și amestecuri ale acestora.

Liza celulară a tulpinii poate fi, de asemenea, obținută prin liză enzimatică, de exemplu prin utilizarea unei proteaze și glucanaze pentru a ataca, la început, complexul manoproteic al peretelui celular și apoi scheletul glucanului (Kitamura, 1982). Un produs adecvat pentru liza peretelui de tulpină este produsul comercial Zymolase-20T (Seikagaku America, Inc., Rockville, MD). Lizozima poate fi de asemenea utilizată pentru liza straturilor de peptidoglican deoarece catalizează hidroliza legăturilor b-1,4-glicozidice.

În conformitate cu un exemplu de realizare preferat, un fragment de perete al tulpinii *C.acnes* DSM 28251 poate fi obținut prin tratarea tulpinii bacteriene cu sulfat de amoniu, de preferință la o temperatură mai mică decât temperatura camerei, de exemplu, în intervalul de la 10 la 2°C și în mod avantajos după tratament suspensia este centrifugată și fragmentul precipitat este colectat.

În mod avantajos, înainte de tratarea cu sulfat de amoniu, tulpina *C.acnes* DSM 28251 este uscată și centrifugată opțional cu apă. Opțional, după centrifugare, supernatantul rezultat din centrifugare este încălzit, de exemplu, la o temperatură de 40 până la 95°C, de preferință la 75-85°C și apoi răcit, de exemplu, cu apă rece, de preferință la 3 până la 15°C. După aceea, etapa de precipitare se efectuează prin incubarea cu o soluție de sulfat de amoniu la o concentrație de la 20 până la 60 % v/v, de exemplu la 2 până la 10°C. În mod avantajos, după incubare suspensia obținută este centrifugată și fragmentul precipitat poate fi colectat. De exemplu, granula bacteriană este delipidată prin tratament Soxhlet utilizând solvenți organici selectați dintre eter-etanol, cloroform, metanol-cloroform și un amestec al acestora, apoi este uscat, de exemplu, sub fluxul laminar de capotă. După uscare, peletul se omogenizează prin 2 etape de tratament Ultraturax, de preferință 1 minut fiecare, adăugând apă distilată, de preferință în proporție de 1:2 p/V. După centrifugare, supernatantul este încălzit la 80°C și apoi răcit sub apă rece, de preferință la 3 până la 15°C, și în final pe gheață. Ulterior, etapa de precipitare a fragmentului este realizată prin incubare cu 40% v/v sulfat de amoniu rece timp de 24 de ore la 4°C. După incubare, suspensia este centrifugată, iar fragmentul precipitat a fost colectat și liofilizat.

În unele exemple de realizare, fragmentul de perete celular al *Cutibacterium acnes* depus cu numărul de acces DSM 28251 este delipidat, adică tratat astfel încât fie să îndepărteze, fie să reducă considerabil componenta lipidică a peretelui celular al bacteriei prin intermediul tehnicilor chimice/biotehnologice. De exemplu, *Cutibacterium acnes* depus cu numărul de acces DSM 28251 este

delipidat înainte de zdrobire pentru a produce fragmentele de perete celular. De obicei, fragmentele delipidate ale peretelui celular al tulpinii conform invenției cuprind zaharuri și lanțuri peptidice, în mod obișnuit legate între ele în glicopeptide care formează o plasă strânsă. Zaharurile tipice ale peretelui celular cuprind acid N-acetilmuramic și N-acetilglucozamină.

## 5 **COMPOZIȚII FARMACEUTICE**

Tulpina bacteriană DSM 28251 și tulpinile derivate în esență ale acesteia sau un fragment sau un postbiotic rezultat prin aceasta se dovedesc a fi extrem de avantajoase pentru aplicare industrială în prepararea compozițiilor farmaceutice, în special pentru aplicare topică.

10 În conformitate cu un aspect, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde o tulpină bacteriană așa cum a fost definită mai sus sau un fragment postbiotic care rezultă din aceasta și un excipient acceptabil farmaceutic sau fiziologic. Purtătorul, diluantul sau excipientul adecvat din punct de vedere fiziologic sau farmaceutic poate fi selectat pe baza căii de administrare pentru care este destinată compoziția farmaceutică rezultată.

15 Compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții cuprind orice compoziții obținute prin amestecarea unei tulpini așa cum este definită aici, fragment al acesteia sau postbiotice ale acesteia conform prezentei invenții și un purtător acceptabil farmaceutic. Astfel de compoziții sunt adecvate pentru utilizare farmaceutică la un animal sau om.

20 Compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții cuprind o cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină așa cum a fost definită mai sus sau fragment/postbiotic al acesteia și un purtător acceptabil farmaceutic.

O compoziție farmaceutică poate conține opțional și alte ingrediente active. Termenul „purtător” se referă la un vehicul, excipient, diluanți sau adjuvant cu care este administrat ingredientul activ sau terapeutic. Orice purtător și/sau excipient adecvat pentru forma de preparat dorită pentru administrare este avut în vedere pentru utilizare cu tulpinile/peretele/postbioticele dezvăluite aici.

25 Purtătorul poate lua o mare varietate de forme în funcție de forma de preparat dorită pentru administrare, de exemplu orală sau parenterală, inclusiv intravenoasă. La prepararea compozițiilor pentru forma de dozare orală, poate fi folosit oricare dintre mediile farmaceutice uzuale, cum ar fi, de exemplu, apă, glicoli, uleiuri, alcoolii, agenți de aromatizare, conservanți, agenți de colorare și altele asemenea, în cazul preparatelor lichide orale, cum ar fi, de exemplu, suspensii, elixiruri și soluții; sau purtători cum ar fi  
30 amidon, zaharuri, celuloză microcristalină, diluanți, agenți de granulare, lubrifianți, lianți, agenți de dezintegrare și altele asemenea, în cazul preparatelor solide orale, cum ar fi, de exemplu, pulberi, capsule și tablete tari și moi, cu preparatele orale solide fiind preferate preparatelor lichide.

În anumite variante de realizare, tulpina/peretele/postbioticul din prezenta invenție poate fi combinat ca ingredient activ într-un amestec intim cu un purtător farmaceutic adecvat și/sau excipient conform tehnicilor convenționale de combinare farmaceutică.

35 Compozițiile includ compoziții adecvate pentru administrare parenterală, inclusiv subcutanată, intramusculară și intravenoasă, pulmonară, nazală, rectală, topică sau orală. Calea adecvată de administrare în orice caz dat va depinde parțial de natura și severitatea stărilor care sunt tratate și de natura ingredientului activ. O cale exemplificativă de administrare este calea orală. Compozițiile pot fi prezentate convenabil în formă de dozare unitară și preparate prin oricare dintre metodele binecunoscute în domeniul farmaciei.  
40 Compozițiile preferate includ compoziții adecvate pentru administrare orală, parenterală, topică, subcutanată sau pulmonară, sub formă de inhalare nazală sau bucală. Compozițiile pot fi preparate prin oricare dintre metodele binecunoscute în domeniul farmaciei.

45 Compozițiile farmaceutice pot fi sub formă de tablete, pilule, capsule, soluții, suspensii, emulsii, pulberi, supozitoare și formulări cu eliberare susținută.

Dacă se dorește, tabletele pot fi acoperite prin tehnici apoase sau neapoase standard. În anumite exemple de realizare, astfel de compoziții și preparate pot conține cel puțin 0,1 procente de tulpină. Procentul de tulpină activă/perete/postbiotic în aceste compoziții poate fi, desigur, variat și poate fi în mod convenabil între aproximativ 0,1 procente până la aproximativ 60 procente, 0,5 până la 20% din greutatea unității. Cantitatea de tulpină activă/perete/postbiotic în astfel de compoziții utile terapeutic este astfel încât se va obține o doză activă terapeutic. Tulpina/peretele/postbioticul poate fi de asemenea administrat intranazal ca, de exemplu, picături lichide sau spray.

55 Tabletele, pilulele, capsulele și altele asemenea pot conține, de asemenea, un liant cum ar fi gumă tragacant, salcâm, amidon de porumb sau gelatină; excipienți cum ar fi fosfat dicalcic; un agent de dezintegrare cum ar fi amidon de porumb, amidon de cartofi, acid alginic; un lubrifiant cum ar fi stearat de magneziu; și un agent de îndulcire cum ar fi zaharoză, lactoză sau zaharină. Când o formă de unitate de dozare este o capsulă, aceasta poate conține, în plus față de materialele de tipul de mai sus, un purtător lichid, cum ar fi un ulei gras. Diferite alte materiale pot fi prezente ca acoperiri sau pentru a modifica forma fizică a unității de dozare. De exemplu, tabletele pot fi acoperite cu șelac, zahăr sau ambele. Un sirop sau

elixir poate conține, în plus față de ingredientul activ, zaharoză ca agent de îndulcire, metil și propilparabeni ca și conservanți, un colorant și un agent de aromatizare, cum ar fi aromă de cireșe sau portocale. Pentru a preveni descompunerea în timpul tranzitului prin porțiunea superioară a tractului gastrointestinal, compoziția să fie o formulare acoperită enteric.

5 În cadrul invenției, utilizările topice sunt preferate. În consecință, în anumite exemple de realizare preferate, compoziția este pentru aplicare locală. În această cerere, compoziția care conține tulpină/perete/postbiotic așa cum este definită aici poate fi aplicată pe pielea ființelor umane.

10 Compozițiile pentru administrare topică includ, dar nu se limitează la, unguente, creme, loțiuni, soluții, paste, geluri, batoane, lipozomi, nanoparticule, plasturi, bandaje și pansamente pentru răni. În anumite variante de realizare, formularea topică cuprinde un amplificator de penetrare.

Compozițiile pentru administrare pulmonară includ, dar nu se limitează la, compoziții de pulbere uscată constând din pulbere dintr-o tulpină/fragment/postbiotic și pulberea unui purtător și/sau lubrifianț adecvat. Compozițiile pentru administrare pulmonară pot fi inhalate din orice dispozitiv adecvat pentru inhalare de pulbere uscată, cunoscut unei persoane de specialitate în domeniu.

15 De obicei, compoziția pentru utilizare locală poate conține o cantitate din tulpina bacteriană identificată mai sus de la 0,00001% până la 10%, de la 0,0001 până la 3%, de la 0,1 până la 2% greutate față de greutatea totală a compoziției.

Compoziția pentru aplicare topică poate fi sub formă solidă, semisolidă sau fluidă. Formulările adecvate în formă solidă includ creme, geluri, alifii, paste, unguente, creme, plasturi.

20 Compoziția pentru aplicare locală sub formă fluidă poate fi sub formă de loțiuni, geluri, suspensii, emulsii.

În cazul formelor de formulări fluide sau semi-fluide, tulpina bacteriană poate fi diluată într-un purtător în formă lichidă acceptabilă fiziologic, cum ar fi apă, alcool, soluție hidroalcoolică sau de gliceril sau amestecată cu alte lichide adecvate pentru aplicare locală.

25 Cu titlu de exemplu, compozițiile conform invenției sub formă lichidă pot fi preparate prin dizolvarea sau dispersarea tulpinii bacteriene sau a unui produs secundar al acesteia în apă și/sau alcool. Compoziția lichidă poate fi tamponată pentru a atinge un interval de pH selectat în mod convenabil de la 5 la 7 pentru a fi compatibil cu pH-ul pielii și apoi filtrată și ambalată în recipiente adecvate, cum ar fi sticle sau flacoane.

30 Într-o variantă de realizare, formularea pentru aplicarea locală este sub formă de cremă sau emulsie care conține tulpina bacteriană purtată într-un excipient adecvat.

Conform altor variante de realizare, compoziția invenției este în formă pentru administrare sistemică, în special pentru administrare orală. În aceste cazuri, compoziția conține *tulpină bacteriană* așa cum s-a definit anterior și unul sau mai multe vehicule sau / mai mulți excipienți adecvați pentru administrare sistemică.

Administrarea compozițiilor se realizează conform unui protocol și la o doză suficientă pentru a reduce boala țintă la subiect.

40 În unele exemple de realizare, în compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții, principiul sau principiile active sunt în general formulate în unități de dozare. Unitatea de dozare poate conține de la 0,00001 la 1000 mg dintr-o tulpină/perete/postbiotic per unitate de dozare pentru administrare zilnică.

