

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 994 459**

(51) Int. Cl.:

A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01)
A61K 8/99 (2007.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2019 PCT/EP2019/081546**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2020 WO20099663**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2019 E 19800907 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3880304**

(54) Título: **Composiciones para el tratamiento de enfermedades de la piel asociadas a estrés oxidativo y envejecimiento de la piel**

(30) Prioridad:

16.11.2018 EP 18206646

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2025

(73) Titular/es:

**S-BIOMEDIC NV (100.00%)
Suzanne Tassierstraat 1
9052 Gent, BE**

(72) Inventor/es:

LOOD, ROLF

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 994 459 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para el tratamiento de enfermedades de la piel asociadas a estrés oxidativo y envejecimiento de la piel

5 **Campo técnico**

Los aspectos de la invención están ampliamente en los campos médico y cosmético y más específicamente se refieren a métodos, usos y composiciones para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades de la piel asociadas a estrés oxidativo o para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La piel humana está expuesta constantemente a estrés oxidativo y radicales libres, tal como a altas cantidades de especies de oxígeno reactivo (ROS), derivadas entre otros de reacciones metabólicas ordinarias y a la exposición continua al aire, radiación UV solar o artificial, contaminantes ambientales, así como agentes físicos y/o químicos (por ejemplo, cosméticos).

20 Bajo las condiciones fisiológicas, una producción endógena de agentes reductores tal como glutationa S-transferasa y glutationa reductasa protege la piel humana de estrés oxidativo excesivo. Bajo condiciones patológicas, sin embargo, la producción de ROS puede volverse demasiado grande y en consecuencia contribuir a la patogénesis de, por ejemplo, psoriasis (Kadam *et al.* 2010 Indian J Clin Biochem 25:388-392) o cáncer de piel (Sander *et al.* 2003 Br J Dermatol 148:913-922). Los cánceres de piel no de melanoma, incluyendo carcinoma de células escamosas y carcinoma de células basales, presentan no solo aumento de evidencia de estrés oxidativo, sino también de la función antioxidante endógena deteriorada (Sander *et al.* 2003).

25 El daño oxidativo provocado por radicales libres tal como ROS también es una causa principal de envejecimiento físico en general, y de la piel en particular. Aunque la piel está equipada con un sistema antioxidante elaborado que la proteja de daño oxidativo, el combinado de antioxidantes naturales puede verse comprometido con la edad, o ser superado por el estrés oxidativo, por ejemplo, debido a exceso de exposición a UV. Los radicales libres pueden atacar al colágeno y elastina provocando que se rompa la estructura. Con la edad, los efectos acumulados de los radicales libres comienzan a desacelerar la función celular, reduciendo por lo tanto las capacidades de auto-reparación del cuerpo. Los ataques de los radicales libres eventualmente llevan a arrugas, piel colgada, y "manchas de la edad."

30 35 Andersson *et al.* (Scientific Reports, 9(1), 2019) dan a conocer que RoxP influye positivamente en la viabilidad de monocitos y queratinocitos en cultivos celulares expuestos a estrés oxidativo, y que puede observarse una diminución de la concentración congruente de RoxP en la piel afectada por enfermedad oxidativa. Andersson *et al.* se publicó solo después de la fecha de prioridad de la presente solicitud de patente.

40 45 Ertürk *et al.*, (Plos One, 13(3), 2018) identifican RoxP para mantener la homeostasis redox en la piel y proporcionan un biosensor capacitativo usado para detectar RoxP en piel *in vivo*. Allhorn *et al.* (Scientific Reports, 6(1), 2016) indican que RoxP tiene actividad antioxidante.

50 Existe una necesidad en curso de proporcionar posibilidades adicionales o mejoradas para prevenir o reducir el estrés oxidativo y sus efectos dañinos en la piel en el contexto tanto terapéutico como cosmético.

55 Los presentes inventores caracterizaron previamente la proteína RoxP (radical oxigenasa de *Propionibacterium acnes*) expresada abundantemente por aislados de *C. acnes*, y mostró que el RoxP exhibe actividad antioxidante en ciertas condiciones *in vitro*, y puede soportar el crecimiento de *C. acnes* en entornos aerobios *in vitro* y la colonización de explantes de piel humana *ex vivo* (Allhorn *et al.* 2016 Sci Rep 6:36412).

Sumario de la invención

60 La presente invención se define en las reivindicaciones y se basa al menos en parte en el descubrimiento inesperado de que el RoxP protege la piel humana de daño oxidativo en sistemas de modelo terapéuticamente y cosméticamente relevantes, y que la reducción en la piel de RoxP se correlaciona con enfermedades de la piel asociadas al estrés oxidativo en humanos. Estas observaciones identificaron por primera vez a RoxP o la bacteria de *C. acnes* que secreta RoxP como posibilidades confiables para intervenciones terapéuticas o cosméticas dirigidas a resolver procedimientos patológicos o fisiológicos de estrés oxidativo en la piel.

65 En consecuencia, un aspecto proporciona un uso cosmético de una composición que comprende una cepa viva de *Cutibacterium acnes* que secreta RoxP (el radical oxigenasa de *Propionibacterium acnes*) para prevenir o reducir el envejecimiento de la piel en un sujeto.

65 Un aspecto relacionado proporciona un método cosmético para la prevención o reducción de envejecimiento de la piel en un sujeto, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de una

composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

5 Otro aspecto proporciona una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, en donde la enfermedad asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).

10 Un aspecto adicional proporciona un uso cosmético de una composición que comprende RoxP para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto.

15 Un aspecto relacionado proporciona un método cosmético para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de una composición que comprende RoxP.

20 15 Otro aspecto proporciona una composición que comprende RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo; en donde la enfermedad asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).

25 Estos y otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

25 La enseñanza de la solicitud se ilustra mediante las siguientes figuras que se han de considerar solo como ilustrativas y no limitan de ninguna manera el alcance de las reivindicaciones.

30 Figura 1: expresión de *roxP* en diferentes filotipos de *C. acnes*. Se extrajo ARN de cultivos de *C. acnes* de fase exponencial y/o estacionaria, representativos de cepas de tipo I ($n = 6$), tipo II ($n = 5$) y tipo III ($n = 2$). Las cuantificaciones de qPCR del ARNm de *roxP* se ejecutaron en duplicados biológicos y tecnológicos, se normalizaron contra transcriptos de *gapdh* y se evaluaron usando análisis Cq delta doble. Agrupados con sus respectivos filotipos, se determinó subsecuentemente la significancia estadística a través de una prueba de la t de Student. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

35 Figura 2: Se cultivaron quince cepas diferentes de *C. acnes* en TSB bajo condiciones anaerobias (línea continua) o aerobias (línea discontinua) por 5-7 días. Ciertas cepas (A) no mostraron diferencia significativa entre crecimiento óxico y anóxico, (B) favorecieron el crecimiento aerobio principalmente en la última fase exponencial, o (C) tuvieron un aumento de retardo de tiempo en condiciones aerobias. Las líneas de color negro representan las cepas que expresan el homólogo de RoxP más común, y las líneas grises representan las cepas que expresan la variante de proteína menos común. El eje Y describe $D_{O_{600}}$ y el eje X representa tiempo (días).

40 Figura 3: Actividad de RoxP.

45 Figura 4: Actividad antioxidante de RoxP bajo condiciones adversas. La capacidad de RoxP de reducir los cationes radicales de ABTS, indicada por una disminución en la absorbancia a 734 nm, se sometió a prueba en múltiples entornos. Diferentes concentraciones de RoxP recombinante (rRoxP) (0,2-3,2 μ M) en tampón de fosfato de sodio (20 mM, pH 7,4) (A), rRoxP (2,7 μ M) incubado con soluciones de sal (B), rRoxP precalentado (2,7 μ M) incubado durante 20 min a temperaturas que varían de T. A. a 98 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de las mediciones de actividad (C), o rRoxP (2 μ M) almacenado a temperatura ambiente por hasta 2 semanas (D) se añadieron a una solución de radicales ABTS⁺ preformados y se registró la absorbancia después de 30 s.

50 Figura 5: Líneas celulares de monocitos humanos (A) o queratinocitos (B) se expusieron a estrés oxidativo a través de la adición de paraquat, mientras se agregaba RoxP momentos después. Las células se incubaron por 24 h (queratinocitos) o 48 h (monocitos) antes de que se analizara la viabilidad celular a través de ensayos de MTT. Se demuestran las visualizaciones representativas de microscopía de monocitos después de paraquat (C) o paraquat + RoxP (D). Se calcularon las estadísticas usando una prueba de la t de Student.

55 Figura 6: Los individuos ya sea con piel saludable (control, $n=18$), queratosis actínica (AK, $n=18$) o carcinoma de células basales (BCC, $n=18$) se rasparon en las regiones enfermas (afectadas) y sanas (no afectadas). La cantidad absoluta de RoxP se determinó por mediciones de biosensor capacitivo RoxP-MIP. Todos los puntos de datos individuales se incluyeron en el análisis.

60 Figura 7: Gráfico de caja de las abundancias relativas de los cinco géneros más abundantes y de las cuatro especies más abundantes en los cuatro grupos (A). Las líneas delgadas muestran el percentil de 5-95 % y los valores medianos se muestran como líneas verticales. El taxón diferencialmente abundante basado del análisis LefSe se marca con un *. (B) Determinación de abundancias relativas de filotipos de *C. acnes* en AK y BCC. Aumento de abundancias de *C. acnes* tipo II en los sitios de la piel afectados con AK en comparación con los controles (aumento de 15 % a 39 %),

mientras las cepas de tipo IA disminuyen (desde 70 % hasta 45 %).

Figura 8: Alineación de la región en dirección 5' de *roxP* de ocho cepas de *C. acnes*. Las cepas representan las ocho secuencias en dirección 5' dominantes de *roxP*, que cubren toda la población de *C. acnes* (véase la figura 9). Las secuencias en dirección 5' contienen el promotor *roxP* sustituto, subrayado. Este promotor se encontró usando la herramienta BPROM (Solovyev and Salamov 2011, Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, págs. 61-78) (las puntuaciones de los valores de confianza (LDF (función discriminante lineal) se dan en corchetes después del nombre de la cepa). Además, la secuencia promotora consenso de *C. acnes* (región -10: T.A.n.n.n.T y la región -35: G/A.n.T/G.T/G.n.G), identificada por Lin *et al.* (2013 BMC Genomics 14:620) se comparó: todas las bases mal apareadas están en letra cursiva negrita. Las cepas de tipo IA con el tipo de SLST A y C portan una secuencia en dirección 5' de *roxP* con una coincidencia perfecta al promotor consenso. Las cepas tipo II representadas por las cepas 09-9 y ATCC 11828 portan malos apareamientos en la región -35.

Figura 9: Análisis de la región en dirección 5' de *roxP* que contiene el promotor sustituto. Los 155 genomas secuenciados de *C. acnes* se seleccionaron para la región en dirección 5' de *roxP* (200 nt). Todos los genomas de *C. acnes* portaron esta región. Se encontraron ocho secuencias dominantes; se muestran cepas representativas cada una de las cuales porta una secuencia en dirección 5' de *roxP* individual. Las respectivas regiones en dirección 5' fueron filogenéticamente comparadas. La mayoría de los genomas secuenciados portaron la versión representada por la cepa PA_12.1.L1: 81 genomas; las otras cepas representadas: PA_15.1.R1, 24 genomas; 09-109, 8 genomas; KPA171202, 11 genomas; PMH5, 4 genomas; 523, 3 genomas; 09-9, 2 genomas; ATCC_11828, 20 genomas. Los nombres tipo respectivos IA, IB, II, III así como los tipos de SLST A, C, G, H, K, L de las cepas se dan en la figura. Las cepas tipo II se pueden encontrar en diferentes agrupamientos.

Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias de RoxP de *C. acnes*. Las secuencias de aminoácidos de RoxP de las cepas de *C. acnes* investigadas se alinearon usando un algoritmo ClustalW, que separó RoxP en tres tipos principales. El primer tipo contuvo RoxP de las cepas PMH-7 y PMH-5 (ambas pertenecen al filotipo III), el segundo tipo contuvo RoxP de las cepas PA_12_1_R1, PA_21_1_L1, PA_12_1_L1, PA_15_1_R1, KPA171202, 09-23, y PA_30_2_L1 (todas menos una pertenecen al filotipo I; la cepa 09-23 pertenece al filotipo II), el tercer tipo contuvo RoxP de las cepas AD24, 10-43, 09-09, 09-323, y 11-79 (todas pertenecen al filotipo II).

Figura 11. La purificación de afinidad de RoxP de sobrenadante bacteriano a alta pureza usando una matriz de criogel de impresión molecular a base de RoxP. (A) Precipitó el sulfato de amonio (80 %) y el sobrenadante que se volvió a tamponar (100 mM de fosfato de sodio pH 7,0) de la cepa AD24 de *C. acnes* tipo II se hizo discurrir sobre una matriz de criogel de impresión molecular a base de RoxP. El flujo corriente se recogió y las proteínas unidas se eluyeron con 500 mM de imidazol. Se usó PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) como un determinante de peso molecular. (B) Gel original.

Figura 12: Curva de calibración para la determinación de concentraciones de RoxP en muestras hisopadas de piel usando un biosensor capacitivo. El contenido de los hisopados de piel aireados, no aplicados a piel u otras superficies sólidas, se diluyó en un tampón de fosfato de sodio 10 mM a pH 7,0 suplementado con concentraciones variables de RoxP. Las muestras se inyectaron en el sistema y el cambio resultante en la capacitancia se representó gráficamente contra las concentraciones logarítmicas de proteína.

Figura 13: Prevalencia de RoxP en pacientes con BCC. Individuos con cualquiera de carcinoma de células basales (gris) o queratosis actínica (negro) se hisoparon en regiones de la piel enferma (afectada) y sana (no afectada). La cantidad absoluta de RoxP se determinó por mediciones de biosensor capacitivo RoxP-MIP. El análisis incluye solo esos individuos de quienes se pudieron calcular exitosamente dos puntos de datos coincidentes.

Figura 14: Abundancia relativa del género más abundante (todos los otros géneros se agruparon en el grupo "Otro") en los cuatro grupos: AKC (queratosis actínica: sitio de piel sana), AKS (queratosis actínica: sitio de piel afectada), BCCC (carcinoma de células basales: sitio de piel sana), y BCCS (carcinoma de células basales: sitio de piel afectada).

Figura 15: Evaluación de morfología de epidermis humanas reconstituidas (RHEs) expuestas a estrés por UV. (A) Control negativo 1 - RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP, (B) control negativo 2 - RHEs no estresadas con sobrenadante de *C. acnes* a 10 % v/v, (C) control positivo 1 - RHEs estresadas con UV, (D) prueba 1 - RHEs estresadas con UV en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v.

Figura 16: Daño del ADN / evaluación de CPD de RHEs expuestas a estrés por UV. (A) control negativo 1 - RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP, (B) control negativo 2 - RHEs no estresadas con sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (C) control positivo 1 - RHEs estresadas con UV, (D) Prueba 1 - RHEs estresadas con UV en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (E) cuantificación de los resultados mostrados en (A)-(D).