În unele realizări, cantitățile eficiente pentru formularea topică vor depinde de severitatea bolii, tulburării sau stării, de terapia anterioară, de starea de sănătate a individului și de răspunsul la medicament. În unele exemple de realizare, doza este în intervalul de la 0,001% în greutate până la aproximativ 60% în greutate din formulare.

45 Când sunt utilizate în combinație cu unul sau mai multe alte ingrediente active, tulpina/peretele/postbioticul prezentei invenții și celălalt ingredient activ pot fi utilizate în doze mai mici decât atunci când fiecare este utilizat separat.

50 În ceea ce privește formulările cu privire la orice varietate de căi de administrare, metodele și formulările pentru administrarea medicamentelor sunt dezvoltate în Remington's Pharmaceutical Sciences, Ediția a 17-a, Gennaro și colab. Eds., Mack Publishing Co., 1985, și Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. Ediția a 20-a, 2000, Williams & Wilkins PA, SUA, și Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins Eds., 2005; și în Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, ediția a 8-a, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

55 În anumite exemple de realizare, compoziția conform invenției pentru administrare orală este un produs nutritiv, sau dietetic, sau nutraceutic.

Exemple de realizare și proceduri preferate ale prezentei invenții sunt descrise mai jos pentru a ilustra invenția.

#### EXEMPLUL 1

Migrare potențială *in vitro* a celulelor fibroblaste umane stimulate cu supernatant derivat dintr-o cultură de tulpină bacteriană Nr. acces DSM 28251.

#### **Scopul studiului**

5 Unul dintre mecanismele de acțiune a supernatantului unei culturi de tulpini bacteriene Nr. de acces DSM 28251 este atribuit unui efect postbiotic. Termenul post-biotic se referă la produse secundare metabolice ale microorganismelor, în special bacterii și/sau probiotice. De obicei, postbioticele sunt produse prin activitatea metabolică sau procesele fermentative ale bacteriilor, cum ar fi probioticele (microorganisme vii care exercită efecte benefice pentru gazde atunci când sunt administrate în cantități adecvate).

10 Postbioticele joacă un rol extrem de important în reglarea sănătății și menținerea unei microbiote sănătoase.

Unul dintre scopurile acestui studiu este de a evalua efectul postbiotic asupra migrării celulelor fibroblastice ale pielii umane imortalizate, pentru a evalua dacă cu supernatantul derivat dintr-o cultură de tulpină bacteriană Nr. de acces DSM 28251 se favorizează migrarea acestei linii celulare.

#### **Probe testate**

Supernatant derivat dintr-o cultură de tulpină de bacterii cu nr. de acces DSM 28251.

#### **Materiale și metode**

##### ***Bacterii***

20 Tulpina de bacterii cu nr. de acces DSM 28251 a invenției a fost crescută în mediu de bulion de infuzie Brain Heart (BHI) peste noapte la 37°C și apoi pentru a evalua efectul postbiotic, supernatantul din creșterea bacteriană a fost centrifugat și ulterior filtrat (0,45 μm) pentru a elimina celulele bacteriene. Înainte de utilizare, o alicotă a fost placată pe BHI Agar și incubată timp de 24 de ore la 37 ° C pentru a verifica absența creșterii microbiene.

##### ***Linie celulară***

25 Celulele fibroblastice netumorigenice ale pielii umane au fost (menținute în baloane de cultură de 25 cm<sup>2</sup> în mediu Eagle modificat de Dulbecco (DMEM) suplimentat cu 1% L-glutamină 200 mM, penicilină (100U/mL), streptomycină (100 μg/mL) și 10% FBS. Celulele, după spălare cu DPBS, au fost detașate la temperatura camerei cu 0,25% soluție de tripsină-EDTA 1X și vor fi observate la microscop inversat până când stratul celular va fi dispersat (de obicei în 5 minute). Celulele au fost placcate în μ-Dish (diametru 35 mm) care conține inserția de cultură (cod. 81176 Ibidi, Gjemme, Italia). Inserția de cultură constă din două godeuri; când ambele godeuri sunt umplute cu celule aderente un gol lipsit de celule (canal) de aproximativ 500 μm este creat după îndepărtarea inserției de cultură. Suspensia de celule se păstrează la 37°C în 5% CO<sub>2</sub> în DMEM suplimentat cu 1% L-glutamină 200 mM, penicilină (100U/mL), streptomycină (100 μg/mL) și 10% FBS. După 24 de ore de atașare adecvată a celei, inserția de cultură va fi îndepărtată

30 (diametru 35 mm) care conține inserția de cultură (cod. 81176 Ibidi, Gjemme, Italia). Inserția de cultură constă din două godeuri; când ambele godeuri sunt umplute cu celule aderente un gol lipsit de celule (canal) de aproximativ 500 μm este creat după îndepărtarea inserției de cultură. Suspensia de celule se păstrează la 37°C în 5% CO<sub>2</sub> în DMEM suplimentat cu 1% L-glutamină 200 mM, penicilină (100U/mL), streptomycină (100 μg/mL) și 10% FBS. După 24 de ore de atașare adecvată a celei, inserția de cultură va fi îndepărtată

35 cu ajutorul unei pensete sterile și μ-Dish-ul a fost umplut cu mediu (2 mL).

##### ***Experiment celular pentru analiza migrației***

Celulele au fost tratate cu supernatant, filtrat anterior, derivat dintr-o cultură de bacterii Aileens diluate 1:10 și 1:100 cu DPBS (Soluție salină tamponată cu fosfat a lui Dulbecco / Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). În plus, fibroblastul tratat cu BHI diluat 1:10 și 1:100 cu DPBS s-au utilizat ca martor.

40 Celulele vor fi menținute încă 24 de ore. Gradul de migrare a celulelor va fi fotografiat de Digital Microscope Eyepiece și măsurat folosind software-ul de analiză a imaginii, Image J (V 1.45s, furnizat de Institutul Național de Sănătate, SUA). Fiecare imagine va fi ulterior transformată în negativ folosind o funcție a software-ului și apoi măsurată. Experimentele au fost efectuate în trei exemplare, iar rezultatele au fost exprimate ca medie ± SE. Testul T Student va fi utilizat pentru semnificația statistică. Valorile

45 p>0,05 vor fi considerate semnificative statistic.

##### ***Rezultate***

Rezultatele obținute arată că supernatantul din tulpina bacteriană nr. de acces DSM 28251 diluat 1:10 și 1:100 cu DPBS promovează migrarea celulelor (figura 1 și 2). În plus, BHI diluat 1:10 și 1:100 cu DPBS nu interferează cu migrarea fibroblastelor.

#### **EXEMPLUL 2**

Activitatea tulpinii bacteriene ucise termic depusă sub Nr. de acces DSM 28251 cu DSMZ asupra creșterii microorganismelor patogene umane.

#### **Material și metode**

55 Tulpina bacteriană a fost crescută în mediu de infuzie Brain Heart (BHI) o/n la 37°C și apoi ucisă la căldură la 60°C timp de 1 oră.

Cultura a fost spălată cu apă pentru a spăla mediul și cultura fără mediu a fost diluată la 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> și 10<sup>5</sup> CFU/ml atât în mediu Muller Hinton (MH), cât și Sabouraud. 10<sup>5</sup> celule/ml inocul de *S. aureus* ATCC 29213 și *E coli* ATCC 11775 au fost crescute în trei exemplare în volumul final de 150 ul din fiecare diluție Muller Hinton a culturii ucise la căldură într-o placă cu 96 de godeuri. În mod similar, 10<sup>5</sup> celule/ml

inocul de *C. albicans* au fost cultivate în trei exemplare în diluții  $10^7$ ,  $10^6$  și  $10^5$  Sabouraud ale culturii bacteriene ucise. Ca martori, au fost produse triplicate ale tuturor diluțiilor în ambele medii, precum și martori pentru creșterea tulpinilor cu  $10^5$  celule/ml inocul de *S. aureus* și tulpini de *E.coli* și *C. albicans* în volumul final de 150 ul de mediu Muller Hinton și Sabouraud, respectiv. Densitatea optică (O.D.) la lungimea de undă de 600 nm a fost măsurată pentru fiecare godeu înainte de (T0) și după 3, 6, 20 și 24 de ore (T3, T6, T20, T24) de incubare la 37°C. Creșterea ca tendință a valorilor O.D. observate pentru fiecare tulpină în mediul adăugat prin tulpina ucisă la căldură a fost comparată numai cu cea din mediul Muller Hinton sau Sabouroaud.

Capacitatea tulpinii bacteriene Nr. de acces DSM 28251 de a interfera sau inhiba creșterea microbiană a bacteriilor și ciupercilor întâlnite în mod obișnuit în pielea umană (vezi Tulpinile bacteriene testate) a fost testată cu o metodă spectrofotometrică descrisă de Hall și colab.

Inhibarea creșterii microbiene a fost evaluată în plăci de polistiren cu 96 de godeuri. Diluțiile în serie ale amestecului tindalizat ( $10^7$  la  $10^5$  CFU/ml) au fost inoculate cu microorganismele testate, împreună cu microorganismele singure (martor) și mediu (martor). Toate tulpinile microbiene au fost testate conform ghidurilor CLSI (Clinical Standard Laboratory Institute) [3,4].

La intervale definite (3, 6, 20 și 24 de ore i) a fost efectuată o citire spectrofotometrică la 600 nm. Rezultatele au fost furnizate ca și curbe de creștere (microorganism singur) și curbe de inhibiție (microorganism și concentrații tindalizate). Fiecare experiment a fost efectuat de opt ori și repetat de trei ori, rezultatele au fost exprimate ca medie  $\pm$  SD.

#### **Tulpini bacteriene testate:**

- Staphylococcus aureus
- Candida albicans
- Escherichia coli

Rezultatele sunt raportate în Figura 3 anexată.

După cum se evidențiază în Figura 3, adăugarea tulpinii bacteriene Nr. de acces DSM 28251 a invenției la culturile de *S aureus* încetinește într-o doză dependentă faza logaritmică de creștere.

Rezultate similare se găsesc cu *C. albicans*.

Aceste date experimentale susțin un efect inhibitor pentru tulpina bacteriană Nr. de acces DSM 28251 conform invenției.

Test comparativ cu mediul de cultură singur (adică fără tulpina 28251).

#### **EXEMPLUL 3**

##### **Teste cu formulări care conțin tulpina DSM 28251 a invenției asupra creșterii de C. albicans**

##### **Material și metode**

##### **Formulări testate**

1. A) o formulă de bază (fără tulpina DSM 28251 )
2. B) o formulă cu 1% tulpină DSM 28251
3. C) o formulă cu 2,5 % tulpină DSM 28251
4. D) o formulă cu 2,5% tulpina DSM 28251 (2x C40)

Formula de bază a formulării conține apă, triglicerid caprilic/capric, unt de glicerină butyrospermum parkii.

##### **Procedură**

Fiecare formulare a fost inclusă în mediul de agar (20%) în plăci cu 4 sectoare. Cele 4 sectoare au fost folosite pentru placarea diferitelor diluții fungice ( $10^{-5}$   $10^{-8}$  CFU/ml), aceleași diluții au fost placate pe medii fără formulări, ca martor. După inoculare, plăcile cu formularea au fost incubate la 37° timp de 48 de ore. Creșterea fungică în mediul cu formulări a fost verificată față de control. Mai mult, au fost înregistrate pH-ul mediului singur și formule/mediu, pentru a verifica o posibilă interferență cu starea de virulență la cea de tranziție de non-virulență a *C. albicans*.

##### **Rezultate**

La martor, s-a observat o formare evidentă a numeroase colonii cu morfologia tipică albă și turbure ( $2 \times 10^9$  CFU/ml).

Din constatările microscopice, observăm morfologiile celulare caracteristice microorganismului patogen cu producerea de hife fungice.

Pentru toate formulările testate se observă formarea unei patine opace cu formarea eșuată a hifelor, două caractere care sunt asociate cu trecerea agentului patogen din starea de virulență la cea de non-virulență.

Mai mult, pH-ul mediului de cultură singur (S) este similar cu formulele medii de pH; prin urmare, modificarea pH-ului nu pare să fie implicată în comutarea fenotipică.

**Concluzii**

La *C. albicans* s-a observat o variație a morfologiei coloniilor: în absența formulărilor s-au observat coloniile tipice cu aspect lăptos, în timp ce în prezența formulărilor s-a obținut o patină omogenă și translucidă. Această variație a fost confirmată și la nivel microscopic, fără formulări. Microorganismul a fost observat atât ca drojdie, cât și ca mucegai (prezența hifelor), în timp ce în prezența formulărilor doar ca drojdie.

Această observație este o dovadă a activității inhibitoare asupra creșterii *Candida albicans* a formulărilor care conțin tulpina selectată a invenției.

**EXEMPLUL 4****Acțiunea inhibitoare a unei formulări care conține tulpina DSM 28251 (LimpAD) împotriva toxinelor/cataboliților produși de *S. aureus*: test *Galleria mellonella* in vivo și test de exprimare a genelor****Introducere**

Acțiunea potențială a formulei și a principiului activ ca agenți capabili să reducă efectele *S. aureus* au fost testate toxine pe o țintă biologică specifică. *S. aureus* este unul dintre cele mai cunoscute microorganisme în etiologia și dezvoltarea dermatitei atopice. Unul dintre principalele sale mecanisme de patogeneză este producerea unei game largi de toxine.

Formula testată LimpAD conține apă, triglicerid caprilic/capric, unt de glicerină butyrospermum parkii.

În acest scop, a fost efectuat un test *in vivo* folosind *Larvele de Galleria mellonella*. Molia de ceară mai mare *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) este un organism model care este deja validat pentru experimente de infecție bacteriană și pentru teste de toxicitate farmacologică. Reprezintă un instrument esențial pentru screening-ul preliminar al noilor compuși și o evaluare rapidă și fiabilă a activității inhibitorii potențiale și, prin urmare, ar trebui să reducă numărul de experimente necesare folosind modele de mamifere [6].

*Larvele de G. mellonella* oferă mai multe opțiuni pentru livrarea ușoară a agentului patogen, cum ar fi aplicarea topică, administrarea orală și injectarea. Microorganismul poate fi injectat direct în hemocelul larvarului și, prin urmare, *larvele* primesc o cantitate cunoscută de agenți patogeni.

Un alt avantaj al modelului *G. mellonella* este posibilitatea de a evalua expresia genelor legate de imunitate și stres. Astfel, pentru a investiga acțiunea dispozitivului pe *larvele G. mellonella* inoculate cu supernatantul de *S. aureus*, s-a efectuat testul qPCR pentru a evalua efectul LimpAD asupra imunității și genelor de stres ale *G. mellonella*. Au fost selectate gene care joacă un rol crucial în răspunsurile imunității insectelor la infecție: fagocitoză, reglarea citokinelor, adeziunea celulară și inhibitorul de metaloproteinază.

**Material și metode****Tulpini microbiene testate și condiții de cultură**

*Staphylococcus aureus* ATCC BAA1680 și *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 au fost crescute în bulion de perfuzie Brain Hearth și incubate în condiții termice la 37°C peste noapte.

Prepararea supernatantelor: culturile peste noapte ale ambelor tulpini de *Staphylococcus* au fost centrifugate la 5000 rpm timp de 5 minute. Celulele bacteriene reziduale au fost îndepărtate prin sterilizare pe filtru (0,22 μm) și diluate în soluție salină într-un raport (1:2).

Supernatantii diluați au fost amestecați (1:5 g/v) cu trei formulări diferite (Tabelul 1):

- LimpAD A (formula de bază, fără componenta activă);
- LimpAD D (cu 2,5% componentă activă);
- componenta activă singură.

După 1 oră și 4 ore de incubare a formulărilor, supernatantele au fost recuperate prin centrifugare și utilizate pentru a inocula *Larvele de Galleria mellonella*. *Larvele* tratate injectate cu supernatante (fără formulare) și mediul de cultură singur (bulion de infuzie BrainHearth) într-un raport de 1:2 au fost utilizate ca martori (Figura 25).

Pentru a evalua supraviețuirea *larvelor* infecției cu *larve de G. de mellonella* : *larvele* au fost selectate pe baza greutatei și mărimii și împărțite în grupurile experimentale enumerate în Tabelul 1. *Larvele* au fost inoculate prin injectare folosind un distribuitor repetat prevăzut cu o seringă de insulină (BD, Wellington) și un ac ultrafîn de 1 ml prin ultimul proleg al *larvelor*. După inoculare, *larvele* pentru fiecare condiție au fost incubate într-o cutie Petri la 35°C și s-a observat supraviețuirea în următoarele 96 de ore.

Tabelul Nr. 1 Substanțe testate și numărul de *larve de G. Mellonella* injectate pentru fiecare grup  
Substanțe testate Nr. de *larve*

Supernatant ATCC BAA 1680/29213+LimpAD A (1h)	20
Supernatant ATCC BAA 1680/29213+LimpAD A (4h)	20
Supernatant ATCC BAA 1680/29213+LimpAD D (1h)	20
Supernatant ATCC BAA 1680/29213+LimpAD D (4h)	20

Supernatant ATCC BAA 1680/29213+componentă activă (1h)	20
Supernatant ATCC BAA 1680/29213+componentă activă (4h)	20
Supernatant ATCC BAA 1680/29213 pozitiv CNTR 1:2	20
CNTR negativ (BHI) 1:2	20
Soluție salină	20

**Eseul expresiei genice: qPCR**

Trei larve de supraviețuire pentru fiecare grup (Martor, soluție salină; Infectat, supernatant ATCC BAA1680; Tratat cu supernatant ATCC BAA1680 *S aureus*) au fost recuperate la 96 de ore după tratament. ARN a fost extras în reactiv TRI (Sigma Aldrich) urmând protocolul producătorului. Extractele de ARN au fost cuantificate spectrofotometric apoi transcrise invers în ADNc folosind un amestec de sinteză ReadyScript™ de ADNc (Sigma Aldrich)

Funcția și secvențele denumirilor primerilor utilizate în expresia genelor sunt enumerate în Tabelul 2. Pliurile expresiei genei în raport cu o genă de referință EF1, au fost determinate în probele normalizate de către Rotor-Gene Q - QIAGEN, cu PowerSYBR®(AppliedBiosystems). Condițiile de ciclu au fost 95°C 5 min, apoi 42 de cicluri de: 95°C 5 sec, recoacere 10 sec, 72°C 20 sec. O atingere inițială a valorii de 1°C pe ciclu de la 65°C pentru primele 5 cicluri, a dus la o amplificare optimă pentru toți locii. Toate experimentele au fost efectuate în trei exemplare pentru trei măsurători diferite [7].

**Tabelul 2. Primerii utilizați pentru a analiza expresia genelor în Larve de *Galleria mellonella***

Primer	Proces	Funcție	Primer înainte	Primer invers
EF1	Factorul de alungire 1 -Alfa	de întreținere	AACTCCTTACAGTGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCCAG
Impi	Metaloproteinază	Gena țintă	TAGTAAGCAGTAGCATAGTCC	GCCATCTTCACAGTAGCA
Glut	Răspuns la stresul oxidativ,	Gena țintă	CCCACTGTGAGGCAACATT	GTTTGCTTAGCACGGTCACA
CytK	Reglarea citokinelor	Gena țintă	CGAGCTAAAGACAGGCGATT	TCACCTGCGGTTGAATCATA
Phag	Fagocitoză	Gena țintă	ATTGCTAGCCAGGTTTCAGGA	AGCTATTTGGCGGAACTCA

Prepararea supernatantului și a *S. aureus* utilizate în test sunt ilustrate în Figura 5.

**Supraviețuirea larvelor**

În comparație cu grupurile de control, supernatanții care au fost pre-incubați timp de o oră cu formulele de testare au fost mult mai puțin letali.

Astfel creșterea supraviețuirii a larvelor de *S. aureus* ATCC BAA1680 a atribuit acțiunea componentelor active.

În mod similar, după 4 ore de incubare, activitatea formulei de bază A a fost confirmată la un nivel mai mic, în timp ce formula D a confirmat cea mai mare supraviețuire a larvelor .

În ceea ce privește tulpina de *S. aureus* ATCC 29213, a fost confirmată și activitatea mai scăzută pentru formula de bază A față de celelalte formule testate. În acest caz, componentele active au produs o creștere mai mare de supraviețuire a larvelor respectând formula D, atât în pre-tratamente de 1 oră, cât și în 4 ore.

În total, aceste rezultate au sugerat că respectiv componentele active ar putea interfera cu patogeniza asociată toxinelor/cataboliților produși de *S. aureus* ATCC BAA1680. Mai mult, acțiunea ar putea fi apreciată deja după 1 oră de incubare atât pentru tulpini, cât și pentru tulpina de *S. aureus* ATCC

29213 intensitatea interferenței a rezultat mai mare cu cât este mai prelungită interacțiunea presupusă cu toxinele/cataboliții din supernatanți (Fig. 27-28).

În schimb, gena 18-wheeler a fost hipo-exprimată (99,98%) în grupul infectat, comparativ cu grupul tratat. Preincubarea LimpiAD, prin urmare, a crescut semnificativ expresia acestei gene implicate în

#### Testul expresiei genelor

Expresia celor două gene legate de stresul metabolic IMPI și GLUT nu a fost modificată semnificativ în comparație cu controlul în ambele grupuri, așa cum se evidențiază în Fig. 7. Prin urmare, LimpiAD nu modifică expresia acestor gene. Expresia celor două gene legate de imunitatea înăscută a fost exprimată diferit în grupul infectat decât în grupul tratat. Citokinele inflamatorii care reglează gena CITOK (cascada NF-kappa B) au fost supra-exprimate (93,8%) în grupul infectat comparativ cu grupul tratat. Prin urmare, LimpiAD a redus expresia citokinelor proinflamatorii.

**Tabelul 3. Expresia genei *G. mellonella's* în urma tratamentului cu LimpiAD/infectat**

GENĂ	% din expresie Tratat/infectat	Exprimare
IMPI	6,56%	Ipo-exprimat
GLUT	6,56%	Supraexprimat
CITOK	93,08%	Ipo-exprimat
18 wheeler	99,08	Ipo-exprimat

#### Concluzie

Infecțiile cu tulpini patogene de *Staphylococcus aureus* sunt considerate un factor dăunător în dermatita atopică deoarece aceste microorganisme, producătoare de cataboliți, stimulează eliberarea de citokine inflamatorii și contribuie la deteriorarea barierei epidermice și la manifestarea simptomelor caracteristice bolii.

Rezultatele obținute sugerează că respectiv componentele LimpiAD reduc efectul cataboliților produși de *S. aureus* asupra supraviețuirii larvelor de *G. mellonella* injectate.

Mai mult, tratamentul cu LimpiAD a redus expresia citokinelor proinflamatorii și a crescut expresia genei 18-wealer implicată în adeziunea și migrarea celulelor. Datele obținute din exprimarea stresului metabolic și a genelor de imunitate oferă dovezi suplimentare cu privire la mecanismul de acțiune al dispozitivului LimpiAD.

#### EXEMPLUL 5

##### Test Comparativ *in vitro*

Un test comparativ cu *C. acnes* DSM 28251 tindalizat față de alte tulpini de cutibacterium privind creșterea microorganismului patogen al pielii.

##### Scopul testului

Activitatea inhibitoare a bacteriilor ucise termic tulpina de *C. acnes* DSM 28251 asupra bacteriilor care colonizează pielea a fost comparată cu activitatea a patru tulpini diferite din aceeași specie (tulpini de *Cutibacterium* cu aceeași compoziție de peptidoglican) și o tulpină de *C. granulosum* care sunt foarte apropiate din punct de vedere evolutiv (proximitate filogenetică).

Scopul acestui studiu a fost de a evalua dacă tulpina de *C. acnes* DSM 28251 are proprietăți deosebite sau îmbunătățite în comparație cu alte specii cu proximitate filogenetică.

În acest scop, patru tulpini de *Cutibacterium* spp. (Trei *Cutibacterium acnes* și una *Cutibacterium granulosum*) care diferă de tulpina DSM 28251, fie prin filotip, fie prin distanța filogenetică, au fost alese și testate (tulpina testată).

În studiu au fost incluse și două tulpini de *C. acnes* (DSM 30738 și 30753) ale căror caracteristici nu sunt cunoscute, deși aparțin aceleiași specii ca și tulpina DSM 28251 din această invenție.