Figura 17: Daño del ADN / evaluación de 8-OHdG de RHEs expuestas a estrés por UV. (A) Control negativo 1 - RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP, (B) control negativo 2 - RHEs no estresadas con

sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (C) control positivo 1 - RHEs estresadas con UV, (D) prueba 1 - RHEs estresadas con UV en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (E) cuantificación de los resultados mostrados en (A)-(D).

5 Figura 18: Evaluación del sistema de desintoxicación (análisis GPx) de RHEs expuestas a estrés por UV u ozono. Control negativo 1 - RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP, Control negativo 2 - RHEs no estresadas con sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, control positivo 1 - RHEs estresadas con UV, prueba 1 - RHEs estresadas con UV en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, control positivo 2 - RHEs estresadas con ozono, prueba 2 - RHEs estresadas con ozono en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v.

10 Figura 19: Evaluación de la apoptosis (caspasa-3 activa) evaluación de RHEs expuestas a estrés por UV. (A) Control negativo 1 - RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP, (B) control negativo 2 - RHEs no estresadas con sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (C) control positivo 1 - RHEs estresadas con UV, (D) prueba 1 - RHEs estresadas con UV en la presencia de sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP a 10 % v/v, (E) cuantificación de los resultados mostrados en (A)-(D), barra n.º1 control negativo 1, barra n.º2 control negativo 2, barra n.º3 control positivo 1, barra n.º4 prueba 1.

15 Figura 20: Ensayo de catión de radical de ABTS usando péptido RoxP 1 (curva punteada) o péptido RoxP 2 (curva discontinua), y agua como control (curva discontinua y punteada). (A) análisis cinético, (B) ensayo de dependencia de concentración.

20 Figura 21: Ensayo de ORAC (capacidad de absorbancia de radical oxígeno) usando péptido RoxP 1 (A) o péptido RoxP 2 (B).

25 Figura 22: Disminución de la generación de RoxP de radicales •OH, según se evidencia por la reducción de absorbancia a 532 nm en ensayo de desoxiribosa (TBA-MDA) en la presencia de RoxP (barra derecha).

30 Figura 23: RoxP redujo los niveles de hidroperóxido lipídico en plasma irradiado y no irradiado por UV.

Figura 24: RoxP redujo Fe³⁺ a Fe²⁺, y no afectó el estado redox de Fe²⁺ en el ensayo de fenantrolina.

Figura 25: RoxP redujo Fe³⁺ a Fe²⁺ en ensayo de ferrozina.

35 Figura 26: Interacción de RoxP con coproporfirina III.

Figura 27: Actividad de flavinas y RoxP en ensayos de reducción de ABTS.

40 Figura 28: Áreas de tratamiento 1 a 6 y áreas de irradiación en el estudio de acuerdo con el ejemplo 19.

Figura 29: Color de la piel a* (eritema) por cromámetro en un estudio *in vivo* de RoxP (datos en bruto).

45 Figura 30: Color de la piel a* (eritema) por cromámetro en un estudio *in vivo* de RoxP (diferencias del valor de referencia).

Figura 31: Contenido de SQOOH (ng/mg) en un estudio *in vivo* de RoxP (datos en bruto).

Figura 32: RoxP redujo la generación de radicales formados a través de porfirinas.

50 Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el, la" incluyen las referencias tanto singular como plural a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

55 Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por" como se usan en el presente documento son sinónimos con "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o de extremo abierto y no excluyen miembros elementos o pasos del método adicionales, no mencionados. Los términos también abarcan "que consiste de" y "que consiste esencialmente de", que disfrutan de significados bien establecidos en la terminología de patentes.

60 La recitación de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incorporadas dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos finales recitados. Esto aplica a los intervalos numéricos independientemente de si se introducen por la expresión "de... a..." o la expresión "entre... y..." u otra expresión.

65 Los términos "cerca de" o "aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretenden abarcar variaciones de y desde el valor especificado, tales como variaciones de +/-10 % o menor, preferiblemente +/-5 % o menor, más

preferiblemente +/-1 % o menor, e incluso más preferiblemente +/-0,1 % o menor de y desde el valor especificado, en tanto que tales variaciones sean apropiadas para realizar la invención dada a conocer. Se ha de entender que el valor al que se refiere el modificador "cerca de" o "aproximadamente" está dado a conocer por sí mismo también específicamente, y preferiblemente.

- 5 Mientras los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más miembros o al menos un miembro de un grupo de miembros, es claro per se, a modo de mayor ejemplificación, el término abarca entre otros una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera dos o más de dichos miembros, tal como, por ejemplo, cualquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros, y hasta todos de dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "al menos uno" puede referirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

- 10 La discusión de los antecedentes de la invención en el presente documento se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no se debe tomar como una admisión de que cualquiera del material referido fue publicado, conocido, o parte del conocimiento general común en cualquier país desde la fecha de prioridad de cualquiera de las 15 reivindicaciones.

- 15 A través de toda esta divulgación, varias publicaciones, patentes y especificaciones de patente publicadas se referencian por una cita de identificación.

- 20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos usados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, tienen el significado como lo entiende comúnmente uno de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de guía adicional, las definiciones de términos se incluyen para apreciar mejor la enseñanza de la invención. Cuando se definen términos específicos en conexión con un aspecto particular de la invención o una realización particular de la invención, tal connotación o significado pretende aplicar a través de toda esta especificación, es decir, también en el contexto de otros aspectos o realizaciones de la invención, a menos que se defina de otro modo.

En los siguientes pasajes, se definen en más detalle diferentes aspectos o realizaciones de la invención.

- 30 Como se corrobora por la sección experimental, que ilustra ciertas realizaciones representativas de la invención, al emplear sistemas de modelos relevantes informativos de resultados de tratamientos, los inventores identificaron y validaron por primera vez a RoxP o la bacteria *C. acnes* que secreta RoxP como agentes activos útiles para intervenciones cosméticas, profilácticas o terapéuticas para prevenir o reducir el envejecimiento de la piel, o para prevenir o tratar enfermedades de la piel asociadas al estrés oxidativo en sujetos. La sección experimental demuestra que las composiciones descritas en el presente documento tiene propiedades antioxidantes. Por lo tanto, sin desear limitarse por la teoría, los enfoques cosmético, profiláctico o terapéutico dados a conocer en el presente documento pueden operar al proteger las células de la piel y/o los componentes celulares o extracelulares de la piel, tales como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, del estrés oxidativo, particularmente por apagado o neutralización de los radicales libres incluyendo especies de oxígeno reactivo (ROS) en la piel por el RoxP administrado a la piel o suministrado a la piel por la bacteria *C. acnes* que secreta RoxP.

- 35 En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un uso cosmético de una composición que comprende una cepa viva de *Cutibacterium acnes* que secreta RoxP (radical oxigenasa de *Propionibacterium acnes*) para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto. Un aspecto relacionado proporciona un método cosmético para la prevención o reducción de envejecimiento de la piel en un sujeto, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

- 40 Otro aspecto proporciona una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).

- 45 Un aspecto adicional proporciona un uso cosmético de una composición que comprende RoxP para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto. Un aspecto relacionado proporciona un método cosmético para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de una composición que comprende RoxP o una variante biológicamente activa o fragmento de la misma.

- 50 Otro aspecto proporciona una composición que comprende RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).

- 55 60 65 El adjetivo "cosmético" en relación con los usos y métodos dados a conocer en el presente documento denota que

- tales usos y métodos están diseñados para mantener, restaurar, mejorar o aumentar una apariencia del sujeto, más particularmente la apariencia de la piel del sujeto, incluyendo sin limitación el tono, color, compleción, textura, lisura o suavidad de la piel del sujeto. Los usos cosméticos o métodos como se contemplan en el presente documento resuelven procesos normales, naturales, o fisiológicos, y pueden distinguirse de terapia que incluye tratamientos curativos y profilácticos, cuyo propósito es restaurar un sujeto de un estado patológico a su condición sana original, o para al menos aliviar los síntomas de dolor y sufrimiento provocados por la patología, o para prevenir la patología en primer lugar. Los usos cosméticos o métodos como se destinan en el presente documento pueden así ser denotados como "no terapéuticos". Los usos cosméticos o métodos como se destinan en el presente documento generalmente emplean composiciones cosméticas configuradas para aplicación tópica a la piel.
- El término "piel" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a la capa de tejido que forma la cubierta exterior natural del cuerpo de animales, en vertebrados particulares. La piel de mamíferos está compuesta de dos capas principales: la epidermis que constituye la capa más exterior de la piel, incluye el epitelio escamoso estratificado con una lámina basal subyacente, y comprende células de Merkel, queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans; y la dermis, que constituye la capa de piel debajo de la epidermis, y comprende tejido conectivo, mecanoreceptores, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, glándulas apocrinas, vasos linfáticos y vasos sanguíneos. El término "piel" incluye sin limitación la piel sobre o en la cara, cuello, pecho, abdomen, espalda, brazos, manos, piernas, y cuero cabelludo.
- Aunque pueden existir las corrientes de pensamiento competidoras en cuanto a que si el envejecimiento constituye un proceso natural, fisiológico o 'la mayor enfermedad de todas', como se usa en el presente documento los términos "envejecimiento" o "envejecer" generalmente se refiere al proceso de hacerse viejo, separado de cualquier patología relacionada con la edad, con lo cual los sujetos presentan los efectos o características normales, naturales o fisiológicas del aumento de la edad.
- En ciertas realizaciones, los presentes usos cosméticos o métodos pueden prevenir o reducir la apariencia de uno o más signos externos del envejecimiento de la piel. En ciertas realizaciones, el uno o más signos externos del envejecimiento de la piel se pueden percibir por inspección visual o táctil. En ciertas realizaciones, el uno o más signos externos del envejecimiento de la piel pueden ser visibles a simple vista. En ciertas realizaciones, el uno o más signos externos del envejecimiento de la piel pueden seleccionarse del grupo que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de arrugas, líneas finas, piel colgada, pérdida de elasticidad de las fibras de la piel, piel marchitada, piel adelgazada, alteración en la pigmentación de la piel, piel opaca, piel sin radiancia, y combinaciones de los mismos. Los signos de envejecimiento de la piel que pueden asociarse particularmente con o provocarse por el estrés oxidativo incluyen líneas finas, arrugas, alteración en piel pigmentación, y piel adelgazada. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el uno o más signos externos del envejecimiento de la piel pueden seleccionarse del grupo que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de líneas finas, arrugas, alteración en la pigmentación de la piel, piel adelgazada, y combinaciones de los mismos.
- El término "prevenir", o sus formas alternativas tal como "que previene" o "prevención", significan comúnmente evitar que algo ocurra, suceda o exista, o demorar la ocurrencia o inicio de algo, especialmente por una o más medidas precautorias (preventivas). Por ejemplo, los presentes usos cosméticos o métodos pueden aplicarse a un sujeto que aún no presenta uno o más signos externos de envejecimiento de la piel, y puede prevenir, tal como prevenir por una duración de tiempo dada (demora), el inicio o llegada de dichos uno o más signos externos de envejecimiento de la piel.
- El término "reducir", o sus formas alternativas tales como "que reduce" o "reducción", significan comúnmente disminuir algo en tamaño, cantidad, grado, o número, especialmente por una o más medidas, usualmente en comparación al estado o situación antes de aplicar dicha(s) medida(s) o al estado o situación que podrían resultar si la(s) medida(s) no fueran aplicadas. Por ejemplo, los presentes usos cosméticos o métodos pueden aplicarse a un sujeto que ya presenta uno o más signos externos de envejecimiento de la piel, y puede ya sea reducir dichos uno o más signos externos (restauración, mejora) o puede impedir o desacelerar el desarrollo posterior o empeoramiento de dichos uno o más signos externos (mantenimiento, manejo). El término "reducir" puede intercambiarse con términos tales como "decrecer", "inhibir", "disminuir", "interferir con", o "desacelerar".
- El término "composición" generalmente se refiere a una cosa compuesta de dos o más componentes, y más específicamente denota una combinación o mezcla de dos o más materiales, tales como elementos, moléculas o sustancias, así como productos de reacción y productos de descomposición formados de los materiales de la composición. Con respecto a su uso, las presentes composiciones pueden configurarse como composiciones cosméticas o como composiciones farmacéuticas. Las composiciones cosméticas típicamente comprenden uno o más ingredientes cosméticamente activos (sustancias químicamente y/o biológicamente activas que tienen uno o más efectos cosméticos) y uno o más portadores cosméticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas típicamente comprenden uno o más ingredientes farmacológicamente activos (sustancias químicamente y/o biológicamente activas que tienen uno o más efectos farmacológicos) y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las composiciones como se usan típicamente en el presente documento pueden ser líquidas o sólidas, y pueden incluir soluciones o dispersiones. En ciertas realizaciones, una composición puede estar compuesta de componentes que se proporcionan a un consumidor o un practicante como una mezcla, es decir, los componentes de

la composición ya están mezclados. En ciertas realizaciones, una composición puede estar compuesta de componentes uno o más de los cuales se proporciona a un consumidor o practicante físicamente separado de (por ejemplo, en contenedores o frascos separados) de uno o más de otros componentes de la composición, aunque típicamente como parte del mismo envase de producto o dispositivo dosificador. A modo de un ejemplo y sin limitación, 5 la composición puede comprender uno o más componentes provistos en un contenedor, tal como una cámara de un dispositivo de múltiples cámaras (por ejemplo, un sistema de dosificación de dos cámaras), y uno o más componentes provistos en otro contenedor, tal como otra cámara del dispositivo de múltiples cámaras. Tal disposición permite al 10 consumidor o practicante mezclar los componentes de la composición poco antes del uso. Por ejemplo, la composición puede comprender la cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* que secretan RoxP como se enseña en el presente documento provista en un contenedor, tal como una cámara de un dispositivo de múltiples cámaras (por ejemplo, un sistema de dosificación de dos cámaras), y uno o más o portadores cosméticamente o farmacéuticamente aceptables 15 provistos en otro contenedor, tal como otra cámara del dispositivo de múltiples cámaras, para ser mezclados por el consumidor o practicante antes del uso. Los dosificadores de múltiples cámaras (tal como dos cámaras o cámara doble), tales como botellas, tubos, tarros, bombas, etc. son generalmente conocidos y están disponibles comercialmente. A modo de un ejemplo y no de limitación, los documentos WO 2012/153206, WO 2017/168263, y 20 WO 2018/060799 por Bormioli Rocco SPA (Fidenza, Italia) describen sistemas, comercializados entre otros como el dosificador de una dosis New Shaker®, que comprende un contenedor y una cápsula de cierre para cerrar el contenedor, en donde la cápsula de cierre incluye un cerramiento definido al menos parcialmente por un fondo o boca frágil. El cambio de la configuración del fondo o boca frágil de intacto a abierto permite mezclar los contenidos 25 previamente separados del contenedor y el cerramiento directamente antes del uso. En ciertas realizaciones, la cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* que secretan RoxP pueden estar en una forma liofilizada. Típicamente, tal forma es por sí misma una composición que comprende la cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* y los componentes de un medio adecuado de liofilización bacteriana. En ciertas realizaciones, el RoxP de las mismas puede estar en una forma liofilizada. Típicamente, tal forma es por sí misma una composición que comprende el RoxP o variante 30 biológicamente activa o fragmento del mismo y opcionalmente un excipiente(s) adecuado(s) de liofilización de proteína.

En ciertas realizaciones, aunque una composición puede ser una mezcla, uno o más componentes de la composición puede sin embargo estar sustancialmente separado de (sustancialmente no en contacto con) uno o más otros componentes de la composición. Tal puede ser el caso por ejemplo para las dispersiones, tales como coloides o 35 suspensiones, que comprenden partículas discretas dispersas en una fase continua. Por lo tanto, el(los) componente(s) de una dispersión que están comprendidos por las partículas discretas estarán sustancialmente separados del(los) componente(s) de una dispersión comprendida por la fase continua. A modo de un ejemplo, RoxP puede formularse con uno o más excipientes para formar partículas discretas en una fase continua compuesta de uno o más de otros excipientes, o viceversa. A modo de otro ejemplo, una cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* que 40 secretan RoxP pueden formularse con uno o más excipientes para formar partículas discretas en una fase continua compuesta de uno o más de otros excipientes, o viceversa. En ciertas realizaciones, una dispersión como se pretende en el presente documento puede ser una emulsión (fase dispersa líquida, fase continua líquida), sol o suspensión (fase dispersa sólida, fase continua líquida), gel (fase dispersa líquida, fase continua sólida), o sol sólido (fase dispersa sólida, fase continua sólida). Otro ejemplo incluye composiciones en las que uno o más componentes de la 45 composición se mezclan y se microencapsulan, antes de mezclarse con uno o más de otros componentes de la composición. A modo de un ejemplo, RoxP puede formularse con uno o más excipientes y microencapsularse, y las microcápsulas resultantes pueden formularse subsecuentemente con (dispersadas en) uno o más excipientes. A modo de otro ejemplo, una cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* que secretan RoxP pueden formularse con uno o más excipientes y microencapsularse, y las microcápsulas resultantes pueden formularse subsecuentemente con (dispersarse en) uno o más excipientes. En ciertas realizaciones, la formulación microencapsulada puede ser líquida 50 o sólida, tal como una solución o dispersión líquida o sólida. En ciertas realizaciones, las microcápsulas pueden mezclarse con una formulación que es líquida o sólida, tal como una solución o dispersión líquida o sólida. Los métodos para microencapsulación son generalmente conocidos, y la envolvente, revestimiento, o membrana de las microcápsulas puede elaborarse generalmente de materiales tales como etilcelulosa, polí(alcohol vinílico), gelatina, o alginate de sodio.

Ventajosamente, en tales realizaciones, una cepa o cepas vivas de *C. acnes* o RoxP de la misma puede mantenerse sustancialmente en separación de componentes de la composición que, aunque son generalmente útiles en el contexto de composiciones cosméticas o farmacéuticas, puede desmerecer la viabilidad, estabilidad u otras características deseables de la sustancia activa.

Como se mencionó previamente, en ciertas realizaciones, la cepa o cepas vivas de *Cutibacterium acnes* que secretan RoxP, o el RoxP, puede estar en una forma liofilizada; opcionalmente incluida en una cámara de un sistema de dosificación de dos cámaras, la otra cámara contiene una composición de resuspensión adecuada. Los métodos para liofilización de bacterias tales como *C. acnes* son generalmente conocidos (véase por ejemplo, C Morgan & G Vesey: "Freeze-Drying of Microorganisms", en: Encyclopedia of Microbiology, 3^a ed., 2009, Academic Press, 162-173). A modo de un ejemplo, la cepa o cepas de *C. acnes* pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado como se describe en otro lado en esta especificación y cosechadas en la fase exponencial o estacionaria. Las bacterias se separan del medio por centrifugación o ultrafiltración y se lavan en un tampón adecuado. Después del lavado las bacterias se resuspenden en una mezcla de excipientes que estabilizan las bacterias. Los excipientes comúnmente usados incluyen pero no se limitan a sacarosa, almidón, manitol, leche descremada, albúmina de suero bovino (BSA), y

- combinaciones de los mismos. La mezcla de excipientes usualmente contiene un crioprotector externo (que previene la formación de cristales) un lioprotector interno (que remplaza el agua como donante de enlace de hidrógeno) y estabilizadores de almacenamiento. Para cada mezcla de excipientes la temperatura crítica se determina por un método apropiado, tal como medición lioestática o calorimetría diferencial de barrido. El producto que contiene las bacterias y excipientes se congela en la secadora por congelamiento debajo de la temperatura crítica. Los parámetros de programa de la secadora por congelamiento se eligen de modo que el producto permanece durante todo el ciclo de secado por congelamiento a una temperatura debajo de la temperatura crítica de la mezcla. Después de la evaporación de toda el agua del producto se puede remover de la secadora por congelamiento y procesarse para el envasado final.
- Las bacterias liofilizadas pueden proporcionarse como un polvo liofilizado, opcionalmente mezclado con un portador sólido para aumentar el volumen, o puede dispersarse en un aceite adecuado o combinación de aceites. ejemplos no limitantes de aceites adecuados incluyen aceite de semilla de *Simmondsia Chinensis* (jojoba), aceite de semilla de *Sesamum Indicum* (ajonjoli), manteca de *Butyrospermum Parkii* (karité), aceite vegetal hidrogenado, laurato de isoamilo, aceite de semilla *Sclerocarya Birrea* (marula), aceite de semilla de *Helianthus Annuus* (girasol), y combinaciones de los mismos. Estos y otros aceites, en particular aceites hidrófilos, previenen que la humedad llegue a las bacterias, previniendo de este modo la rehidratación de las bacterias y extendiendo la vida útil del producto.
- La liofilización de las proteínas también es un procedimiento bien establecido en la técnica y típicamente emplea una solución acuosa de la proteína que se va a liofilizar, opcionalmente mezclada con uno o más excipientes adecuados de liofilización, tal como trehalosa, sacarosa, raffinosa, maltodextrina, manitol, y/o dextrano. Los inventores han determinado experimentalmente que la liofilización de RoxP disuelto en agua conserva satisfactoriamente la actividad de RoxP, incluso en la ausencia de otros excipientes, mientras que la adición de excipientes, incluyendo esos recitados antes cada uno individualmente, fue bien tolerado y podría llevar a mejoras de la torta en términos de su estabilidad y facilidad de reconstitución. Los inventores han observado adicionalmente que el manitol, y particularmente 2-6 % p/v, preferiblemente 2-5 % p/v, más preferiblemente 2-4 % p/v, o incluso más preferiblemente 2-3 % p/v de manitol (con respecto al volumen de la solución que se va a liofilizar) fue especialmente ventajoso para la producción de la torta estable y conservación de la actividad de RoxP.
- En ciertas otras realizaciones, las bacterias pueden aplicarse sin un paso intermedio de liofilización. Por ejemplo pero sin limitación, las bacterias pueden cultivarse en y cosecharse en una fase exponencial, formadas como pellas y resuspendidas en solución diluida de peptona (0,25 % p/v de peptona tríptica en agua estéril destilada), que entonces se espesa con hidroxietilcelulosa (también conocida como HEC o Natrosol), a una concentración final adecuada de bacterias, tal como cerca de 10^6 unidades formadoras de colonia por gramo. El gel resultante puede almacenarse a -80 °C o -20 °C o por un corto plazo a temperatura ambiente antes de aplicarse a los sujetos.
- En ciertas realizaciones, la composición es una composición cosmética que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP y un portador cosméticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición es una composición cosmética que comprende RoxP y un portador cosméticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición es una composición cosmética que comprende tanto i) una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP y ii) RoxP, y un portador cosméticamente aceptable. Las composiciones cosméticas pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales cosméticamente activos. Tal(es) ingrediente(s) adicionales cosméticamente activos pueden ser capaces de prevenir o reducir el envejecimiento de la piel, o pueden poseer efectos cosméticos no relacionados con el envejecimiento de la piel.
- En ciertas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP y un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende RoxP y un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende ambas de i) una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP y ii) RoxP, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más ingredientes farmacéuticamente activos adicionales. Tal ingrediente o ingredientes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser capaces de prevenir o tratar la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, o pueden poseer efectos farmacéuticos no relacionados a dicha enfermedad.
- A modo de ejemplo y sin limitación, tales sustancias cosméticas o farmacéuticas activas pueden incluir antioxidantes aplicables a la piel, tales como sin limitación vitamina C, vitamina A, vitamina E, resveratrol, coenzima Q10, niacinamida, polifenoles, flavonoides, o combinaciones de los mismos.
- A modo de ejemplo y sin limitación, tales sustancias activas cosméticas o farmacéuticas pueden incluir ácido alfa-lipoico, ácido fólico, fitoeno, biotina, alfa-glucosil rutina, carnitina, carnosina, isoflavonas naturales y/sintéticas, flavonoides, creatina, creatinina, taurina, B-alanina, dishidroxiacetona, 8-hexadeceno-1, ácido 16-dicarboxílico, gliceril glucósido, extracto de regaliz, aloe vera, ácido hialurónico, jugo de la hoja de aloe barbadensis, (2-hidroxietil)urea, niacinamida, vitamina A, o combinaciones de los mismos.
- Los términos "cosméticamente aceptable" o "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento son consistentes con la técnica y significan compatible con los otros ingredientes de una composición cosmética o

farmacéutica y no dañina al receptor del mismo.

Ciertas de las presentes composiciones comprenden una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender exactamente una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender dos o más cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender exactamente dos cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender exactamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o pueden comprender más de 20 cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender exactamente 3, 4, o 5 cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP.

Cutibacterium acnes (anteriormente *Propionibacterium acnes*) es una especie de bacteria de varilla facultativa anaerobia gram-positiva. *C. acnes* es en gran medida comensal y es un colonizador abundante de la piel humana floreciente en el entorno nutritivo de la piel rica en sebo. La bacteria no provoca síntomas en la mayoría de los portadores, pero ciertas cepas tienen un papel sugerido proinflamatorio en el acné vulgar. Además, debido a su capacidad formadora de biopelícula, la bacteria es frecuentemente aislada de varias infecciones asociadas a implantes ortopédicos.

Los estudios por Johnson y Cummins (1972 J Bacteriol 109:1047-66) revelaron primero dos fenotipos distintos de *Propionibacterium acnes*, conocidos como tipos I y II, que podrían distinguirse con base en pruebas de aglutinación serológica y análisis de azúcar de la pared celular. Estudios subsecuentes, que involucran otros análisis de secuencia del gen *recA* demostraron que *P. acnes* comprende cuatro linajes altamente evolutivamente distintos, conocidos como tipo IA, IB, II y III que presentan diferencias en las propiedades inflamatorias, producción de determinantes de virulencia y asociación con varias condiciones (McDowell *et al.* 2005 J Clin Microbiol 43:326-334; McDowell *et al.* 2008 J Med Microbiol 57:218-224; Valanne *et al.* 2005 Microbiology 151:1369-1379; Lodes *et al.* 2006 Microbiology 152: 3667-3681). El tipo IA se ha subdividido además en los subtipos IA1 y IA2, y el tipo IC se ha identificado usando un esquema de tipificación de secuencia multilocus (eMLST) basado en seis genes de mantenimiento y dos genes de virulencia sustituta (McDowell *et al.*, 2012 PLoS One 7:e41480). Scholz *et al.* (2014 PLoS ONR 9:e104199) después desarrollaron un esquema de tipificación de secuencia de un solo locus (SLST) para las cepas de *P. acnes*, que involucran la amplificación por PCR y el secuenciamiento de ADN del locus diana PPA2385. Una base de datos de *P. acnes* disponible públicamente y herramienta de asignación de SLST asociada con el esquema SLST descrito por Scholz *et al.* está disponible en línea en medbac.dk/slst/pacnes. Tipos de SLST ejemplares para las cepas de *P. acnes* incluyen los tipos de SLST A1 a A24, B1, C1 a C4, D1 a D3, E1 a E9, F1 a F10, G1, H1 a H5, K1 a K14, y L1 a L6. Otros esquemas de tipificación de la cepa de *P. acnes* se conocen como MLST9, MLST8, y esquemas de ribotipo, revisados en Scholz *et al.*, especialmente la figura 1. Donde se hace referencia a los tipos de SLST en esta especificación, se entienden los tipos de acuerdo con el esquema de tipificación de SLST de Scholz *et al.* Como guía adicional pero sin limitación, la tabla 1 en págs. 20-31 del documento WO 2018/073651, incorporado como referencia en el presente documento, lista muchas secuencias alélicas del locus diana PPA2385 usado en los SLST de Scholz *et al.* para identificar los tipos de SLST de las cepas de *P. acnes*.

Las cepas ilustrativas pero no limitativas de *C. acnes* útiles en el presente documento se pueden obtener de colecciones públicas de microorganismos mantenidas por ejemplo por la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares del Leibniz Institute DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, <https://www.dsmz.de/catalogues.html>), o por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209, EE. UU.) o por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Agencia de Protección de la Salud - Porton Down Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido), incluyendo la cepa de *C. acnes* KPA171202 (DSMZ nº. acc. DSM-16379), cepa de *C. acnes* subsp. *defendens* (no. acc. ATCC 11828), cepa de *C. acnes* (no. acc. ATCC 6919), cepa de *C. acnes* subsp. *elongatum* (ECACC nº. acc. NCTC 13655), y otras.

Además, las cepas de *C. acnes* de virtualmente cualquier tipo o subtipo útiles en el presente documento pueden muestrearse fácilmente y aislarse de la piel de humanos adultos, preferiblemente adultos sanos, o de biopelículas de *C. acnes* en prótesis ortopédicas infectadas. Cualquier protocolo disponible para aislamiento, cultivo y expansión de *C. acnes* se puede adoptar. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una composición se puede formar por aislamiento y cultivo de uno o más *C. acnes* de un sujeto donante, particularmente un sujeto donante no que tiene enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y preferiblemente un sujeto donante que tiene piel sana en general, y combinándola con otros portadores para formar la composición.

A modo de ejemplo y sin limitación, un protocolo adecuado para obtener aislados de *C. acnes* de la piel se describió en Holmberg *et al.* 2009 Clin Microbiol Infect 15:787-95). En el mismo, un área de 3x3 cm de la frente de un sujeto humano se hisopó con un hisopo de punta de algodón, humedecido con salina fisiológica estéril, y se colocó en placa en agar de sangre (LabM Ltd, Heywood, Bury, Reino Unido) que contiene sangre de caballo (4 %). Las placas se incubaron bajo condiciones anaerobias (10 % de H₂, 10 % de CO₂, 80 % de N₂) a 37 °C por 72 horas. Los aislados se caracterizaron como *C. acnes* usando criterios microbiológicos de rutina, incluyendo apariencia macroscópica característica (colonias pequeñas típicas), características de tinción Gram, y la producción de catalasa e indol. Los aislados se congelaron a -80 °C en glicerol (50 % v/v). Las bacterias podrían cultivarse además en caldo de Bacto Brain Heart Infusion (BHI; Becton y Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.) suplementadas con glucosa (0,5 %) y mantenidas

en una cámara anaerobia por 72 h a 37 °C. Cuando se realizó en 48 individuos sanos, esto produjo 48 aislados de *C. acnes* que pertenecen a los tipos IA, IB, II (véase la tabla 2 de Holmberg *et al.*, incorporado como referencia en el presente documento).