##### TULPINI TESTATE (*Cutibacterium* genus)

<i>Cutibacterium</i> spp.	Compoziție Peptidoglican (tip filotip murein)	Distanța filogenetică de la <i>C. acnes</i> DSM 28251 (omologie 16% 16S ADNr)
---------------------------	-----------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

C.acnes DSM 28251	A3γ LL-Dpm-Gly I	
1.C.acnes ATTC 11828	A3γ LL-Dpm-Gly II	99,9%
2.C.granulosum DSM 20458 ATTC 11829	A3γ LL-Dpm-Gly NA*	94,0%

3. C.acnes DSM	A3γ LL-Dpm-Gly I	99,9%
4. C.acnes DSM	A3γ LL-Dpm-Gly I	99,9%
5. C.acnes DSM	Nav*	Nav*
6. C.acnes DSM	Nav*	Nav*

NA\*: neatribuit. Clasificarea filotipurilor este disponibilă doar pentru tulpini de *C. acnes*.

Nav\*: nu este disponibil

#### MICROGANISME PATOGENE ALE PIELEI

5 Activitatea inhibitorie a celor șase tulpini de *Cutibacterium* de mai sus a fost testată împotriva următoarelor cinci microorganisme care sunt agenți patogeni ai pielii bine cunoscuți și reprezentați pe scară largă:

- *S. aureus* ATCC 29213
- *S. aureus* ATCC BAA-1680
- 10 • *S. aureus* DSM 20491
- *S. epidermidis* ATCC 12228
- *Candida albicans* ATCC 90028

#### MATERIALE ȘI METODE

##### Prepararea bacteriilor ucise termic (*Cutibacterium*)

15 *Cutibacterium* testat au fost distruși prin tindalizare (sterilizare fracționată).

Toate tulpinile de *Cutibacterium* au fost crescute în bulion BHI (Brain Heart Infusion) cu suplimentare de 20% la o temperatură de 37°C până la faza exponențială maximă de creștere verificată prin citire spectrofotometrică (O.D. 600 nm). Ulterior, mediul a fost îndepărtat prin centrifugare și prelucrat pentru testarea supernatantului. Peletul bacterian a fost spălat în soluție salină (NaCl 0,9%) până la îndepărtarea completă a oricărui supernatant rezidual și apoi diluat la o concentrație de 0,5McFarland (1,5x10<sup>8</sup>CFU/ml).

Inoculul titrat a fost supus tindalizării.

25 Procesul de tindalizare a implicat încălzirea la 80°C timp de 30 de minute pentru a distruge formele vegetative, urmată de o perioadă de incubare la 37°C timp de 24 de ore pentru a promova germinarea celulelor vegetative rămase care nu au fost ucise de tratamentul termic, apoi materialul a fost din nou adus la 80°C timp de 30 de minute. Întregul ciclu termic a fost repetat de 3 ori. O parte alicotă din materialul tindalizat a fost însămânțată pe Columbia Blood Agar și incubată la 37°C în aerobioză timp de 24 de ore pentru a verifica absența creșterii microbiene și implementarea corectă a procesului. Celulele bacteriene tindalizate au o capacitate de replicare și enzimatică inactivată, menținând în același timp structura și peretele celular, deci intacte din punct de vedere fiziologic și, din acest motiv, active imunologic.

##### Evaluarea activității tulpinilor ucise asupra creșterii microorganismelor patogene

Capacitatea tulpinilor de *C. acnes* ucise termic de a interfera și/sau inhiba cu/asupra creșterii tulpinilor de *Staphylococcus* testate și a unei tulpini de *C. albicans* a fost evaluată folosind o metodă spectrofotometrică.

35 Tulpinile ucise termic au fost testate folosind același mediu de creștere (bulion BHI, suplimentat cu 20% în concentrație) prin următoarea procedură: *Bacteriile ucise termic* au fost diluate anterior la concentrația finală de 10<sup>5</sup> CFU/ml și apoi inoculat cu microorganismele patogene ale pielii după cum urmează.

40 În triplu exemplar, 100 ul de culturi active de tulpini de *S. aureus* ATCC@ BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC® 29213™, *S. epidermidis* ATCC@ 12228™ și *C. albicans* ATCC® 90028™ testate au fost inoculate în godeurile fiecărui fragment. Fiecare tulpină bacteriană a fost crescută anterior în mediu BHI la 37°C până la stadiul de creștere exponențială și celulele au fost colectate prin centrifugare la 3000 rpm timp de 5 minute. Peletul a fost resuspendat în mediu BHI proaspăt pentru a obține suspensii cu o concentrație de 1 x 10<sup>5</sup> CFU/ml.

45 Aceste suspensii au fost utilizate ca inocule în godeurile plăcii cu 96 de godeuri.

Plăcile cu 96 de godeuri au fost preparate în trei exemplare, fiecare cu controale experimentale, adică tulpinile inoculează singure fără niciun fragment adăugat și „martorii” experimentului (mediu BHI cu fiecare fragment) pentru calibrarea spectrofotometrică.

50 Densitatea optică la 600 nm (O.D. 600 nm) a fost măsurată utilizând sistemul VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) și a fost considerată ca valoare de creștere la momentul zero (T0) pentru fiecare tulpină și tratament. Măsurătorile ulterioare au fost efectuate după 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 și 24 de ore în timpul perioadei de incubare. Valorile O.D. au fost normalizate față de martori și controale și apoi analizate pentru a evalua tendința de creștere a diferiților germeni cu/fără (CTR) fragmentele de perete. Rezultatele au fost raportate ca valoare medie ± S.D. (Deviația standard), iar curbele de creștere au fost obținute prin analiză

de regresie neliniară utilizând o funcție Sigmoidală adecvată creșterii bacteriene. Analizele au fost efectuate cu software-ul Graph Pad Prism versiunea 7.0a.

### REZULTATE

5 Curbele de creștere ale microorganismului patogen al pielii în prezența și absența (controlul) bacteriilor ucise termic ale *Tulpinilor de Cutibacterium* sunt prezentate în figura 9. O primă evaluare calitativă AUC arată că ucisă termic *C. acnes* DSM 28251 are un efect inhibitor îmbunătățit asupra creșterii microbiene pentru toate microorganismele patogene testate ale pielii.

10 Următorul Tabel 2a raportează o evaluare cantitativă a AUC pentru fiecare derivat față de toate microorganismele testate. Aceste valori confirmă ceea ce este arătat în Figura 9 în care bacteriile ucise termic obținute din *C. acnes* DSM 28251 arată o influență/activitate inhibitorie remarcabilă asupra creșterii tuturor microorganismelor cutanate testate.

15 Tab 2a. Valorile ariei sub curbă (AUC) și erorile standard relative (albastru deschis) ale curbelor de creștere prezentate în figura 2 cu/fără bacterii ucise termic (de control). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul valorilor AUC: de la valoarea AUC minoră (roșu închis) la valoarea AUC majoră (verde închis).

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Control
				ATCC 11829					
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Suprafața totală	11,92	15,18	14,54	13,26	13,02	14,11	14,72	15,55
	Eroare Std.	0,61	0,25	0,18	0,28	6,27	6,33	0,13	0,57
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	Suprafața totală	12,38	13,13	15,01	13,39	12,71	13,40	14,54	15,55
	Eroare Std.	0,40	0,52	0,42	0,39	0,31	0,48	0,54	0,58
<i>S. aureus</i> DSM 20491	Suprafața totală	9,16	11,33	10,86	10,15	9,55	10,86	11,04	11,38
	Eroare Std.	0,56	0,23	0,14	0,25	0,16	0,32	0,19	0,25
<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	Suprafața totală	14,83	16,37	16,67	15,58	15,20	15,88	15,60	17,62
	Eroare Std.	0,55	0,18	0,34	0,51	0,24	0,11	0,44	0,98
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Suprafața totală	12,94	15,24	15,66	14,87	15,12	14,98	13,81	18,81
	Eroare Std.	0,60	6,47	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	0,58

Reducerea procentuală a creșterii în comparație cu condițiile de control este prezentată în următorul Tabel 2b. Aceste date confirmă rezultatele discutate mai sus, evidențiind activitatea îmbunătățită a *C. acnes* DSM 28251 ucisă termic față de tulpinile comune de *C. acnes*.

20

Tab 2b. Procent de creștere în scădere față de starea de control (fără inocul de bacterii ucise termic). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul de scădere: de la scădere majoră (roșu închis) la scădere minoră (verde închis) a creșterii (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
			ATCC 11829				
<i>S. aureus</i> ATCC29213	23,344	2,379	6,495	14,727	16,270	9,260	5,338
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	20,386	2,572	3,473	13,891	18,264	13,826	6,495
<i>S. aureus</i> DSM 20491	19,135	0,439	4,148	10,415	15,719	4,148	2,560
<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	15,834	7,094	5,392	11,578	13,734	9,875	11,464
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	31,207	18,979	16,746	20,946	19,617	20,362	26,582

**EXEMPLUL 6**

Testul comparativ din Exemplul 5 a fost repetat folosind postbiotice/supernatanți din toate tulpinile de *C. acnes* (în loc de tulpinile ucise termic din Exemplul 5).

**5 Scopul testului**

Activitatea inhibitorie a postbioticelor/supernatanților obținute(i) din aceleași șase tulpini de *Cutibacterium* din Exemplul 5 pe aceleași microorganisme patogene ale pielii din Exemplul 5 au fost comparate.

10 Scopul acestui studiu a fost de a evalua dacă un postbiotic din tulpină *C. acnes* DSM 28251 are o activitate inhibitoare îmbunătățită asupra microorganismului patogen al pielii în comparație cu postbioticele din specia *C. acnes* din Exemplul 5.

**MATERIAL ȘI METODE**

Prepararea postbioticului de *C. acnes* DSM 28251.

15 Supernatanții bacterieni obținuți anterior din tulpini de *Cutibacterium* au fost supuse la filtrare (filtre de 0,22 μm) pentru a îndepărta orice reziduuri celulare; sterilitatea a fost confirmată prin absența creșterii bacteriene după inocularea pe Columbia Blood Agar și incubarea la 37°C în aerobioză timp de 24 de ore dintr-o alicotă din fiecare supernatant investigat.

20 Pentru a exclude orice interferență datorată producerii de substanțe acide tipice unor tulpini de *Cutibacterium* spp., pH-ul fiecărui supernatant a fost măsurat cu atenție și, dacă este necesar, neutralizat cu o soluție de hidroxid de sodiu 1M.

Evaluarea spectrofotometrică a activității postbioticelor asupra creșterii microorganismelor patogeni.

25 Capacitatea postbioticului care provine din tulpinile de *C. acnes* la care se face referire în Exemplul 5 de a interfera și/sau inhiba cu/asupra creșterii aceluiași tulpini de *Staphylococcus* și a unei tulpini de *C. albicans* raportate în Exemplul 5 a fost evaluată utilizând o metodă spectrofotometrică.

Postbioticele au fost testate folosind același mediu de creștere din Exemplul 5 (bulion BHI, suplimentat cu 20% în concentrație) prin următoarea procedură: Supernatanții au fost diluați într-o proporție de 1:10 în bulion BHI și apoi incubăți cu microorganisme cutanate testate.

30 În trei exemplare, 100 ul de culturi active de microorganisme patogene ale pielii *S. aureus* ATCC@ BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC® 29213™, *S. epidermidis* ATCC® 12228™ și *C. albicans* ATCC® 90028™ au fost inoculate în godeuri. Fiecare tulpină bacteriană a fost crescută anterior în mediu BHI la 37°C până la stadiul de creștere exponențială și celulele au fost colectate prin centrifugare la 3000 rpm timp de 5 minute. Peletul a fost resuspendat în mediu BHI proaspăt pentru a obține suspensii cu o concentrație de  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

Aceste suspensii au fost utilizate ca inocule în godeurile plăcii cu 96 de godeuri.

Plăcile cu 96 de godeuri au fost preparate în trei exemplare, fiecare cu controale experimentale, adică tulpini inocul singure, și „martorii” de experiment (mediu BHI cu fiecare fragment) pentru calibrarea spectrofotometrică.