- 5 Las células de *C. acnes* pueden cultivarse y expandirse además en una variedad de medios, incluyendo medio rico o mínimo, preferiblemente medio rico tales como esos mencionados antes. Como se entenderá por una persona de experiencia ordinaria en la técnica, la optimización de rutina podría permitir el uso de una variedad de tipos de medios. Los medios pueden complementarse con varios componentes adicionales, incluidas las fuentes de azúcar. Algunos ejemplos no limitantes de complementos incluyen glucosa, aminoácidos, vitaminas, lípidos, glicerol, y complemento mineral traza ATCC. De manera similar, otros aspectos del medio y las condiciones de crecimiento de las células de la invención se pueden optimizar mediante la experimentación rutinaria. Por ejemplo, el pH, la temperatura y la concentración de componentes dentro de las composiciones son ejemplos no limitativos de factores que pueden optimizarse. Los cultivos líquidos y/o sólidos usados para cultivar las células de *C. acnes* pueden alojarse en cualquiera de los recipientes de cultivo conocidos y usados en la técnica. En algunas realizaciones, las cepas de *C. acnes* se cultivan en lotes. En algunas realizaciones, las cepas bacterianas se cultivan en fermentadores. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden las cepas bacterianas se envasa. En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden las cepas bacterianas se envasa en jeringas o saquitos. En ciertas realizaciones, las cepas bacterianas pueden secarse por congelamiento.
- 10 20 Se reportó previamente que algunas cepas de *C. acnes* están asociadas con, contribuyen a o son causantes de acné, mientras que otras cepas no muestran tal conexión al acné (Fitz-Gibbon *et al.* 2013 J Invest Dermatol 133:2152-2160; Lomholt *et al.* 2010 PLoS ONE 5: e12277). Estos autores también caracterizaron ciertos determinantes genéticos y metabólicos de la capacidad del *C. acnes* de contribuir al acné. Similarmente, el documento WO 2018/073651 describió ensayos metabólicos mediante los cuales las cepas patogénicas y no patogénicas de *C. acnes* podrían identificarse y seleccionarse con base en su expresión de ácido linoleico isomerasa activa que convierte específicamente el ácido linoleico cis-9, cis-12 en ácido linoleico trans-10, cis-12. En consecuencia, en ciertas realizaciones, la cepa o cepas de *C. acnes* como se pretenden en el presente documento no están asociados con, no contribuyen a y no son causantes de acné. Tales cepas de *C. acnes* pueden aislarse fácilmente de piel humana sana (en contrario la piel humana afectada por acné).
- 25 30 El término "cepa" es bien entendido como un rango taxonómico de bajo nivel usado dentro de una especie. En microbiología, una cepa puede definirse típicamente de manera operativa - una cepa se conforma de los descendientes de un único aislado en cultivo puro y normalmente se conforma de una sucesión de cultivos derivados finalmente de una única colonia inicial; o alternativamente, como un aislado o grupo de aislados que pueden distinguirse de otros aislados del mismo género y especie por características fenotípicas o características genotípicas o ambas. Como se usa en la práctica de la presente invención, el término "cepa" puede ser sinónimo con los términos operativos "aislado" o "clon".
- 35 40 El término "viva" como se usa en el presente documento es sinónimo con "viable" y se refiere a cualquier estado intacto vivo de un microorganismo, tal como crecimiento activo o estado latente, de cuyo estado se puede multiplicar y/o reproducir a sí mismo en un medio capaz de soportar el crecimiento del microorganismo. Típicamente, sustancialmente todas las bacterias de *C. acnes* comprendidas por las composiciones pretendidas en el presente documento pueden estar vivas o ser viables. Por ejemplo, al menos 50 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 75 %, aún más preferiblemente al menos 90 %, tal como al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de las bacterias en la composición son viables, tal como capaces de formar colonias cuando se colocan en placas en un medio sólido adecuado.
- 45 50 La cepa de *C. acnes* es capaz de secretar RoxP. El término "secretar", o sus formas alternativas tal como "que secreta" o "secreción", comúnmente se refieren a un movimiento de un material del interior de una célula a un espacio periplásmico o a un entorno extracelular. El término puede denotar más particularmente la traslocación de un polipéptido o proteína del interior de una célula a través de la membrana plasmática, de modo que la proteína pueda ser liberada como proteína soluble al entorno extracelular (sobrenadante celular).
- 55 60 Holland *et al.* 2010 (BMC Microbiol 10:230) reportaron que la proteína correspondiente a *C. acnes* ID de Gen PPA1939 (anotado meramente como "proteína hipotética, específica de *P. acnes*") se encontró en el secretoma de *P. acnes*. De acuerdo con Holland *et al.*, la proteína se secretó por los filotipos de *P. acnes* IA, IB, II, y III, pareció ser altamente expresa por evaluación semi-cuantitativa de geles teñidos de Coomassie, y contenían una secuencia de señal. La proteína se anotó bajo el número de acceso de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) AAT83657.1. En un estudio subsecuente, Allhorn *et al.* (2016 Sci Rep 6:36412) mostraron que la proteína PPA1939 es una enzima secretada que presenta actividad antioxidante en ciertas condiciones *in vitro*, y renombraron la proteína RoxP, que representa radical oxigenasa de *Propionibacterium acnes*. Allhorn *et al.* Recuperó la secuencia de la proteína RoxP de todos los genomas de *P. acnes* disponibles en ese momento y mostró que RoxP estaba altamente conservada entre la vasta mayoría de las cepas de *P. acnes*, con 58 cepas que tienen un homólogo idéntico, 33 cepas que tienen homólogos altamente similares (99 % de identidad), y un subgrupo de 11 homólogos de RoxP de las cepas de tipo II y tipo III de *P. acnes* siendo más distantes (83 % de identidad). Los autores también enseñaron los cebadores para amplificar por PCR y la secuencia del gen roxP de otros aislados (véase la tabla 1 de Allhorn *et al.*), y depositaron las secuencias de la proteína
- 65

RoxP de aislados de AD9, AD20, AD24, AD26, AS4, AS8, AS23, AS26, y AS39 bajo los números de acceso de Genbank AFJ11206.1, AFJ11207.1, AFJ11208.1, AFJ11209.1, AFJ11210.1, AFJ11211.1, AFJ11212.1, AFJ11213.1, y AFJ11214.1, respectivamente. Al analizar un número incluso mayor de aislados de *C. acnes*, los presentes inventores descubrieron que la mayoría (aproximadamente 93 %) de los aislados expresaron homólogos de RoxP con 99-100 % de identidad de secuencia, mientras que un subconjunto de cepas (aproximadamente 7 %) clasificadas como filotipos de *C. acnes* II y III expresaron una proteína relacionada más distamente, con aproximadamente 83 % de identidad de aminoácidos. Convenientemente, los homólogos de RoxP de varias cepas de *C. acnes* se pueden caracterizar en términos de identidad de secuencia total a la proteína RoxP de la cepa de *C. acnes* KPA171202 (DSMZ nº. acc. DSM-16379).

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* KPA171202 es:

MFVQIAASLAAASSIALGIPGAATPIIDESQLPVGPQSVTDSAQHTGPFAASSPLITVKP
GAPCVRADGYQESMVTRVLDDKGHQVWTGTFDESKLIGGTGLGTATFHVGSAAFN
FHGSERTTYRTLSYCAYPHYVNGTRERLSQSVKTFMVDPALN (SEQ ID NO: 1)

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* 266 (que muestra 99,4 % de identidad de secuencia a RoxP de KPA171202) es:

MFVQIAASLAAASSIALGIPGAATPIIDESQLPVGPQSVTDSAQHTGPFAASSPLITVKP
GAPCVRADGYQESMVTRVLDDKGHQVWTGTFDESKLIGGTGLGTATFHVGSAAFN
FHGSERTTYRTLSYCAYPHYVNGTRERLSQSVKTFMVDPTLN (SEQ ID NO: 2)

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* PMH-7 (que muestra 97,5 % de identidad de secuencia a RoxP de KPA171202) es:

MFVQIAASLAAASSIALGMPGAATPIIDESQLPVGPQSVTDSAQHTGPFAASSPLAITVK
PGAPCVRADGYQESMVTRVLDDKGHQVWTGTFDESKLIGGTGLGTATFHVESPAAAF
NFHGNERTTYRTLSYCAYPHYVNGTRERLSQSVKTFMVDPALN (SEQ ID NO: 3)

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* 09-09 (que muestra 83,2 % de identidad de secuencia a RoxP de KPA171202) es:

MFVQIAASLAAASTIALGVPGAATPLNGSQLPTGPQSVTDPAQHTGPSTATPLTIKV
PSAPCVRADGRQQSLVARVLDDKGHQVWSGTFDESQLIGGTGRGTATFHVGSAAAF
NFHGGKRTTYRALGYCAYPHYVNGTRERLSQSVKTFTVDPAIN (SEQ ID NO: 4)

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* AD24 (que muestra 83 % de identidad de secuencia a RoxP de KPA171202) es:

MFVQIAASLAAASTIALGVPGAATPLNGSQLPTGPQSVTDPAQHTGPSTATPLTIKV
PSAPCVRADGRQQSLVARVLDDKGHQVWSGTFDESQLIGGTGRGTATFHVGSAAAF
NFHGGKRTTYRALGYCAYPHYVNGTRERLSQSVKTFTVDPAIN (SEQ ID NO: 19)

A modo de un ejemplo y no de limitación, la secuencia de aminoácidos del polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* 09-109 es idéntica (es decir, 100 % de identidad de secuencia) a RoxP de KPA171202 (SEQ ID NO: 1).

La referencia a RoxP así denota el polipéptido o proteína RoxP como comúnmente se conoce bajo esta designación en la técnica, de cualquier cepa o aislado de *C. acnes*. La persona experta puede apreciar que las secuencias de RoxP anteriores o las secuencias de RoxP depositadas en bases de datos de secuencias, o la secuenciación de RoxP obtenida por secuenciación adicional de las cepas de *C. acnes*, puede ser del precursor de RoxP, incluyendo un péptido de señal que puede o no puede removese proteolíticamente en la proteína RoxP secretada. Por ejemplo, las herramientas de análisis de secuencia de proteína predicen que los aminoácidos 1 a 22 de RoxP establecidos en la

anterior SEQ ID NO: 1 a 4 constituyen los respectivos péptidos de señal. La persona experta puede apreciar además que el residuo Met N-terminal de RoxP puede removese post-traduccionalmente y así estar ausente en la proteína RoxP secretada. La persona experta también apreciará que ciertas modificaciones post-traduccionales, tal como fosforilación, S-tiolación, hidroxilación, citrulinación, o N-glucosilación, pueden ocurrir en las células bacterianas, y que la presente divulgación abarca todas las proteínas RoxP, independientemente de si o no contienen cualesquier modificaciones post-traduccionales.

En ciertas realizaciones cuando se administra la cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, la cepa de *C. acnes* puede secretar RoxP endógenamente. Los términos "endógeno" o "endógenamente" se refieren comúnmente a un material, tal como un polipéptido, proteína, o ácido nucleico, que es nativo a o propio de una célula, y no se origina del exterior de la célula, tal como en particular no se introduce en la célula o en un predecesor de la célula por la acción del hombre. Por ejemplo, un ácido nucleico o gene endógeno puede estar presente dentro del genoma natural de la célula, y un polipéptido o proteína endógeno puede codificarse por el genoma natural de la célula. Por lo tanto, en tales realizaciones, la cepa de *C. acnes* secreta RoxP naturalmente, y no necesita ser y no está diseñada genéticamente para secretar RoxP.

En realizaciones adicionales, cuando se administra la cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, la cepa de *C. acnes* no está diseñada genéticamente. El término "diseñada genéticamente" se refiere ampliamente a una célula que se ha sometida a manipulaciones de ADN recombinante, resultando por ejemplo en una alteración aleatoria o dirigida de su genoma, o en la introducción transitoria o estable de molécula(s) de ácido nucleico exógeno. Una célula diseñada genéticamente presenta una constitución genética no encontrada originalmente en la naturaleza. Por lo tanto, preferiblemente en tales realizaciones, no solo es la célula no diseñada genéticamente para secrete RoxP, sino también no contiene ninguna otra alteración genética hecha por el hombre.

En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o la o las dos o más cepas de *C. acnes* individualmente o colectivamente, comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas puede secretar, al menos 1 µg de RoxP por ml de medio cuando se mide en fase estacionaria, tal como por ejemplo al menos 2 µg/ml, preferiblemente al menos 5 µg/ml, más preferiblemente al menos 8 µg/ml, y lo más preferiblemente al menos 10 µg/ml, tal como al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml o al menos 30 µg/ml (µg RoxP por ml de medio cuando se mide en fase estacionaria).

Para medir la cantidad de RoxP secretado en el medio, *C. acnes* puede cultivarse en un medio complejo rico, tal como caldo de soja tripticasa (TSB, disponible por ejemplo de Beckton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey), o caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI, disponible por ejemplo de Sigma-Aldrich), a 37 °C, en condiciones anóxicas (tal como 10 % de H₂, 10 % de CO₂, 80 % de N₂), hasta alcanzar la fase estacionaria, típicamente por 3-7 días. El sobrenadante (medio) puede separarse de las células por centrifugación (tal como a 3600 g durante 10 min).

Se puede usar cualquier método de separación, detección y cuantificación para medir la cantidad de RoxP en el sobrenadante / medio. Tales métodos pueden incluir métodos densitométricos, incluyendo SDS-PAGE más tinción de Coomassie o plata, métodos de ensayo bioquímico, incluyendo entre otros ensayos de actividad enzimática, métodos de ensayo inmunológico, tal como ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA) y técnicas a base de ELISPOT, radioinmunoensayo (RIA), transferencia de tipo Western, etc., métodos de análisis de espectrometría de masas (MS), tal como MS de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), métodos de cromatografía, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de intercambio de cationes o aniones, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), y similares.

Los presentes inventores también caracterizaron extensamente las secuencias en dirección 5' de RoxP de *C. acnes* natural incluyendo promotores de RoxP, e identificaron la existencia de al menos 8 secuencias dominantes de la región en la dirección 5' de RoxP, establecidas en SEQ ID NO: 5 a 12 en la figura 8. Los inventores identificaron además las secuencias de caja nativas -10 y -35 que pueden ser ventajosas para alcanzar la alta secreción endógena de RoxP por la *C. acnes*, y también así se pueden emplear para seleccionar potencialmente las cepas de alta expresión de *C. acnes*.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 12. En ciertas realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 12.

En ciertas realizaciones, las cepas de tipo I de *C. acnes* pueden preferirse como comparativamente altos expresores de RoxP endógeno. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o

son cepas de tipo I), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 8, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o son cepas de tipo I), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 9, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o son cepas de tipo I), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 10, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 10. En ciertas realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o son cepas de tipo I), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 12, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 12.

En ciertas realizaciones, las cepas tipo III de *C. acnes* pueden preferirse como comparativamente altos expresores de RoxP endógeno. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o son cepas de tipo III), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 7, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones, ciertas cepas de tipo II de *C. acnes* pueden preferirse como comparativamente altos expresores de RoxP endógeno. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* (particularmente en donde la cepa o cepas de *C. acnes* es o son cepas de tipo II), puede comprender la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 11, o una secuencia de ácido nucleico que es al menos cerca de 80 %, preferiblemente al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, tal como al menos cerca de 91 %, al menos cerca de 92 %, al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 %, tal como al menos cerca de 96 %, al menos cerca de 97 %, al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % idéntica (preferiblemente identidad de secuencia total) a la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO: 11.

En incluso realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender una caja -10 que tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT, preferiblemente TGCTATACT. Tal caja -10 puede encontrarse frecuentemente en cepas comparativamente de alta expresión de RoxP tipo I (incluyendo tipo IA o IB) de *C. acnes*, tal como por ejemplo las cepas ejemplificadas en la figura 8. Tal caja -10 también se puede encontrar en algunas cepas de tipo II de *C. acnes*, que por lo tanto se puede esperar que expresen RoxP endógeno a un nivel comparativamente más alto que otras cepas de tipo II de *C. acnes* (véase por ejemplo la cepa de tipo II 09-23 en la tabla 2 que tiene el promotor de RoxP de SEQ ID NO: 11). Tal caja -10 puede además ser encontrada frecuentemente en cepas comparativamente de alta expresión de RoxP de tipos SLST A, C, H o K (incluyendo K5 y K1) de *C. acnes*, tal como por ejemplo las cepas mostradas en la figura 8 y tabla 2 (véase la cepa tipo II/K1 09-23).

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo I de *C. acnes*, tal como una cepa de tipo IA o tipo IB de *C. acnes*, que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT, preferiblemente TGCTATACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IA de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno,

dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IB de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo II de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST A, C, H o K (tal como K5 o K1) de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo de SLST C de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo de SLST H de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa SLST de tipo K5 o K1 de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT.

En incluso realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender una caja -10 que tiene la secuencia TGCTACGCT. Tal caja -10 puede encontrarse frecuentemente en cepas de expresión comparativamente alta de RoxP de tipo I (preferiblemente de tipo IA) de *C. acnes*, tal como por ejemplo la cepa 523 ejemplificada en la figura 8. Tal caja -10 también se puede encontrar en algunas cepas de tipo III de *C. acnes*, que por lo tanto se puede esperar que expresen RoxP endógeno a un nivel comparativamente más alto que otras cepas de tipo III de *C. acnes*. Tal caja -10 además se puede encontrar frecuentemente en cepas de expresión comparativamente alta de RoxP tipos SLST G o L *C. acnes*, tal como por ejemplo las cepas mostradas en la figura 8.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo I de *C. acnes*, preferiblemente cepa de tipo IA de *C. acnes*, que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACGCT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo III de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACGCT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST L o G de *C. acnes* que comprende una caja -10 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACGCT.

En incluso realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender una caja -35 que tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT.

Tal caja -35 puede encontrarse frecuentemente en cepas comparativamente de alta expresión de RoxP tipo I (incluyendo tipo IA o IB) de *C. acnes*, tal como por ejemplo las cepas ejemplificadas en la figura 8. Tal caja -35 también se puede encontrar en algunas cepas de tipo II de *C. acnes*, que por lo tanto se puede esperar que expresen RoxP endógeno a un nivel comparativamente más alto que otras cepas de tipo II de *C. acnes*. Tal caja -35 además se puede encontrar frecuentemente en cepas de expresión comparativamente alta de RoxP tipos SLST A, C, G, H o K (incluyendo K5 y K1) de *C. acnes*, tal como por ejemplo las cepas mostradas en la figura 8 y tabla 2 (véase la cepa 9-23).

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo I de *C. acnes*, tal como una cepa de tipo IA o tipo IB de *C. acnes*, que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IA de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IB de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo II de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es un tipo de SLST A, C, G, H o K (tal como K5 y K1) de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST A, C, H, K5 o K1 de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST G de *C. acnes* que comprende una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCAAT.

En incluso realizaciones adicionales, el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de

las dos o más cepas de *C. acnes*, puede comprender una caja -10 que tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT, preferiblemente TGCTATACT, y una caja -35 que tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. Tales configuraciones pueden ser particularmente ventajosas ya que pueden proporcionar alta expresión y secreción de RoxP endógeno.

5 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo I de *C. acnes*, tal como una cepa de tipo IA o tipo IB de *C. acnes*, que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT, preferiblemente TGCTATACT, y dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IA de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT, y dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo IB de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo II de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST A, C, H o K (tal como K5 o K1) de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT y dicha caja -35 tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST G de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACGCT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCAAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST A de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST C de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTATACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST H de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, es una cepa de tipo SLST de K5 o K1 de *C. acnes* que comprende una caja -10 y una caja -35 en el promotor de RoxP endógeno, dicha caja -10 tiene la secuencia TGCTACACT y dicha caja -35 tiene la secuencia ACTTCGAT.

La cepa o cepas de *C. acnes* comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas pueden ser de cualquier tipo. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas pueden ser un tipo I, II o III de *C. acnes*. Los presentes inventores descubrieron que las cepas tipo I, incluyendo el subtipo IA y IB, de *C. acnes* presentan una secreción ventajosamente alta endógena de RoxP. Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo I, tal como de tipo IA o de tipo IB. Las cepas de tipo IA pueden ser particularmente preferidas. La secreción de RoxP por las cepas de tipo III también fue comparativamente alta. Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo III. En ciertas realizaciones preferidas, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo I o III. En ciertas realizaciones preferidas, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo IA, IB o III. Algunas cepas de tipo II también muestran secreción adecuadamente alta de RoxP, mientras la mayoría de cepas de tipo II presenta secreción de RoxP menor que esa de los tipos I y III. A modo de ejemplo, la tabla 2 en el ejemplo 1 muestra que la cepa de tipo II 09-23 expresa RoxP a un nivel comparable a o incluso mayor que muchas cepas de tipo I y III. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo II. Las cepas de alta expresión de RoxP de *C. acnes* de tipo II pueden ser particularmente ventajosas en el presente documento, ya que las cepas de tipo II se han notificado típicamente como no asociadas con acné, es decir, asociadas con piel normal o sana. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo SLST K1, particularmente tipo K1 que comprende el promotor de RoxP endógeno como se muestra en SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones adicionales, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, puede ser de tipo IA, IB, II o III.

65 La cepa o cepas de *C. acnes* comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas pueden ser de cualquier tipo de SLST. Los presentes inventores se dieron cuenta además de que algunos tipos de SLST pueden preferirse, por ejemplo debido a su alta secreción de RoxP y/u otras características (por ejemplo, no estar asociado con acné). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes*, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* cada una independientemente, comprendida por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas

puede ser de tipo de SLST A, C, G, H, L o K (tal como K5 o K1). Los tipos de SLST A o C incluyendo las cepas de tipo IA pueden ser particularmente preferidas.

En ciertas realizaciones, la cepa o cepas de *C. acnes* pueden seleccionarse del grupo que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de cualquiera de las cepas mostradas en los dibujos, tal como PM H5, 09-09, ATCC11828, 523, PM H7, 12.1.R1, 12.1.L1, KPA171202, 15.1.R1, 09-23, 266, 21.1.L1, 09-323, 09-109, 11-79, 30.2.L1, 10-43, AD24, y combinaciones de las mismas.

En ciertas realizaciones, la cepa o cepas de *C. acnes* comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas pueden cultivarse igualmente bien bajo condiciones aerobias y anaerobias.

La cepa de *C. acnes*, o la o las dos o más cepas de *C. acnes* individualmente o colectivamente, comprendidas por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas pueden estar presentes en la composición a cualquier cantidad compatible con el efecto cosmético, profiláctico o terapéutico deseado de las composiciones. En ciertas realizaciones, la cepa de *C. acnes* está, o las dos o más cepas de *C. acnes* individualmente o colectivamente están, presente(s) en la composición en una cantidad de al menos 100 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de la composición. En otras realizaciones, la cepa de *C. acnes* está, o las dos o más cepas de *C. acnes* individualmente o colectivamente están, presente(s) en la composición en una cantidad de al menos 200, al menos 500, al menos 1000, al menos 5000, al menos 1×10^4 , al menos 5×10^4 , al menos 1×10^5 , al menos 5×10^5 , o al menos al menos 1×10^6 UFC por gramo de la composición. En otras realizaciones, la cepa de *C. acnes* está, o las dos o más cepas de *C. acnes* individualmente o colectivamente están, presente(s) en la composición en una cantidad menor que 1×10^4 , o menor que 1×10^3 , o menor que 500, o menor que 200 UFC por gramo de la composición.

En ciertas realizaciones cuando se administra RoxP, la proteína o polipéptido puede aislarse o purificarse de una fuente natural de RoxP, tal como de una cepa que expresa RoxP de *C. acnes*, o puede producirse recombinantemente por un sistema de expresión adecuado de célula hospedera u organismo hospedero y aislado del mismo, o puede producirse recombinantemente por transcripción o traducción libre de células, o por síntesis no biológica de péptidos. Por lo tanto, la referencia a RoxP abarca proteínas producidas naturalmente, recombinantemente, semi-sintéticamente o sintéticamente.

El término "purificado" en este contexto no requiere pureza absoluta. En cambio, denota que una proteína o polipéptido está en un entorno discreto en el que su abundancia (convenientemente expresada en términos de masa o peso o concentración) con respecto a otros componentes es mayor que en el material original. Un entorno discreto denota un único medio, tal como por ejemplo una única solución, gel, precipitado, liofilizado, etc. Las proteínas o polipéptidos purificados pueden constituir preferiblemente en peso $\geq 10\%$, más preferiblemente $\geq 50\%$, tal como $\geq 60\%$, aún más preferiblemente $\geq 70\%$, tal como $\geq 80\%$, e incluso más preferiblemente $\geq 90\%$, tal como $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o incluso el 100 %, del contenido de proteína del entorno discreto. El contenido de proteína puede determinarse, por ejemplo, por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951 J Biol Chem 193:265), opcionalmente como se describe por Hartree 1972 Anal Biochem 48:422-427. La pureza de los péptidos, polipéptidos, o proteínas puede determinarse por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata.

Maneras ilustrativas pero no limitantes de aislar o purificar RoxP nativo secretado por *C. acnes* se establecen en la sección de ejemplos. Por ejemplo, la metodología de Allhorn *et al.* 2016 (*supra*) se puede adoptar. En ella, una combinación de precipitación de sulfato de amonio, una cromatografía de intercambio iónico de dos pasos (aniónico y catiónico) y exclusión de tamaño se emplearon para purificar RoxP de sobrenadante de *C. acnes* a aproximadamente 95 % de homogeneidad. Más específicamente, en una realización de tal método de purificación, *C. acnes* cultivado a fase estacionaria se recolecta por centrifugación a 3600 g durante 10 min; el sobrenadante de cultivo se filtra estéril (0,22 µm) y precipita con 50 % de sulfato de amonio; la pella se resuelve en 10 mM de Tris-HCl pH 8,8 y dializa durante la noche (MWCO 3,500); la muestra se carga en una columna equilibrada HiTrap Q FF (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), y se eluye con 50 mM de NaCl (10 mM de Tris-HCl pH 8,8); se realiza una segunda diálsis (50 mM de NaOAc-HOAc pH 5,0); las muestras se hacen discurrir en una columna HiTrap SP FF (GE Healthcare), y se eluyen con 100 mM de NaCl (50 mM de NaOAc-HOAc pH 5,0). Finalmente, las fracciones se hacen discurrir a través de un filtro de 50 kDa MWCO (Amicon Ultra, Ultracel-50K). En otro ejemplo, se puede emplear una combinación de precipitación de sulfato de amonio de sobrenadante de *C. acnes* y purificación en una columna de criogel. En otro ejemplo, el sobrenadante de *C. acnes* puede concentrarse por filtraciones de flujo Tangencial, usando un corte de 30 kDa en un primer paso y un corte de 3 kDa en un segundo paso.

En consecuencia, en ciertas realizaciones, la composición puede comprender, consistir esencialmente de o consistir del sobrenadante de una cepa cultivada viva de *C. acnes* que secreta RoxP, preferiblemente que secreta endógenamente RoxP. En ciertas otras realizaciones, la composición puede comprender, consistir esencialmente de o consistir de una fracción del sobrenadante enriquecida con RoxP de una cepa cultivada viva de *C. acnes* que secreta RoxP, preferiblemente que secreta endógenamente RoxP. El término "fracción enriquecida con RoxP" del sobrenadante denota una fracción o un entorno discreto obtenido por el procesamiento del sobrenadante, en el que la abundancia de RoxP se incrementa en comparación con la abundancia de RoxP en el sobrenadante. Por ejemplo, RoxP puede representar $\geq 50\%$, tal como $\geq 60\%$, aún más preferiblemente $\geq 70\%$, tal como $\geq 80\%$, e incluso más

preferiblemente ≥ 90 %, tal como ≥ 95 %, ≥ 96 %, ≥ 97 %, ≥ 98 %, ≥ 99 % o incluso el 100 %, del contenido de proteína de la fracción enriquecida.