40 Densitatea optică la 600 nm (O.D. 600 nm) a fost măsurată utilizând sistemul VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) și a fost considerată ca valoare de creștere la momentul zero (T0) pentru fiecare tulpină și tratament. Măsurătorile ulterioare au fost efectuate după 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 și 24 de ore în timpul perioadei de incubare. Valorile O.D. au fost normalizate față de martori și controale și apoi analizate pentru

a evalua tendința de creștere a diferiților germeni cu/fără (CTR) fragmente de perete. Rezultatele au fost raportate ca valoare medie  $\pm$  S.D. (Deviația standard), iar curbele de creștere au fost obținute prin analiză de regresie neliniară utilizând o funcție Sigmoidală adecvată creșterii bacteriene. Analizele au fost efectuate cu software-ul Graph Pad Prism versiunea 7.0a.

## 5 REZULTATE

Curbele de creștere ale microorganismului patogen al pielii în prezența și absența (controlul) postbioticului tulpinii *C. acnes* DSM 28251 sunt prezentate în Figura 8.

10 O primă evaluare calitativă a AUC (Aria de sub curbă) arată că probioticul (supernatantul) obținut din tulpină *C. acnes* DSM 28251 are cea mai mare acțiune inhibitoare asupra creșterii microbiene pentru majoritatea microorganismelor patogene testate.

Tabelul 1a prezintă evaluarea cantitativă AUC pentru fiecare supernatant. Aceste valori confirmă ceea ce s-a demonstrat în Figura 1. Într-adevăr, postbioticul/supernatantul de *C. acnes* DSM 28251 inhibă creșterea tuturor bacteriilor cutanate testate mai mult decât ceilalți supernatanți testați, cu singura excepție a *C. albicans* ATCC 90028 (care este inhibat de derivatul DSM 30738).

15

Tabelul 1a

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Control
				ATCC 11829					
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Suprafața totală	1,86	5,24	3,35	3,916	3,29	4,11	3,63	14,58
	Eroare Std.	0,07	0,3	0,51	0,06	0,14	0,61	0,58	1,02
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	Suprafața totală	2,16	5,23	5,96	3,89	3,36	4,16	4,09	14,61
	Eroare Std.	0,34	0,33	0,81	0,06	0,52	0,61	0,52	1,02
<i>S. aureus</i> DSM 20491	Suprafața totală	1,86	4,87	3,34	3,35	3,27	3,51	3,57	7,57
	Eroare Std.	0,07	0,15	0,52	0,53	0,138	0,387	0,575	1,12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Suprafața totală	3,74	12,39	16,00	4,97	4,07	6,36	6,38	17,09
	Eroare Std.	0,75	0,76	0,37	0,62	0,35	0,82	0,48	0,33
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Suprafața totală	8,37	22,35	23,74	8,37	8,70	7,19	7,79	30,47
	Eroare Std.	0,67	0,21	1,22	0,56	0,15	0,44	0,35	0,46

20 Tab 1a. Valorile ariei sub curbă (AUC) și erorile standard relative (albastru deschis) ale curbelor de creștere prezentate în figura 1 cu/fără supernatant bacterian (de control). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul valorilor AUC: de la valoarea AUC minoră (roșu închis) la valoarea AUC majoră (verde închis).

25 Procentul de reducere a creșterii *contra* condițiilor de control obținute de supernatanții testați sunt prezentate în Tabelul 1b. Aceste date confirmă, de asemenea, rezultatele discutate până acum, subliniind în continuare faptul că activitatea supernatantului DSM 30738 pe tulpina de *C. albicans* ATCC 90028 este doar puțin mai mare și, prin urmare, este comparabilă cu cea a supernatantului *C. acnes* DSM 28251.

Tab 1b. Procent de creștere în scădere față de starea de control (fără inocul de supernatant). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul de scădere: de la scădere majoră (roșu închis) la scădere minoră (verde închis) a creșterii (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
			ATCC 11829				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	87,22	64,05	77,01	73,14	77,45	71,80	75,09
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	85,24	64,18	59,23	73,40	76,99	71,54	72,00
<i>S. aureus</i> DSM 20491	75,44	35,70	55,92	55,79	56,82	53,63	52,88
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	78,12	27,50	6,38	70,93	76,16	62,86	68,52
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	72,52	26,65	22,09	72,54	71,46	76,40	74,43

## REZULTATE

O primă evaluare calitativă AUC arată că postbioticul/supernatantul de *C. acnes* DSM 28251 are un efect inhibitor îmbunătățit asupra creșterii microbiene pentru toate microorganismele patogene testate ale pielii.

### EXEMPLUL 7

Testul comparativ din Exemplul 5 a fost repetat folosind fragmente de perete celular din toate tulpinile testate de *C. acnes* (în loc de tulpinile ucise termic din Exemplul 5).

#### Scopul testului

Scopul acestui test a fost să compare activitatea inhibitorie a fragmentelor de perete ale acelorași șase tulpini de *Cutibacterium* din Exemplul 5 pe aceleași microorganisme patogene ale pielii din Exemplul 5.

Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua dacă un fragment de perete din tulpina de *C. acnes* DSM 28251 are o activitate inhibitoare îmbunătățită asupra microorganismului patogen al pielii în comparație cu fragmentul de perete bacterian al speciilor comparative de *C. acnes* din Exemplul 5.

## MATERIAL ȘI METODE

### Prepararea fragmentelor de perete ale *C. acnes* DSM 28251 și ale tulpinilor *C. acnes* comparative.

Tulpina de *C. acnes* DSM 28251 și tulpinile de *Cutibacterium* ATCC@ 11829, DSM 16379, DSM 30738, DSM 30753 și DSM 1897, au fost crescute la 37°C în mediu BHI suplimentat cu 20% în concentrație.

Cultivarea s-a desfășurat în sisteme discontinue și de scalare de la volume de 5 la 1000 ml și s-a prelungit până la obținerea unei mase celulare consistente (adică 2 zile în volumul mai mare de inocul). Peletele bacteriene obținute au fost apoi colectate și supuse procedurii standardizate pentru a obține fragmentul de perete de interes, așa cum este descris în continuare. În continuare, fragmentele izolate vor fi menționate cu codul de catalogare al tulpinilor de derivație.

Mai exact, izolarea fragmentelor de perete a fost realizată după cum este descris în continuare.

Peleta bacteriană a fost supusă anterior procedurii de delipidare prin tratament Soxhlet folosind un solvent organic (de exemplu, eter-etanol, cloroform, metanol-cloroform, amestecuri ale acestora) solvenți ulterior; apoi s-a uscat sub fluxul laminar de capotă. După uscare, peletul a fost omogenizat prin 2 etape de tratament Ultraturrax (20 secunde până la 10 min fiecare), adăugând apă distilată (în proporție de 1:2 p/V). După centrifugare, supernatantul a fost încălzit la 80°C și apoi răcit sub apă rece, de preferință la 3 până la 15°C, și în final pe gheață. Ulterior, etapa de precipitare a fragmentelor a fost efectuată incubând cu 15-40% v/v sulfat de amoniu rece timp de 24 de ore la 4°C. După incubare, suspensia a fost centrifugată, iar fragmentul precipitat a fost colectat și liofilizat.

Specimenele liofilizate au fost în final sterilizate prin procedură *ad-hoc* în mai multe etape (-80°C ultra-congelare, 80°C supraîncălzire, 1 oră sterilizare U.V.). În cele din urmă, au fost folosite pentru a configura experimentul, după cum este descris mai jos.

### Evaluarea spectrofotometrică a activității postbioticelor asupra creșterii microorganismelor patogene.

Activitatea fragmentelor de perete care provin din tulpinile de *C. acnes* (vezi mai sus) de a interfera și/sau inhiba cu/asupra creșterii acelorași tulpini de *Staphylococcus* și a unei tulpini de *C. albicans* raportate în Exemplul 5 a fost evaluată utilizând o metodă spectrofotometrică.

Fragmentele de perete au fost testate folosind același mediu de creștere din Exemplul 5 (bulion BHI, suplimentat cu 20% în concentrație) prin următoarea procedură: Fragmentele de perete au fost pulverizate și emulsionate în mediu de creștere BHI la concentrația finală de 10 mg/ml. S-au adăugat alicote de 100  $\mu$ l la godeurile plăcilor cu fund plat cu 96 de godeuri.

5 În triplicat, 100  $\mu$ l de culturi active de microorganisme patogene ale pielii *S. aureus* ATCC@ BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC@ 29213™, *S. epidermidis* ATCC@ 12228™ și *C. albicans* ATCC@ 90028™ au fost inoculate în godeurile fiecărui fragment. Fiecare tulpină bacteriană a fost crescută anterior în mediu BHI la 37°C până la stadiul de creștere exponențială și celulele au fost colectate prin centrifugare la 3000 rpm timp de 5 minute. Peletul a fost resuspendat în mediu BHI proaspăt pentru a  
10 obține suspensii cu o concentrație de  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

Aceste suspensii au fost utilizate ca inocule în godeurile plăcii cu 96 de godeuri.

Plăcile cu 96 de godeuri au fost preparate în trei exemplare, fiecare cu controale experimentale, adică tulpinile inoculează singure fără niciun fragment adăugat și „martorii” experimentului (mediu BHI cu fiecare fragment) pentru calibrarea spectrofotometrică.

15 Densitatea optică la 600 nm (O.D. 600 nm) a fost măsurată utilizând sistemul VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) și a fost considerată ca valoare de creștere la momentul zero (T0) pentru fiecare tulpină și tratament. Măsurătorile ulterioare au fost efectuate după 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 și 24 de ore în timpul perioadei de incubare. Valorile O.D. au fost normalizate față de martori și controale și apoi analizate pentru a evalua tendința de creștere a diferiților germeni cu/fără (CTR) fragmente de perete. Rezultatele au fost  
20 raportate ca valoare medie  $\pm$  S.D. (Deviația standard), iar curbele de creștere au fost obținute prin analiză de regresie neliniară utilizând o funcție Sigmoidală adecvată creșterii bacteriene. Analizele au fost efectuate cu software-ul Graph Pad Prism versiunea 7.0a.

#### REZULTATE (fragmente de perete *C. acnes*)

25 Curbele de creștere ale bacteriilor cutanate cultivate cu și fără (CTR) ale diverselor fragmente de perete testate sunt prezentate în Figura 10. Pe baza unei evaluări calitative preliminare a parametrului „Area de sub curbă” (AUC) se evidențiază cum pentru majoritatea germeilor de piele testați, fragmentul DSM 28251 produce cea mai mare acțiune inhibitorie asupra creșterii microbiene.

În schimb, în următorul tabel 3a sunt raportate rezultatele unei evaluări cantitative a aceluiași parametru AUC pentru toți germeii cutanați testați. Valorile AUC calculate confirmă ipoteza formulată prin evaluarea calitativă. Fragmentul de perete celular al bacteriei DSM 28251 a demonstrat un efect inhibitor mai mare asupra creșterii bacteriilor decât celelalte fragmente testate.  
30

Aprofundând estimarea inhibiției creșterii, valorile prezentate în Tabelul 3b reprezintă procentele de reducere a creșterii (%) față de starea de control a fiecărei tulpini care este considerată ca fiind 100% din rata de creștere în condițiile experimentale specifice. Compararea reducerilor procentuale de creștere a  
35 fost în concordanță cu concluzia discutată mai sus despre efectul inhibitor mai mare al fragmentului de tulpină DSM 28251.