- 5 En ciertas realizaciones, RoxP puede producirse recombinantemente por un sistema de expresión adecuado de célula hospedera u organismo hospedero y aislado del mismo. Para este fin, un casete de expresión o un vector de expresión se construye que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica RoxP (opcionalmente optimizada por codón en un anfitrón particular) y un promotor enlazado operativamente a la molécula de ácido nucleico. El casete de expresión o vector de expresión luego se introduce en células hospederas o un organismo hospedero adecuado que permite la expresión y preferiblemente la secreción de RoxP. Las secuencias de ácido nucleico que codifican RoxP están disponibles fácilmente. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica RoxP de *C. acnes* aislado AD26, que muestra solo un mal apareamiento al nivel de aminoácido con polipéptido RoxP nativo de la cepa de *C. acnes* KPA171202 como se muestra en SEQ ID NO: 1, está anotado bajo el número de acceso de Genbank JN051668.1. Además, Allhorn *et al.* (2016 Sci Rep 6:36412) enseña cebadores para amplificar por PCR y secuencia aislada de ácido nucleico del gen *roxP* ampliamente de varios aislados de *C. acnes*.
- 10 15 Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN que habilita que se transcriba un gen. Un promotor es reconocido por ARN polimerasa, que luego inicia la transcripción. Así, un promotor contiene una secuencia de ADN que ya sea está unida directamente por, o está involucrada en el reclutamiento, de ARN polimerasa. Una secuencia promotora también puede incluir "regiones potenciadoras", que son una o más regiones de ADN que pueden unirse con proteínas (a saber los factores que actúan en trans) para aumentar los niveles de transcripción de genes en un agrupamiento de genes. El potenciador, aunque típicamente está en el extremo 5' de una región codificante, también puede estar separado de una secuencia promotora, por ejemplo, puede estar dentro de una región intrónica de un gen o 3' a la región codificante del gen.
- 20 25 30 Un "enlace operativo" es un enlace en el que las secuencias reguladoras y las secuencias que se busca que expresen están conectadas de tal manera que permiten dicha expresión. Por ejemplo, las secuencias, tal como, por ejemplo, un promotor y un ORF, se puede decir que están enlazadas operativamente si la naturaleza del enlace entre dichas secuencias no: (1) resulta en la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) interfiere con la capacidad del promotor para dirigir la transcripción del ORF, (3) interfiere con la capacidad del ORF de transcribirse de la secuencia promotora. Por lo tanto, "enlazado operativamente" puede significar incorporado en un constructo genético de modo que las secuencias de control de expresión, tal como un promotor, controlan eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés.
- 35 40 45 El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible (condicional). Un promotor constitutivo se entiende que es un promotor cuya expresión es constante bajo las condiciones de cultivo estándar. Los promotores inducibles son promotores que son sensibles a una o más señales de inducción. Por ejemplo, un promotor inducible puede regularse químicamente (por ejemplo, un promotor cuya actividad transcripcional es regulada por la presencia o ausencia de un agente inductor químico tal como un alcohol, tetraciclina, un esteroide, un metal, u otra molécula pequeña) o regulado físicamente (por ejemplo, un promotor cuya actividad transcripcional es regulada por la presencia o ausencia de un inductor físico tal como luz o altas o bajas temperaturas). Un promotor inducible también puede regularse indirectamente por uno o más factores de transcripción que son por sí mismos regulados directamente por señales químicas o físicas.
- 50 La célula hospedera puede ser una célula bacteriana, una célula fúngica, incluyendo células de levadura, una célula animal, o una célula de mamífero, incluyendo células humanas y células de mamífero no humano. El organismo hospedero puede por ejemplo ser un organismo vegetal con lo cual la secreción de RoxP se dirige a la planta como un todo o a una parte particular de la planta tal como a las hojas; o puede ser un mamífero no humano lactante, con lo cual la secreción de RoxP se dirige al producto de la glándula mamaria del mamífero.
- 55 60 65 Los sistemas de expresión (células hospederas) que se pueden usar para producción de polipéptidos a pequeña o gran escala incluyen, sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* sp., *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, o *Bacillus subtilis*), por ejemplo transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido, o vectores de expresión de ADN de cósmido; o células fúngicas (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*, *Arxula adeninivorans*, levadura metilotrófica (por ejemplo, levadura metilotrófica del género *Candida*, *Hansenula*, *Oogataea*, *Pichia* o *Torulopsis*, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Ogataea minuta*, o *Pichia methanolica*), u hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, o *Chrysosporium*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, o levadura del género *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*), por ejemplo transformada con vectores de expresión fúngica recombinante. Los sistemas de expresión útiles también incluyen sistemas de células de insectos (por ejemplo, células derivadas de *Drosophila melanogaster*, tales como células Schneider 2, líneas celulares derivadas del gusano soldado *Spodoptera frugiperda*, tales como células Sf9 y Sf21, o derivados de células de la oruga de la col *Trichoplusia ni*, tales como células High Five) infectadas con vectores de expresión viral recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen las moléculas de ácido nucleico, y sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión viral recombinante (por ejemplo, virus mosaico del tabaco) o transformado con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti). Los sistemas de expresión de mamíferos incluyen células de mamífero

humano y no humano, tales como células de roedor, células de primate, o células de ser humano. Las células de mamífero, tales como células de mamífero humano o no humano, pueden incluir células primarias, secundarias, terciarias etc. o pueden incluir líneas celulares inmortalizadas, incluyendo líneas celulares clonales. Las células animales preferidas pueden mantenerse y transformarse fácilmente en cultivo de tejido. Un ejemplo no limitante de células humanas incluyen la línea celular de HeLa humano (cáncer cervical). Otras líneas celulares humanas comunes en la práctica del cultivo de tejido incluyen entre otras células 293 de riñón embrionario humano (células HEK), DU145 (cáncer de próstata), Lncap (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), MDA-MB-438 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata), T47D (cáncer de mama), THP-1 (leucemia mieloide aguda), U87 (glioblastoma), SHSY5Y (neuroblastoma), o células Saos-2 (cáncer de hueso). Un ejemplo no limitante de células de primate son células Vero (línea celular epitelial de riñón de Mono verde Africano Chlorocebus), y células COS. ejemplos no limitantes de células de roedor son líneas celulares de rata GH3 (tumor hipofisario), CHO (ovario de hámster Chino), PC12 (feocromocitoma), o línea celular de ratón MC3T3 (calvario embrionario). Tales células, antes del diseño genético como se especifica en el presente documento, se pueden obtener de una variedad de fuentes comerciales e instalaciones de recursos de investigación, tal como, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). Varios promotores pueden ser adecuados para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, el promotor metalotioneina, el promotor tardío de adenovirus, o el promotor de citomegalovirus. Tales herramientas y métodos para la expresión de la proteína heteróloga son generalmente bien conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión de hospederos bacterianos, tales como sistemas de expresión de *E. coli*, o levadura, tal como *Pichia pastoris*, se pueden preferir. Dependiendo del sistema de expresión, o en la manipulación química o enzimática post-expresión, RoxP puede portar una o más modificaciones de tipo co- o post-expresión de la cadena de polipéptido, tal como, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, sulfonación, metilación, ubiquitinación, remoción de péptido de señal, remoción de Met N-terminal, etc. También se prevén las modificaciones post-traduccionales no naturales.

El término "variante" de RoxP abarca proteínas o polipéptidos cuya la secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica (es decir, en gran medida pero no completamente idéntica) a la secuencia de aminoácidos de RoxP, tal como a la secuencia de aminoácidos de un RoxP nativo o de tipo silvestre de *C. acnes*, por ejemplo al menos cerca de 80 % idéntica o al menos cerca de 83 % idéntica o al menos cerca de 85 % idéntica, por ejemplo, preferiblemente al menos cerca de 90 % idéntica, por ejemplo, al menos 91 % idéntica, al menos 92 % idéntica, más preferiblemente al menos cerca de 93 % idéntica, por ejemplo, al menos 94 % idéntica, incluso más preferiblemente al menos cerca de 95 % idéntica, por ejemplo, al menos 96 % idéntica, aún más preferiblemente al menos cerca de 97 % idéntica, por ejemplo, al menos 98 % idéntica, y lo más preferiblemente al menos 99 % idéntica. Preferiblemente, una variante puede presentar tales grados de identidad a RoxP cuando toda la secuencia de la variante y RoxP son cuestionadas en la alineación de secuencia (es decir, identidad de secuencia total). Además preferiblemente, la variante puede presentar al menos cerca de 80 %, o al menos cerca de 83 %, o al menos cerca de 85 %, o al menos cerca de 90 %, o al menos cerca de 91 %, o al menos cerca de 92 %, o al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, o al menos cerca de 95 %, o al menos cerca de 96 %, o al menos cerca de 97 %, o al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % de identidad de secuencia a RoxP de la cepa de *C. acnes* KPA171202 como se establece en SEQ ID NO: 1 anterior, o a la porción de dicho RoxP de SEQ ID NO: 1 que carece del péptido de señal N-terminal.

La identidad de secuencia entre proteínas o polipéptidos o ácidos nucleicos como se contempla en el presente documento puede determinarse usando algoritmos adecuados para realizar las alineaciones de secuencia y la determinación de la identidad de secuencia como se conoce *por se*. Algoritmos ejemplares pero no limitantes incluyen esos basados en la herramienta Basic Local Alignment Search (BLAST) originalmente descrita por Altschul *et al.* 1990 (*J Mol Biol* 215: 403-10), tal como el algoritmo de "secuencias Blast 2" descrito por Tatusova and Madden 1999 (*FEMS Microbiol Lett* 174: 247-250), por ejemplo usando las configuraciones de valor de referencia publicadas u otras configuraciones adecuadas (tal como, por ejemplo, para el algoritmo BLASTN: costo para abrir un vacío = 5, costo para extender un vacío = 2, penalización para una no coincidencia = -2, premio para una coincidencia = 1, vacío x_caída = 50, valor de expectativa = 10,0, tamaño de palabra = 28; o para el algoritmo BLASTP: matriz = Blosum62 (Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:10915-10919), costo para abrir un vacío = 11, costo para extender un vacío = 1, valor de expectativa = 10,0, tamaño de palabra = 3). La identidad de secuencia como se contempla en el presente documento puede denotar preferiblemente la identidad de secuencia total, es decir, la identidad de secuencia calculada de la alineación de las secuencias enteras de las proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos comparados. Un procedimiento de ejemplo para determinar el por ciento de identidad entre una secuencia de aminoácido particular y la secuencia de aminoácidos de un polipéptido cuestionado implicará la alineación de las dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo de secuencias de Blast 2 (Bl2seq), disponible como una aplicación en la red informática o como un programa ejecutable independiente (BLAST versión 2.2.31+) en el sitio de la red informática NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando parámetros de algoritmo adecuados. Un ejemplo de parámetros de algoritmo adecuados incluyen: matriz = Blosum62, costo para abrir un vacío = 11, costo para extender un vacío = 1, valor de expectativa = 10,0, tamaño de la palabra = 3). Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el resultado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el resultado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, el número de coincidencias se determinará por conteo del número de posiciones donde un residuo de aminoácido idéntico está presente en ambas secuencias. El por ciento de identidad es determinado al dividir el número de coincidencias por la longitud del polipéptido cuestionado, seguido por multiplicación del valor resultante por 100. El valor de por ciento de identidad puede, pero no necesita, redondearse a la decena más cercana. Por ejemplo, 78,11, 78,12, 78,13, y 78,14 puede redondearse hacia abajo a 78,1, mientras que 78,15, 78,16, 78,17, 78,18, y 78,19 puede redondearse hacia

arriba a 78,2. Se aprecia además que la vista detallada para cada segmento de alineación como se descarga por BL2seq ya incluye convenientemente el porcentaje de identidades.

Una variante de RoxP puede pero no necesitar ser un homólogo (por ejemplo, ortólogo o parálogo) de RoxP. Como se usa en el presente documento, el término "homología" generalmente denota similitud estructural entre dos macromoléculas de mismos o diferentes taxones, en donde dicha similitud se debe a los ancestros compartidos.

Una variante de RoxP puede comprender una o más adiciones, delecciones, o sustituciones de aminoácidos con respecto (es decir, en comparación con) la correspondiente proteína RoxP o polipéptido.

Por ejemplo, una variante (variante de sustitución) de RoxP puede comprender hasta 30 (por ejemplo, no más que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, o 30) sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a (es decir, en comparación con) la correspondiente proteína RoxP o polipéptido; o una variante (variante de sustitución) de RoxP puede comprender hasta 30 (por ejemplo, no más que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, o 30) sustituciones no conservadoras de aminoácidos con respecto a la correspondiente proteína RoxP o polipéptido; o una variante (variante de sustitución) de RoxP puede comprender hasta 30 (por ejemplo, no más que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, o 30) sustituciones conservadoras y no conservadoras de aminoácidos combinadas con respecto a la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. Una sustitución conservadora de aminoácido es una sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina, valina, e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, cisteína, y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrófobos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (es decir, básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (es decir, ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier sustitución de un miembro de los grupos antes mencionados polar, básico, o ácido por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución. En contraste, una sustitución no conservadora es una sustitución de un aminoácido por otro con características distintas.

Alternativamente o además, una variante (variante de delección) de RoxP puede carecer de hasta 30 (por ejemplo, no más que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, o 30) aminoácidos con respecto a la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. Cuando dos o más aminoácido se eliminan, estos pueden ser no contiguos o dos o más o todos los aminoácidos eliminados pueden ser contiguos en la correspondiente proteína RoxP o polipéptido.

El término "fragmento" de RoxP típicamente se refiere a formas eliminadas o truncadas N-terminalmente y/o C-terminalmente de la proteína RoxP o polipéptido. El término abarca fragmentos que surgen por cualquier mecanismo, tal como, sin limitación, por la expresión heteróloga de una forma truncada de la proteína RoxP de longitud completa o polipéptido, o por proteólisis física, química o enzimática de la proteína RoxP de longitud completa o polipéptido *in vivo* o *in vitro*. Sin limitación, un fragmento de RoxP puede representar al menos cerca de 50 % (por número de aminoácido), por ejemplo, al menos cerca de 60 %, o al menos cerca de 70 %, o al menos cerca de 80 %, o al menos cerca de 90 %, o al menos cerca de 91 %, o al menos cerca de 92 %, o al menos cerca de 93 %, o al menos cerca de 94 %, o al menos cerca de 95 %, o al menos cerca de 96 %, o al menos cerca de 97 %, o al menos cerca de 98 %, o al menos cerca de 99 % de la secuencia contigua de aminoácidos de dicha proteína RoxP o polipéptido. Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede incluir una secuencia de al menos cerca de 80, o al menos cerca de 90, o al menos cerca de 100, o al menos cerca de 110, o al menos cerca de 120, o al menos cerca de 130, o al menos cerca de 140, o al menos cerca de 150, o al menos cerca de 155 aminoácidos consecutivos de la correspondiente proteína RoxP de longitud completa o polipéptido. En ciertas realizaciones, un fragmento de RoxP puede estar truncado N-terminalmente y/o C-terminalmente por entre 1 y cerca de 20 aminoácidos, tal como por entre 1 y cerca de 15 aminoácidos, o por entre 1 y cerca de 10 aminoácidos, o por entre 1 y cerca de 5 aminoácidos, en comparación con la correspondiente proteína RoxP de longitud completa o polipéptido.

En ciertas realizaciones, un fragmento de RoxP puede comprender, consistir esencialmente de o consistir de un estiramiento contiguo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 66-83 de la proteína RoxP nativa mostrada en SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede incluir el estiramiento contiguo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 66-83 de la proteína RoxP nativa mostrada en SEQ ID NO: 1 y puede incluir además: a) 1-5 o 6-10 o 11-15 o 16-20 o 21-30 o 31-50 aminoácidos contiguos inmediatamente N-terminalmente adyacentes a dicho estiramiento en la proteína RoxP y/o b) 1-5 o 6-10 o 11-15 o 16-20 o 21-30 o 31-50 aminoácidos contiguos inmediatamente C-terminalmente adyacentes a dicho estiramiento en la proteína RoxP. Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede comprender, consistir esencialmente de o consistir del estiramiento contiguo de aminoácidos VRADGYQESMVTRLDDK (SEQ ID NO: 20). Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede ser el péptido indicado en el presente documento como "péptido RoxP 1" cuya la secuencia de aminoácidos es como se establece en SEQ ID NO: 20. Notablemente, el péptido RoxP 1 demostró presentar actividad antioxidante.

En ciertas realizaciones, un fragmento de RoxP puede comprender, consistir esencialmente de o consistir de un

estiramiento contiguo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 128-140 de la proteína RoxP nativa mostrada en SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede incluir el estiramiento contiguo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 128-140 de la proteína RoxP nativa mostrada en SEQ ID NO: 1 y puede incluir además: a) 1-5 o 6-10 o 11-15 o 16-20 o 21-30 o 31-50 aminoácidos contiguos inmediatamente N-terminalmente adyacentes a dicho estiramiento en la proteína RoxP y/o b) 1-5 o 6-10 o 11-15 o 16-20 o 21 aminoácidos contiguos inmediatamente C-terminalmente adyacentes a dicho estiramiento en la proteína RoxP. Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede comprender, consistir esencialmente de o consistir del estiramiento contiguo de aminoácidos RTLTSYCAPHYVN (SEQ ID NO: 21). Por ejemplo, un fragmento de RoxP puede ser el péptido indicado en el presente documento como "péptido RoxP 2" cuya la secuencia de aminoácidos es como se establece en SEQ ID NO: 21.

Notablemente, el péptido RoxP 2 demostró presentar actividad antioxidante.

La referencia a "fragmento o variante" o "variante o fragmento" de cualquier proteína o polipéptido abarca fragmentos de variantes de tal proteína o polipéptido, y variantes de fragmentos de tal proteína o polipéptido.

El término "biológicamente activo" es intercambiable con los términos tal como "funcionalmente activo" o "funcional", que denota que el fragmento y/o variante retiene al menos parcialmente la actividad biológica o funcionalidad pretendida de la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. La referencia a la "actividad" de una proteína o polipéptido, o péptido puede generalmente abarcar cualquiera uno o más aspectos de la actividad biológica de la proteína o polipéptido, tal como sin limitación cualquiera uno o más aspectos de su actividad bioquímica, actividad enzimática, actividad de señalización, actividad de interacción, actividad de ligando, y/o actividad estructural, por ejemplo, dentro de una célula, tejido, órgano o un organismo. A modo de un ejemplo preferido, un fragmento biológicamente activo o variante de RoxP debe retener al menos parcialmente la actividad antioxidante de la correspondiente proteína RoxP o polipéptido.

Preferiblemente, un fragmento funcionalmente activo o variante de RoxP puede retener al menos cerca de 20 %, por ejemplo, al menos cerca de 25 %, o al menos 30 %, o al menos cerca de 40 %, o al menos cerca de 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, más preferiblemente al menos cerca de 70 %, por ejemplo, al menos 80 %, aún más preferiblemente al menos cerca de 85 %, incluso más preferiblemente al menos cerca de 90 %, y lo más preferiblemente al menos cerca de 95 % o incluso cerca del 100 % del actividad antioxidante o funcionalidad en comparación con la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. En ciertas realizaciones, un fragmento funcionalmente activo o variante de RoxP puede incluso presentar mayor actividad antioxidante o funcionalidad en comparación con la correspondiente proteína RoxP o polipéptido, por ejemplo puede presentar al menos cerca de 100 %, o al menos cerca de 150 %, o al menos cerca de 200 %, o al menos cerca de 300 %, o al menos cerca de 400 %, o al menos cerca de 500 % del actividad antioxidante o funcionalidad en comparación con la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. A modo de un ejemplo, donde la actividad antioxidante puede medirse fácilmente en un ensayo con un resultado o señal cuantitativa, un fragmento funcionalmente activo o variante de RoxP puede producir una señal que es al menos cerca de 20 %, o al menos cerca de 25 %, o al menos 30 %, o al menos cerca de 40 %, o al menos cerca de 50 %, o al menos 60 %, más preferiblemente al menos cerca de 70 %, o al menos 80 %, o al menos cerca de 85 %, o al menos cerca de 90 %, o al menos cerca de 95 %, o al menos cerca de 100 %, o al menos cerca de 150 %, o al menos cerca de 200 %, o al menos cerca de 300 %, o al menos cerca de 400 %, o al menos cerca de 500 % de la señal producida por la correspondiente proteína RoxP o polipéptido. Pruebas cuantitativas representativas pero no limitantes de actividad antioxidante se describen en los ejemplos, tal como en los ejemplos 2 y 3 (ensayo de catión de radical ABTS), Ejemplo 4 (protección de células humanas *in vitro* de daño oxidativo provocado por paraquat), y ejemplos 7-11 (protección de epidermis humana reconstituida de daño oxidativo provocado por UV u ozono), y puede usarse en este contexto. El ensayo de catión de radical ABTS puede ser particularmente directo y se puede preferir.

RoxP puede estar comprendido por las presentes composiciones cosméticas o farmacéuticas a cualquier cantidad o cantidad compatible con el efecto deseado cosmético, profiláctico o terapéutico de las composiciones. En algunas realizaciones, particularmente las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos 1×10^{-9} M RoxP, tal como por ejemplo al menos al menos 1×10^{-8} M, al menos 5×10^{-8} M, al menos 1×10^{-7} M, o al menos 5×10^{-7} M, preferiblemente al menos 1×10^{-6} M, al menos 5×10^{-6} M, al menos 1×10^{-5} M, o al menos 5×10^{-5} M, y más preferiblemente al menos 1×10^{-4} M, tal como al menos 2×10^{-4} M, al menos 3×10^{-4} M, al menos 4×10^{-4} M, al menos 5×10^{-4} M, al menos 6×10^{-4} M, al menos 7×10^{-4} M, al menos 8×10^{-4} M, al menos 9×10^{-4} M, o al menos 1×10^{-3} M RoxP. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-3} M, o entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-3} M, o entre 1×10^{-6} M y 1×10^{-3} M, o entre 1×10^{-5} M y 1×10^{-3} M, o entre 1×10^{-4} M y 1×10^{-3} M RoxP. Mientras las composiciones cosméticas pueden comprender cantidades comparables de RoxP, cantidades sustancialmente menores pueden cumplir con las expectativas cosméticas de las composiciones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, particularmente las composiciones cosméticas pueden comprender 1×10^{-9} M o menor RoxP, tal como 5×10^{-10} M o menor, 1×10^{-11} M o menor, 5×10^{-12} M o menor, o 1×10^{-13} M o menor RoxP.

En ciertas realizaciones, la composición cosmética o farmacéutica que comprende una o más cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP como se enseña en el presente documento, pueden comprender además RoxP como se enseña en el presente documento. Tales composiciones permitirán la coadministración de ambos activos como se da a conocer en el presente documento. En ciertas realizaciones, la composición cosmética o farmacéutica que comprende una o más cepas vivas de *C. acnes* que secretan RoxP como se enseña en el presente documento, y la composición cosmética o farmacéutica que comprende RoxP puede proporcionarse como un producto combinado o kit de partes

para administración simultánea, separada o secuencial (en cualquier orden) de los respectivos activos.

Como se usa a través de toda esta especificación, los términos "terapia" o "tratamiento" se refieren al alivio o reducción medible de uno o más síntomas o marcadores medibles de una condición patológica tal como una enfermedad o trastorno. Las reducciones medibles incluye cualquier declive estadísticamente significativo en un síntoma o marcador medible. Generalmente, los términos abarcan tanto tratamientos curativos como tratamientos dirigidos a reducir síntomas y/o desacelerar la progresión de la enfermedad. Los términos abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una condición patológica ya desarrollada, así como medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o reducir las oportunidades de incidencia de una condición patológica. Los resultados clínicos deseados o benéficos incluyen, pero no se limitan a, prevención de una enfermedad, reducción de la incidencia de una enfermedad, alivio de síntomas asociados con una enfermedad, disminución del grado de una enfermedad, estabilización de la enfermedad, demora o desaceleración de la progresión de una enfermedad, mejora o paliación de una enfermedad, o combinaciones de los mismo. En ciertas realizaciones, los términos pueden relacionarse a tratamientos terapéuticos. En ciertas otras realizaciones, los términos pueden relacionarse a tratamientos preventivos.

El tratamiento de una condición patológica crónica durante el periodo de remisión también puede considerarse que constituye un tratamiento terapéutico. El término puede abarcar tratamientos *ex vivo* o *in vivo* según sea apropiado en el contexto de la presente invención.

El término "sujeto" típicamente y preferiblemente denota seres humanos, pero también puede abarcar referencia a animales no humanos, preferiblemente animales de sangre caliente, incluso más preferiblemente mamíferos, tal como, por ejemplo, primates no humanos, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos, etc. El término "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos oxidativos, tales como primates no humanos, particularmente primates superiores, ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratones o ratas), cobayas, cabras, cerdos, gatos, conejos, vacas, y no mamíferos tales como pollos, anfibios, reptiles etc. En ciertas realizaciones, el sujeto es un animal no humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un animal no humano transgénico o mamífero no humano. En realizaciones preferidas, el sujeto es humano. En otras realizaciones, el sujeto es un animal experimental o animal como modelo de enfermedad. El término no denota una edad o sexo particular, e incluye entre otros recién nacidos, niños, adolescentes, y adultos incluyendo los ancianos, ya sea masculinos o femeninos.

En aspectos y realizaciones relacionadas a las intervenciones terapéuticas o profilácticas los términos "sujeto" y "paciente" pueden usarse indistintamente. Los sujetos o pacientes adecuados en necesidad de prevenir o tratar una enfermedad como se enseña en el presente documento incluyen esos que podrían beneficiarse de tratar la enfermedad o esos en quienes se va a prevenir dicha enfermedad. Tales sujetos o pacientes incluyen sin limitación pacientes que se presentan con un médico para un examen para la enfermedad, pacientes que se presentan con un médico con síntomas y signos indicativos de la enfermedad, pacientes diagnosticados con la enfermedad, pacientes propensos a contraer o desarrollar la enfermedad, pacientes quienes han recibido o son sometidos a tratamiento de la enfermedad, y pacientes que tienen una enfermedad como se enseña en el presente documento en remisión. En aspectos y realizaciones relacionadas a tratamientos cosméticos, el término "sujeto" que no implica la presencia de una condición patológica en el sujeto, puede preferirse sobre el término "paciente". Una frase tal como "un sujeto en necesidad de" una cierta intervención, tal como el tratamiento de una condición dada, incluye sujetos que podrían beneficiarse del tratamiento de esa condición. La presencia o ausencia de una necesidad del sujeto para recibir una intervención dada tal como tratamiento puede inferirse por varios métodos de diagnóstico o de evaluación benéfica, incluyendo los métodos y usos descritos en otro lado en la especificación.

Como se usa en el presente documento "enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo" se refiere ampliamente a enfermedades o síntomas de enfermedades asociadas con, contribuidas a, provocadas por o que resultan de un desequilibrio entre la producción y desintoxicación de radicales libres tal como en particular especie de oxígeno reactivo (ROS) o especie de nitrógeno reactivo (RNS) en favor del pro-oxidante, en tejido o células de la piel llevando a daño de tejido o celular en la piel. ejemplos no limitantes de ROS incluyen anión superóxido, anión hidroperóxido, radical hidroxilo, oxígeno singlete, anión hipoclorito, ter-butil hidroperóxido, y similares. ejemplos no limitantes de RNS incluyen óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), y similares. Una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo puede afectar solo la piel o puede afectar uno o más de otros tejidos u órganos además de la piel. Una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo puede ser crónica o aguda. Sin desear limitarse por ninguna teoría, el estrés oxidativo en la piel puede llevar a inflamación crónica, que a su vez puede provocar la fragmentación de colágeno y desorganización de las fibras de colágeno y las funciones de las células de la piel; más aún se reportó que el estrés oxidativo también participa en la mayoría si no es que en todas las etapas de carcinogénesis.

En ciertas realizaciones, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de queratosis actínica (AK), carcinoma de células basales (BCC), carcinoma de células escamosas (SCC), caspa, dermatitis seborreica, acné, inflamación, dermatitis, psoriasis, eczema, rosácea, urticaria y vitíligo. En ciertas realizaciones preferidas, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo es AK. En realizaciones preferidas adicionales, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo es BCC. En realizaciones aún más preferidas, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo es SCC. En realizaciones aún más preferidas, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo es caspa. En realizaciones aún más preferidas, la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo es dermatitis seborreica.

- 5 Cualquiera de tales enfermedades puede incluir componentes, aspectos o procesos distintos de esos relacionados al estrés oxidativo. En ciertas realizaciones, los presentes usos profilácticos o métodos tratan, resuelven o afectan el o los componentes, aspectos o procesos del estrés oxidativo, de cualquiera de tales enfermedades, por ejemplo, mejoran o restauran el equilibrio redox en el tejido o células de la piel.
- 10 Los usos cosméticos o métodos como se enseña en el presente documento generalmente comprenden administrar a la piel del sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de la composición cosmética como se enseña en el presente documento, que es una cantidad suficiente para producir el efecto cosmético relacionado a la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en el sujeto, que se busca por el cosmetólogo o experto en belleza, en cualquiera de una única o múltiples dosis. Los usos profilácticos o terapéuticos o métodos como se enseña en el presente documento generalmente comprenden administrar a la piel del sujeto una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se enseña en el presente documento. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" generalmente denota una cantidad suficiente para producir el efecto farmacológico o respuesta medicinal en un sujeto que se busca por un practicante médico tal como un doctor médico, clínico, cirujano, veterinario, o investigador, que puede incluir entre otros el alivio de los síntomas de la enfermedad que se está tratando, en cualquiera de una sola o múltiples dosis. El término "cantidad profilácticamente eficaz" generalmente denota una cantidad suficiente para producir el efecto preventivo, tal como inhibición o demorar del inicio de una enfermedad, en un sujeto que se busca por el practicante médico, ya sea en una sola o múltiples dosis. Las dosis apropiadas cosméticamente eficaces de las presentes composiciones puede determinarlas un cosmetólogo con debida consideración a la edad y condición de la piel del paciente. Las dosis apropiadas profilácticamente o terapéuticamente eficaces de las presentes composiciones pueden determinarse por un médico calificado con debida consideración de la naturaleza y gravedad de la enfermedad, y la edad y condición del paciente. La cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento que se van a administrar pueden depender de muchos factores diferentes y pueden determinarse por uno de experiencia ordinaria en la técnica a través de experimentación de rutina. Muchos factores no limitantes que pudieran ser considerados que incluyen actividad biológica del ingrediente activo, naturaleza del ingrediente activo, características del sujeto que se va a tratar, etc.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- El término "administrar" generalmente significa dispensar o aplicar, y típicamente incluye ambas de administración *in vivo* y *ex vivo* a un tejido, preferiblemente administración *in vivo*. Generalmente, las composiciones pueden administrarse sistémicamente o localmente. Dada la naturaleza de los presentes tratamientos cosméticos, profilácticos o terapéuticos, y la naturaleza del ingrediente activo, las presentes composiciones pueden configurarse preferiblemente para administración tópica a la piel del sujeto.
- El término "administración tópica" como se usa generalmente en los campos cosmético y médico denota la aplicación de composiciones directamente a un parte del cuerpo. Particularmente en el presente caso el término se refiere a administración tópica sobre la piel de un sujeto, más particularmente sobre la superficie de la piel del sujeto, e incluso más particularmente sobre una parte, región o área de la superficie de la piel del sujeto donde se busca el efecto cosmético o farmacológico. La administración tópica típicamente no pretende y no produce ningún efecto sistémico.
- Las composiciones cosméticas o farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento comprenden típicamente, además del uno o más activos, uno o más portadores cosméticamente o farmacéuticamente aceptables.
- Como se usa en el presente documento, los términos "portador" o "excipiente" se usan indistintamente e incluyen ampliamente cualquiera y todos los solventes, diluyentes, tampones (tal como, por ejemplo, salina tamponada neutra, salina tamponada con fosfato, u opcionalmente Tris-HCl, tampones de acetato o fosfato), solubilizantes (tal como, por ejemplo, Tween® 80, polisorbato 80), coloides, medio de dispersión, vehículos, rellenos, agentes quelantes (tal como, por ejemplo, EDTA o glutatona), aminoácidos (tal como, por ejemplo, glicina), proteínas, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsificantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para lograr un efecto de depósito, revestimientos, agentes antifúngicos, conservantes (tal como, por ejemplo, ThimerosalTM, alcohol bencílico), antioxidantes (tal como, por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), agentes de control de tonicidad, agentes de demora de absorción, adyuvantes, agentes espesantes (tal como, por ejemplo, lactosa, manitol) y similares. El uso de tal medio y agentes para la formulación de composiciones farmacéuticas y cosméticas es bien conocido en la técnica.
- También se pueden usar bases acuosas, en polvo u oleosas, o espesantes en las preparaciones para la administración tópica a la piel. Los ejemplos de dichos ingredientes incluyen diversos compuestos hidroxilados, como glicoles monoméricos, por ejemplo, propilenglicol, alcohol etílico, glicerina y butilenglicol, humectantes poliméricos como poliglicericilmetacrilato, derivados de palmitatos y estearatos, triglicéridos de ácidos grasos, lanolina, aceites vegetales o minerales y ceras.
- En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden una cepa viva de *C. acnes* pueden comprender además un medio para estabilizar las bacterias. Este medio puede incluir, por ejemplo, agua pura, salina en tampón de fosfato (PBS), peptona (por ejemplo peptona digerida en tripsina o digerida en ácido de caseína o carne), una versión diluida o sin diluir de un medio de crecimiento adecuado o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el porcentaje de peptona en la composición bacteriana es cerca de 0,05 % p/v o cerca de 0,1 % p/v, y puede variar de

0,005 % p/v a 1 % p/v, o de 0,05 % p/v a 1 % p/v. En algunas realizaciones, el porcentaje de peptona es menor que 0,005 % p/v, o es mayor que 1 % p/v, o es cerca de 0,25 % p/v. En otras realizaciones, un medio de crecimiento adecuado se usa además de o en vez de peptona.