Deși fragmentul obținut din tulpina de *C. acnes* DSM 30738 demonstrează valori apropiate de inhibiție în comparație cu fragmentul DSM 28251, procentul de inhibiție al acestuia din urmă rezultând întotdeauna mai mare, de asemenea cu o performanță mai bună împotriva tulpinii de *S. aureus* ATCC BAA-1680 (82, 43% pentru DSM 30738 vs 94,95% pentru DSM 28251).  
40

**Fila 3a.** Valorile ariei de sub curbă (AUC) și erorile standard relative (albastru deschis) ale curbelor de creștere sunt prezentate în figura 3 cu/fără fragmente de perete bacterian (de control). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul valorilor AUC: de la valoarea AUC minoră (roșu închis) la valoarea AUC majoră (verde închis).

s		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Control
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Suprafața totală	0,20	1,13	2,23	6,63	2,89	0,70	3,19	11,73
	Eroare Std.	0,11	0,15	0,24	0,22	0,16	0,15	0,28	0,26
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	Suprafața totală	0,57	1,66	1,09	3,87	1,53	1,99	1,99	11,34
	Eroare Std.	0,31	0,088	0,11	0,32	0,16	0,20	0,082	0,31

s		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Control
<i>S. aureus</i> DSM 20491	Suprafața totală	0,36	1,47	1,35	5,40	2,14	0,39	2,72	11,26
	Eroare Std.	0,35	0,16	0,16	0,32	0,28	0,15	0,24	0,23
<i>S. epidermidis</i> â ATCC 1228	Suprafața totală	0,15	1,27	2,14	2,21	1,07	0,15	1,21	6,03
	Eroare Std.	0,34	0,18	0,34	0,33	0,17	0,32	0,15	0,20
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Suprafața totală	0,03	1,27	1,15	0,48	1,20	0,03	0,90	7,35
	Eroare Std.	0,10	0,35	0,35	1,20	0,12	0,28	0,33	0,22

**Tab 3b.** Procent de creștere în scădere față de starea de control (fără inocul de fragment). Scala de culori pentru fiecare tulpină indică intervalul de scădere: de la scădere majoră (roșu închis) la scădere minoră (verde închis) a creșterii (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	98,29	90,38	80,99	43,44	75,32	94,02	72,83
<i>S. aureus</i> BAA-1680	94,95	85,36	90,39	65,89	86,49	82,43	82,41
<i>S. aureus</i> DSM 20491	96,82	86,96	88,03	52,02	80,96	96,54	75,84
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	97,49	78,86	64,54	63,28	82,16	97,46	79,99
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	99,63	82,67	84,34	93,46	83,61	99,54	87,70

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

AILEENS PHARMA SRL  
Via Donatori di Sangue 1  
28834 Nova Milanese (MB)  
Italy

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <b>ULTIMO</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <b>DSM 28251</b>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:  <input type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on <b>2013-12-18</b> (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on <b>2013-12-18</b> (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on <b>2019-12-22</b> (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorised official(s):  <i>K. F. F. F.</i> Date: <b>2020-01-20</b>

Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- W FRANCUZIK ET AL: "Propionibacterium acnes Abundance Correlates Inversely with Staphylococcus aureus: Data from Atopic Dermatitis Skin Microbiome", ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA., vol. 98, no. 5, 30 January 2018 (2018-01-30), pages 490-495, XP055720700, United Kingdom ISSN: 0001-5555, DOI: 10.2340/00015555-2896
- WO-A1-2015/106175
- JP-A- H0 987 134
- MUYA SHU ET AL: "Fermentation of Propionibacterium acnes, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus", PLOS ONE, vol. 8, no. 2, 6 February 2013 (2013-02-06), pages 1-11, XP055356917, DOI: 10.1371/journal.pone.0055380
- DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 2011, SATO TAKASHI ET AL: "Augmentation of gene expression and production of promatrix metalloproteinase 2 by Propionibacterium acnes-derived factors in hamster sebocytes and dermal fibroblasts: a possible mechanism for acne scarring.", Database accession no. NLM21415544 & SATO TAKASHI ET AL: "Augmentation of gene expression and production of promatrix metalloproteinase 2 by Propionibacterium acnes-derived factors in hamster sebocytes and dermal fibroblasts: a possible mechanism for acne scarring.", BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN 2011, vol. 34, no. 2, 2011, pages 295-299, ISSN: 1347-5215

**(57) Revendicări:**

1. O tulpină bacteriană, care este *Cutibacterium acnes* depusă sub depozit nr. de acces DSM 28251 la Autoritatea Internațională de Depozit Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

2. Un produs postbiotic care cuprinde celule ucise termic sau supernatantul celulelor lizate mecanic sau fragmente de perete celular din tulpina bacteriană conform revendicării 1. 3. Produs postbiotic conform revendicării 2, în care celulele lizate sunt obținute prin liza mecanică a peretelui celular.

4. Fragment al peretelui celular al tulpinii bacteriene conform revendicării 1.

5. Tulpina bacteriană conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** este inactivată, preferabil prin tindalizare.

6. Tulpina bacteriană conform revendicării 1 sau produsul postbiotic conform revendicării 2 sau un fragment de perete celular conform revendicării 4 pentru utilizare ca medicament.

7. O compoziție care cuprinde o cantitate eficientă de *Cutibacterium acnes* depusă sub depozit nr. de acces DSMZ 28251 conform revendicării 1, sau un produs postbiotic al acestuia conform revendicării 2 sau un fragment al peretelui celular al acestuia conform revendicării 4 și un purtător acceptabil fiziologic.

8. Compoziție conform revendicării 7 în care compoziția este o compoziție topică, de preferință sub formă de cremă, spumă, unguent, pastă, pulbere, gel, soluție, ovul, duș sau emulsie.

9. Compoziție conform revendicării 7 pentru utilizare ca medicament.

10. Compoziție conform revendicării 7 pentru utilizare în tratamentul unei boli sau infecții inflamatorii sau alergice.

11. Compoziție conform revendicării 7 pentru utilizare în tratamentul topic al unei boli inflamatorii sau alergice a pielii sau mucoasei.

12. Compoziție pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 10-11 în prevenirea sau tratamentul unei infecții bacteriene sau fungice ale pielii sau mucoaselor.

13. Compoziție pentru utilizare conform revendicării 12, în care boala de piele este eczemă, dermatită atopică, acnee, dermatită seboreică, rozacee, psoriazis, eritem, erupție cutanată.

14. Compoziție pentru utilizare conform revendicării 12 pentru tratamentul unei infecții fungice a pielii sau mucoasei, în special infecția cu Candida.

15. Compoziție conform revendicării 7 sau 8 pentru utilizare în tratamentul unei boli ginecologice care este o infecție vaginală, o inflamație.

16. Compoziție pentru utilizare conform revendicării 15 în care boala ginecologică este vaginita.

**17.** Compoziție conform revendicării 7 sau 8 pentru utilizare proctologică în tratamentul hemoroizilor, rahadelor anale sau cicatricilor cutanate.

**18.** Compoziție conform revendicării 7 sau 8 pentru utilizare în tratamentul rănilor, rănilor, abraziunii, ulcerațiilor pielii sau ulcerelor de presiune sau pentru vindecarea rănilor.

**19.** Un produs postbiotic care este supernatantul total care poate fi obținut printr-un proces fermentativ al tulpinii bacteriene conform revendicării 1.

FIGURA 1

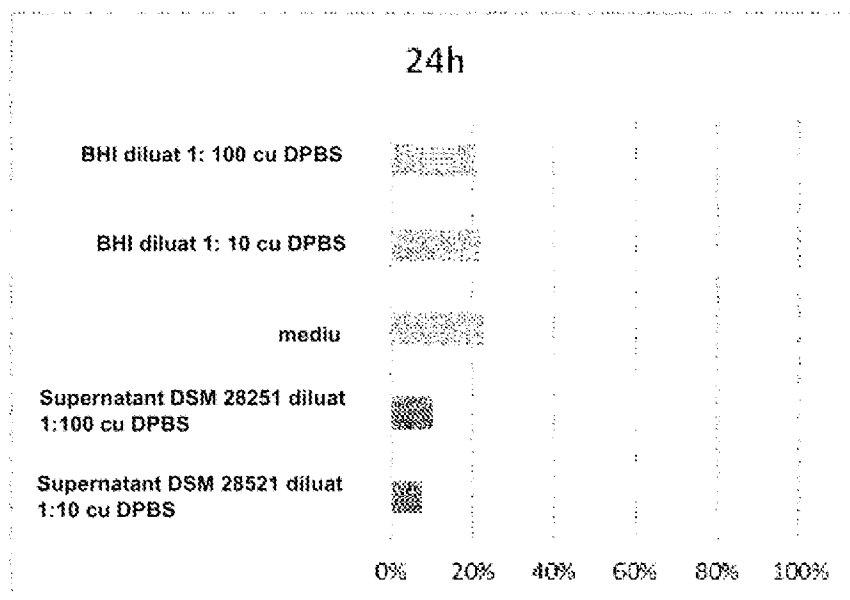
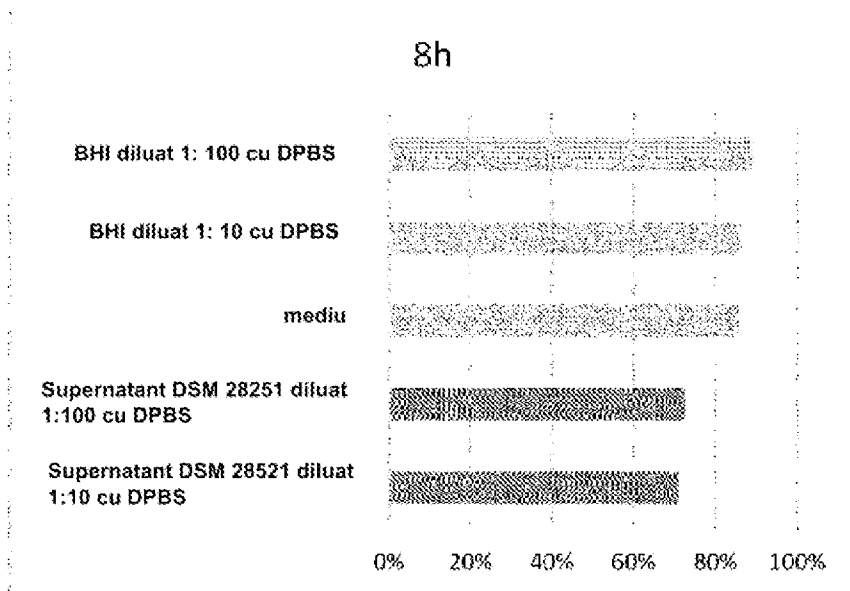
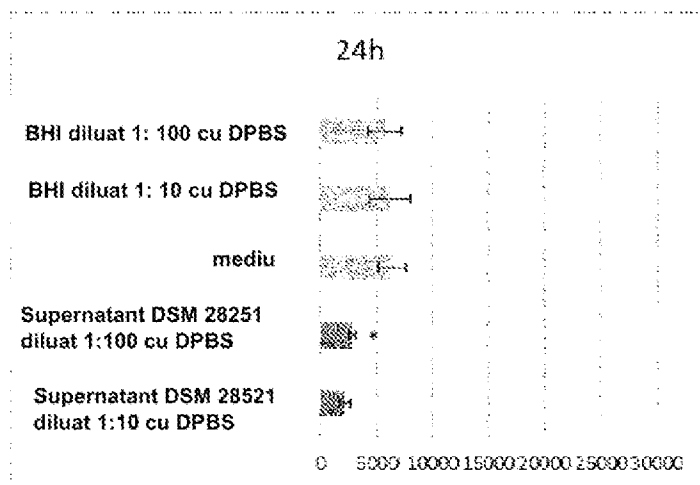
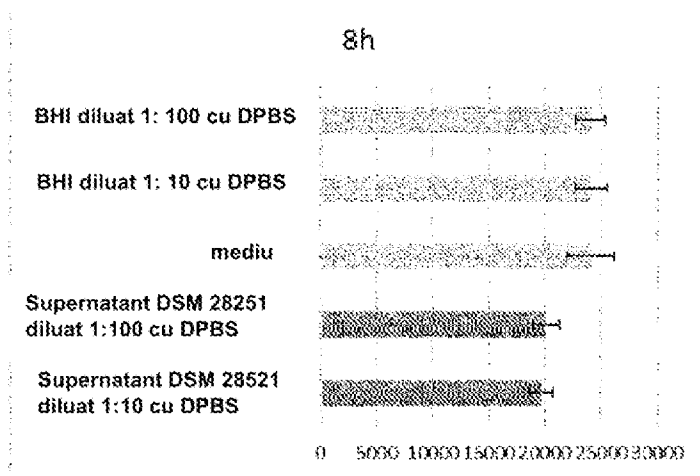


FIGURA 2



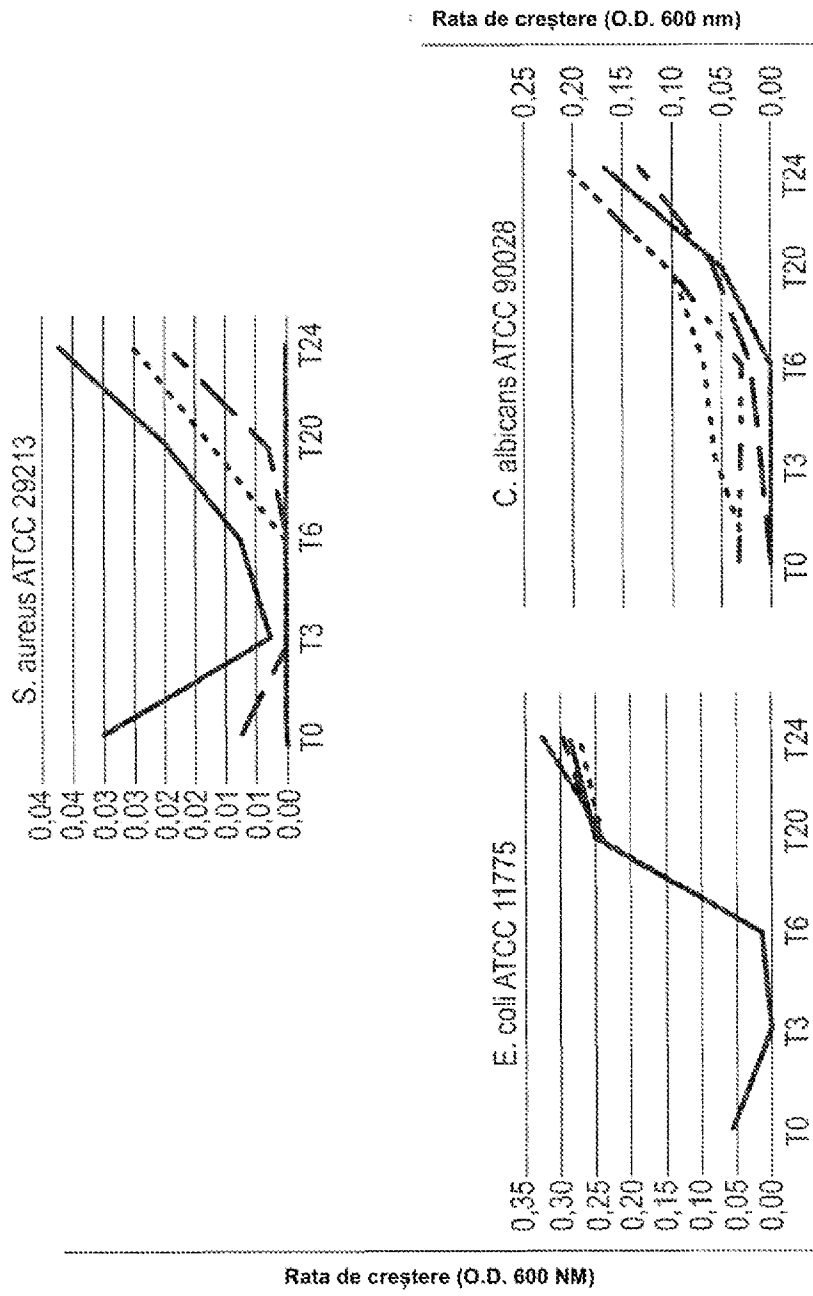
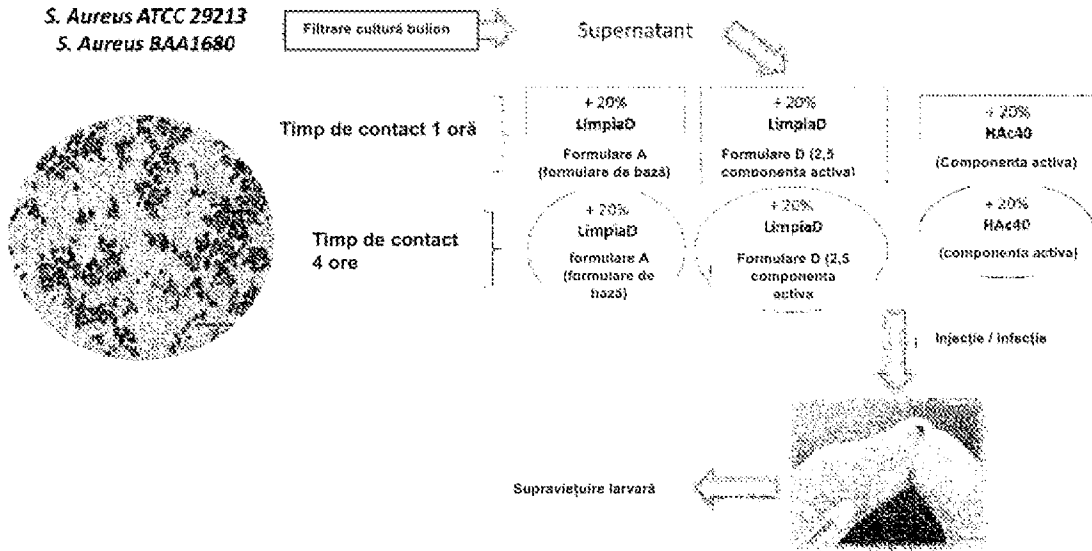
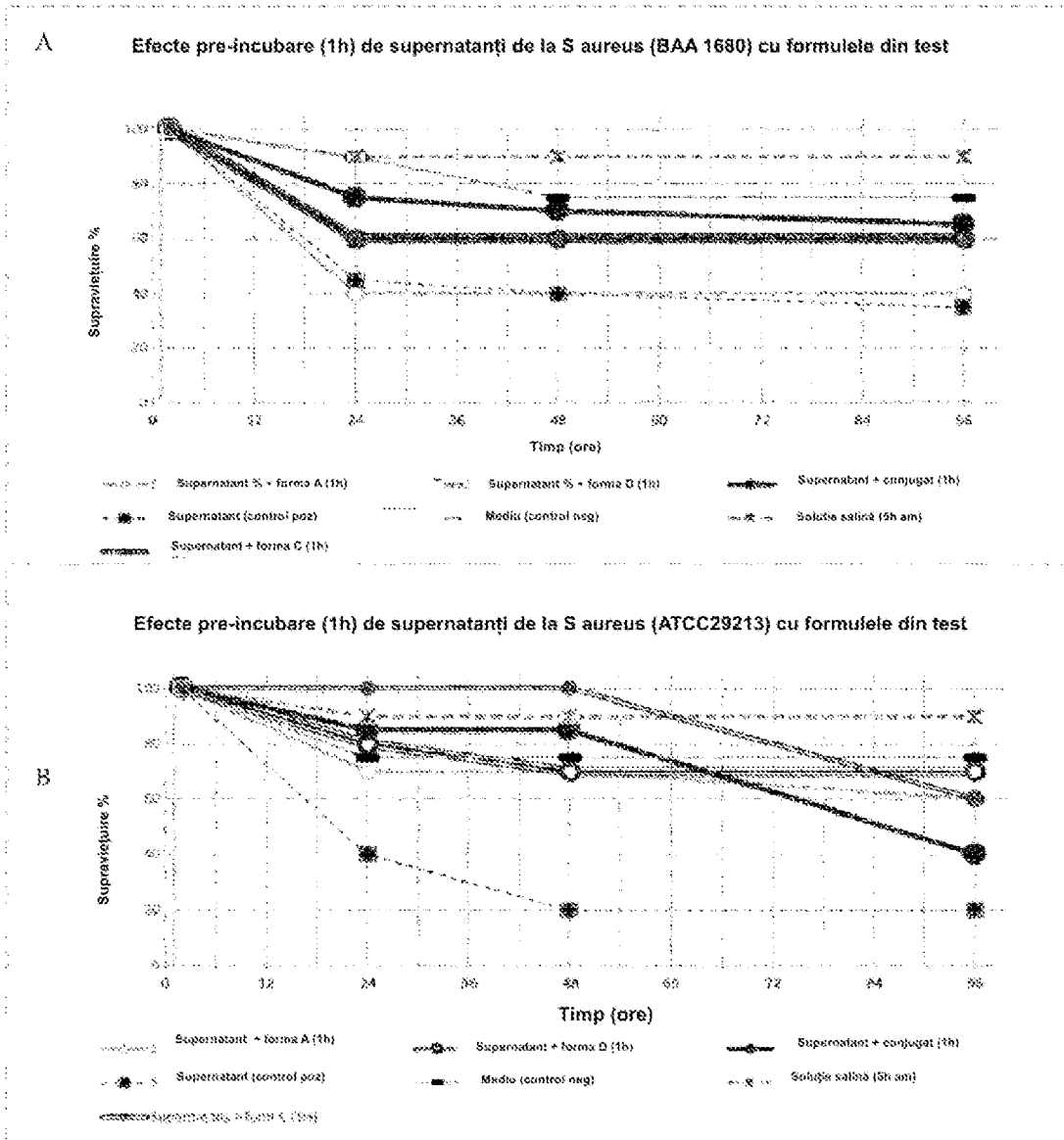


Fig. 3

FIG. 4



FIGURILE 5A ȘI 5 B

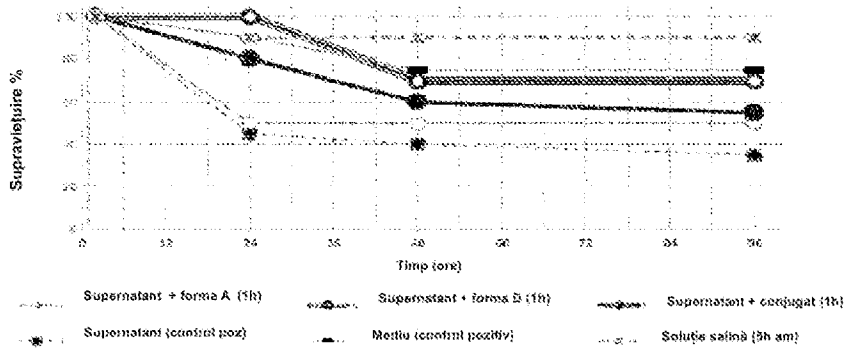


Supernatant + forma C (1h)

FIGURILE 6A ȘI 6B

Efecte preincubare (4h) de supernatanți de la *S aureus* (BAA1680) cu formulele din test

A



Efecte preincubare (4h) de supernatanți de la *S aureus* (ATTC29213) cu formulele din test

B

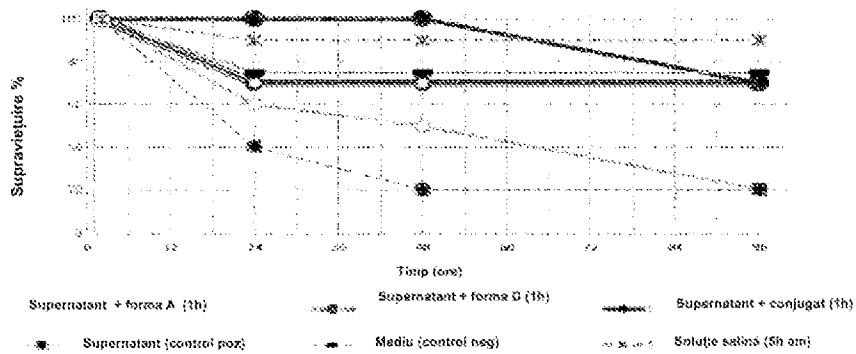
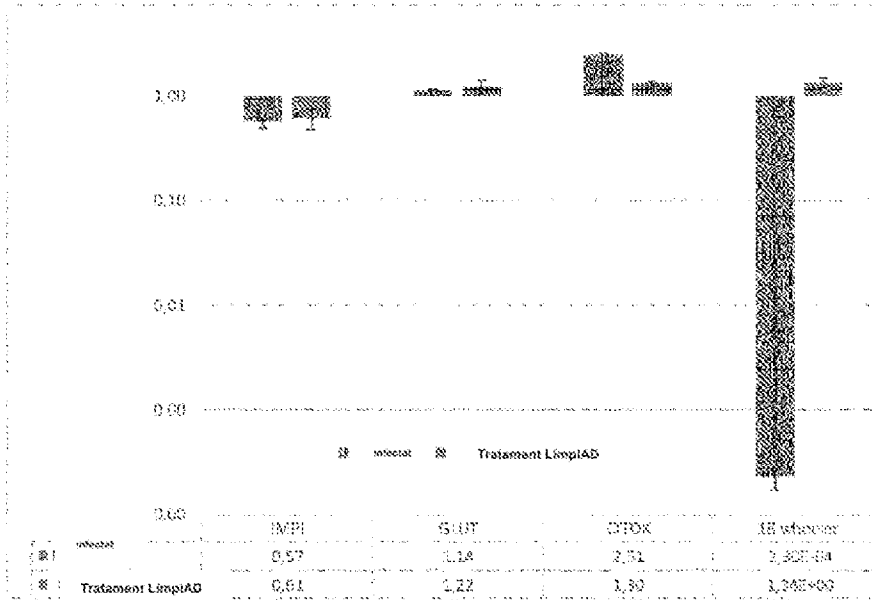


FIGURA 7



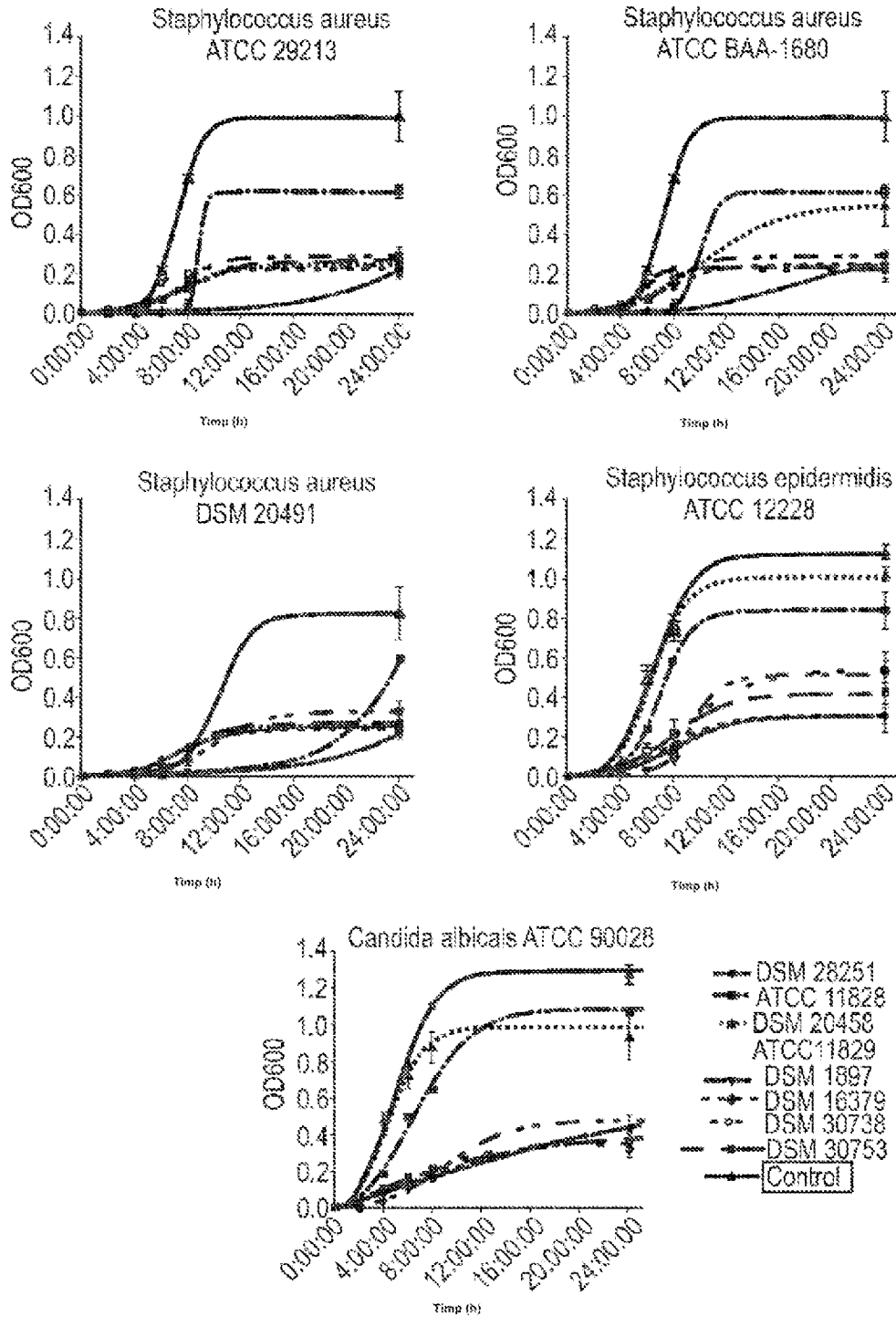


Fig. 8

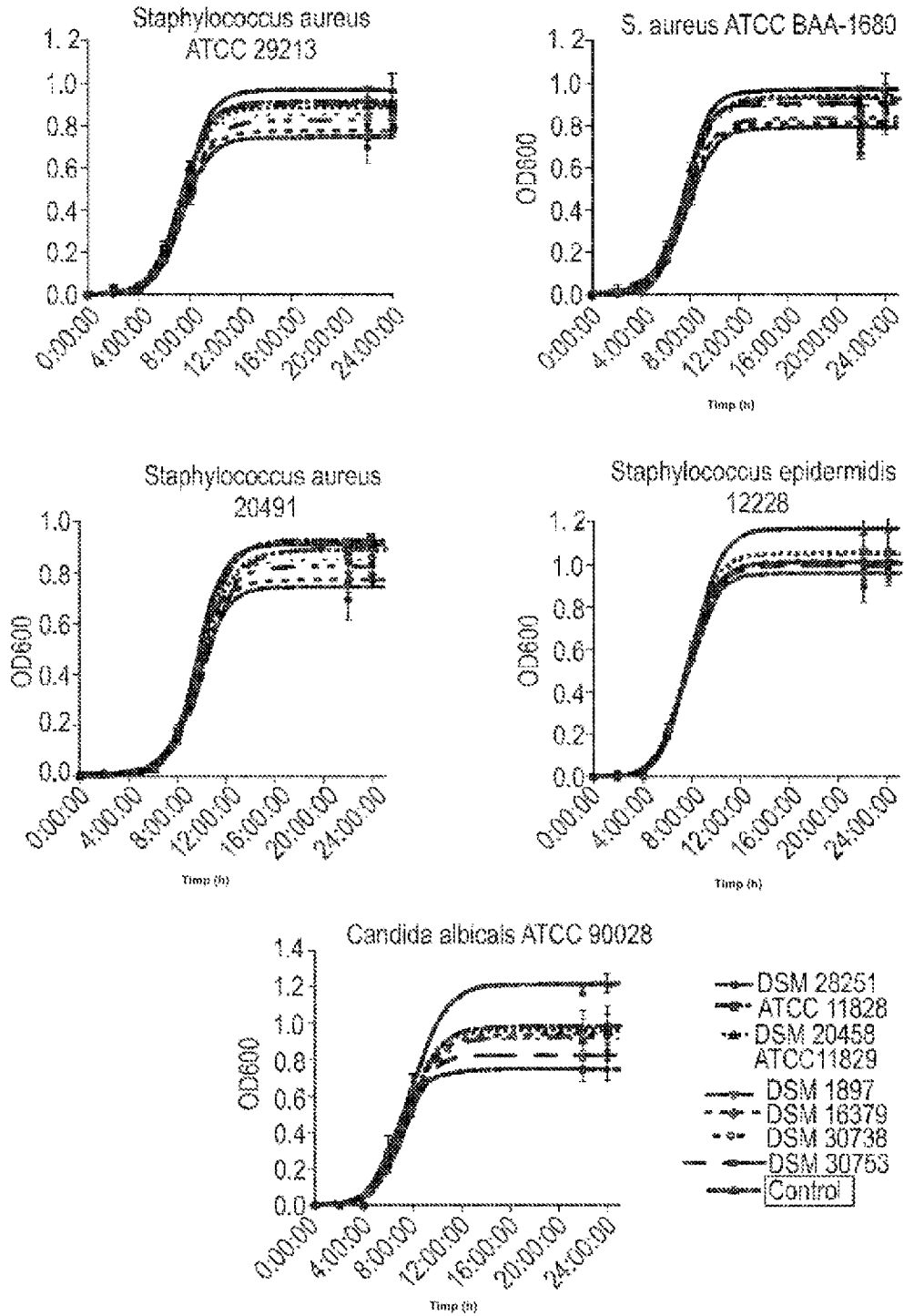


Fig. 9

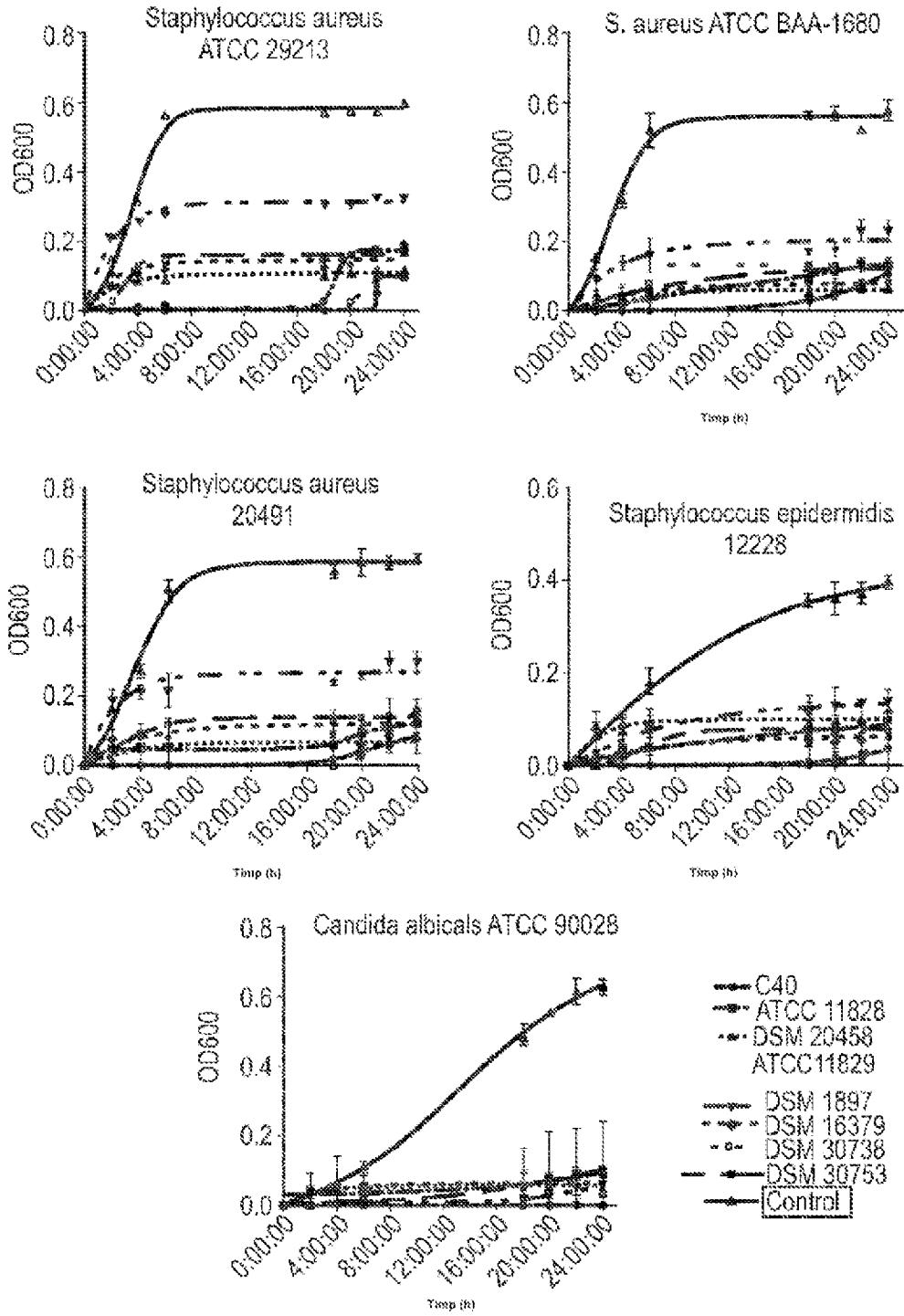


Fig. 10