- 5 En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender un tampón. El tampón puede ayudar a estabilizar el pH de la composición. En realizaciones, el pH está entre 4,5 y 8. Por ejemplo, el pH puede ser aproximadamente 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0, que incluye cualquier valor entre ellos. En algunas realizaciones, el pH es aproximadamente 7,0. ejemplos no limitantes de tampones incluyen ACES, acetato, ADA, hidróxido de amonio, AMP (2-amino-2-metil-l-propanol), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), AMPSO, BES, BICINE, bis-tris, BIS-TRIS propano, borato, CABS, cacodilato, CAPS, CAPSO, carbonato (pK1), carbonato (pK2), CHES, citrato (pK1), citrato (pK2), citrato (pK3), DIPSO, EPPS, HEPPS, etanolamina, formato, glicina (pK1), glicina (pK2), glicilglicina (pK1), glicilglicina (pK2), HEPBS, HEPES, HEPPSO, histidina, hidrazina, imidazol, malato (pK1), malato (pK2), maleato (pK1), maleato (pK2), MES, metilamina, MOBS, MOPS, MOPSO, fosfato (pK1), fosfato (pK2), fosfato (pK3), piperazina (pK1), piperazina (pK2), piperidina, PIPES, POPSO, propionato, piridina, pirofosfato, succinato (pK1), succinato (pK2), TABS, TAPS, TAPSO, taurina (AES), TES, tricina, trietanolamina (TEA), y Trizma (tris).

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender un espesante. ejemplos no limitantes de espesantes incluyen hidroxietilcelulosas (por ejemplo NATROSOL®), almidón, gomas tal como goma arábica, caolín u otras

- 20 arcillas, silicato de aluminio hidratado, sílice pirogénica, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio u otros derivados de celulosa, monoestearato de etilenglicol y alginatos de sodio. En algunas realizaciones, el tipo de viscosidad de la hidroxietilcelulosa es HHR-P, HH, H4, H, MH, M, K, G, E o L. En algunas realizaciones, la concentración del espesante, tal como hidroxietilcelulosa, está entre aproximadamente 1 %-5 % p/v. Por ejemplo, la concentración puede ser cerca de 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, o 5,0 % p/v. En otras realizaciones, la concentración de espesante, tal como hidroxietilcelulosa, es menor que 1 % p/v o mayor que 5 % p/v. En algunas realizaciones, la concentración de espesante, tal como hidroxietilcelulosa, es aproximadamente 1,5 % p/v. En algunas realizaciones, la concentración de espesante, tal como hidroxietilcelulosa, es aproximadamente 2,5 % p/v.

- 30 En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender un solvente o un agente tensoactivo. ejemplos no limitantes de solventes incluyen agua, alcohol etílico, tolueno, cloruro de metileno, isopropanol, alcohol n-butílico, aceite de ricino, etilen glicol monoétil éter, dietilen glicol monobutil éter, dietilen glicol monoétil éter, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y tetrahidrofurano. i) Agentes tensoactivos aniónicos, tales como sales metálicas o de alanolamina de ácidos grasos por ejemplo laurato de sodio y oleato de trietanolamina; alquilbencenosulfonas, por ejemplo trietanolaminadodecibencenosulfonato; alquilsulfatos, por ejemplo lauril sulfato de sodio; alquil éter sulfatos, por ejemplo lauril éter sulfato de sodio (2 a 8 EO); sulfosuccinatos, por ejemplo dioctil sulfonsuccinato de sodio; sulfatos de monoglicérido, por ejemplo gliceril monoestearato monosulfato de sodio; isotionatos, por ejemplo isotionato de sodio; metil tauridas, por ejemplo Igepon T; acilsarcosinatos, por ejemplo miristil sarcosinato de sodio; péptidos de acilo, por ejemplo Maypons y lamepons; acil lactilatos, éter glicolatos polialcoxilados, por ejemplo ácido trideceth-7 carboxílico; fosfatos, por ejemplo dilauril fosfato de sodio; agentes tensoactivos catiónicos, tal como sales de amina, por ejemplo clorhidrato de sapamina; sales cuaternarias de amonio, por ejemplo Quaternium 5, Quaternium 31 y Quaternium 18; agentes tensoactivos anfóteros, tales como compuestos de imidazol, por ejemplo Miranol; N-alquil aminoácidos, tal como cocamino(propionato de sodio y derivados de asparagina; betaínas, por ejemplo cocamidopropilebetaína; agentes tensoactivos no iónicos, tales como alanolamidas de ácido graso, por ejemplo etanolamida oleica; ésteres o polialcoholes, por ejemplo Span; poliglicerol ésteres, por ejemplo esos esterificados con ácidos grasos y uno o muchos grupos OH; derivados polialcoxilados, por ejemplo esteearato de polioxi:polioxietileno; éteres, por ejemplo polioxietilen lauril éter; éteres de éster, por ejemplo Tween® tal como Tween 80 (polisorbato 80); óxidos de amina, por ejemplo óxidos de dimetilamina de coco y dodecilo.

- 50 En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender un emoliente. ejemplos no limitativos de emolientes incluyen alcohol estearílico, monoricinoleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, propano-1,2-diol, butano-1,3-diol, aceite de visón, alcohol cetílico, isoestearato de isopropilo, ácido esteárico, palmitato de isobutilo, estearato de isocetilo, alcohol oleílico, laurato de isopropilo, laurato de hexilo, oleato de decilo, octadecan-2-ol, alcohol de isocetilo, palmitato de cetilo, dimetilpolisiloxano, sebacato de di-n-butilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, esteearato de isopropilo, esteearato de butilo, polietilenglicol, trietilenglicol, lanolina, aceite de ajonjolí, aceite de coco, aceite de arrachis, aceite de ricino, alcoholes de lanolina acetilados, petróleo, aceite mineral, miristato de butilo, ácido isosteárico, ácido palmítico, linoleato de isopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo, oleato de decilo, miristato de miristilo.

- 60 En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender un humectante. ejemplos no limitantes de humectantes incluyen glicerina, sorbitol, 2-pirrolidona-5-carboxilato de sodio, colágeno soluble, dibutilftalato, o gelatina.

- 65 En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender un agente astringente. Los ejemplos no limitantes de agentes astringentes incluyen flores de árnica o extractos de las mismas, alcoholes de alquilo inferior, hamamelis, ácido bórico, ácido láctico, metol, alcanfor, fenolsulfato de zinc, acetato de aluminio, sulfato de aluminio y cloruro o

sulfato de zinc.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender un pigmento. Los ejemplos no limitantes de pigmentos incluyen dióxido de titanio, micas, óxidos de hierro, laca de bario, laca de calcio, laca de aluminio, oxicloruro de bismuto, laca de circonio y óxidos de calcio.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden un agente colorante. ejemplos no limitantes de agente colorante incluyen shikonina, β -caroteno, paprika, monascus, rojo de cártamo, amarillo de cártamo, color rojo de repollo, color púrpura de camote, licopeno, color de cacao, color de uva, cochinilla, color de resina, rojo de remolacha, hemateína, Rojo. No. 215, Rojo. No. 218, Rojo. No. 223, Rojo. No. 225, Naranja No. 201, Naranja No. 206, Amarillo No. 201, Verde No. 202, y Morado No. 201, Rojo. No. 2, Rojo. No. 3, Rojo. No. 102, Rojo. No. 104 (1), Rojo. No. 105 (1), Rojo. No. 106, Amarillo No. 4, Amarillo No. 5, Verde No. 3, Azul No. 1, Azul No. 2, Rojo. No. 201, Rojo. No. 213, Rojo. No. 214, Rojo. No. 227, Rojo. No. 230 (1), Rojo. No. 230 (2), Rojo. No. 231, Rojo. No. 232, Naranja No. 205, Naranja No. 207, Amarillo No. 202 (1), Amarillo No. 202 (2), Amarillo No. 203, Verde No. 201, Verde No. 204, Verde No. 205, Azul No. 202, Azul No. 203, Azul No. 205, y Marrón No. 201.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender cualquiera uno o más filtros de radiación UV-A y UV-B, protectores solares, bloqueadores de radicales libres, extractos de vitamina, o antioxidantes.

20 En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender un perfume.

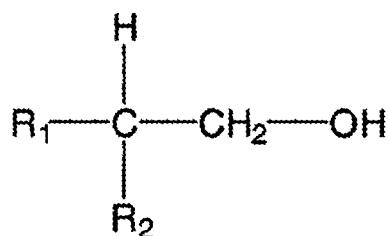
Los excipientes que se pueden incluir en las composiciones dadas a conocer en el presente documento se describen además en el presente documento.

25 En ciertas realizaciones preferidas, uno o más agentes espesantes pueden seleccionarse del grupo que consiste de carbómero, polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C 10-30, copolímero de acriloildimetiltaurato de amonio/VP, goma xantano, poliacrilato de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa acetato butirato, carboximetilhidroxietilcelulosa, goma de celulosa, celulosa acetato propionato carboxilato, cetilhidroxietilcelulosa, etilcelulosa, goma hidrolizada de celulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietiletilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmethylcelulosa, metilcelulosa, metiletiletilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, celulosa microcristalina, celulosa sulfato de sodio, copolímero de acrilatos, polímero cruzado 4 de acrilatos, polímero cruzado de poliacrilato-1, copolímero de acrilatos/copolímero de steareth-20 metacrilato, copolímero de acrilatos/beheneth-25 metacrilato, y combinaciones de los mismos.

35 En ciertas realizaciones preferidas, uno o más filtros UV pueden seleccionarse del grupo que consiste de ácido 2-fenil-3H-bencimidazol-5-sulfónico y/o la sal del mismo; ácido fenilen-1,4-bis-(2-bencimidazol)-3,3'-5,5'-tetrasulfónico y sales del mismo (por ejemplo (CTFA): tetrasulfonato disódico de fenildibencimidazol); 1,4-di(2-oxo-10-sulfo-3-borniliden-metil)benceno y sales del mismo; ácido 4-hidroxi-2-metoxi-5-(oxo-fenilmethyl)bencensulfónico y sales del mismo (por ejemplo (CTFA): benzofenona-4, benzofenona-5); ácido 4-(2-oxo-3-bornilidenmetil)bencenosulfónico y sales del mismo; ácido 2-metil-5-(2-oxo-3-bornilidenmetil)sulfónico y sales del mismo; ácido tereftalididencanforsulfónico; y combinaciones de los mismos.

También adecuado para protección de radiación UV es una sustancia de filtro de UVA y / o al menos una sustancia de filtro de UVB, pigmento inorgánico, derivados de bisresorcinciltriazina, 2,4-bis-[{[4-(2-ethylhexiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazindioctilbutamidotriazona, octiltriazona, derivados de bisresorcinciltriazina, sal sódica de 2,4-bis-[{[4-(3-sulfonato)-2-hidroxi-propiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(3-(2-propiloxi)-2-hidroxi-propiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(2-ethylhexiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-[4-(2-metoxietil-carboxil)-fenilamino]-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(3-(2-propiloxi)-2-hidroxi-propiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-[4-(2-ethyl-carboxil)-fenilamino]-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(2-ethylhexiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-1-metil-pirrol-2-il]-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(3-trimetsilosiloxi-sililpropiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina, 2,4-bis-[{[4-(1',1',1',3',5',5',5'-heptametilsiloxi-2"-metilpropiloxi)-2-hidroxi]fenil}-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina, bisimidazilato, ácido fenilbencimidazolsulfónico, ácido tereftalididencanforsulfónico, ácido 4-(2-oxo-3-bornilidenmetil)bencenesulfónico, ácido 2-metil-5-(2-oxo-3-bornilidenmetil)sulfónico, 1,4-di(2-oxo-10-sulfo-3-bornilidenmetil)benceno, derivados de 3-bencildenalcanfor, derivados del ácido 4-aminobenzoico, derivados de benzofenona, salicilato de homomentilo, 2-ethylhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato, 2-ethylhexil-2-hidroxibenzoato, ácido 4-metoxicinnámico (2-ethylhexil)éster, homosalato, octocrieno, salicilato de octilo, metoxicinnamato de octilo, p-metoxicinnamato de isoamillo, copolímero de (3-(4-(2,2-bis-eticocarbonilvinil)fenoxi)propenil)-metilsiloxano / dimetilsiloxano, derivados de dibenzoylmetano, 4-(tert-butil)-4'-metoxidibenzoylmetano, 4-isopropil-dibenzoylmetano, Tinosorb M[®], benzotriazol, drometrizol trisiloxano [2,4'-dihidroxi-3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-2'-n-octoxi-5'-benzoyl]difenilmetano, 2,2'-metilen-bis-[6-(2N-benzotriazol-2-il)-4-(metil)fenol], 2,2'-metilenbis[6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol], 2-(2'-hidroxi-5'-octilfenil)benzotriazol, 2-(2'-hidroxi-3'benzotriazol, 5'-di-t-amilfenil)benzotriazol y 2-(2'-hidroxi-5'-metilfenil), ácido fenilen-1,4-bis-(2-bencimidazol)-3,3'-5,5'-tetrasulfónico y sus sales, sales de ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico, derivados de ácido 1,4-di(2-oxo-10-sulfo-3-bornilidenmetil)benceno, derivados del ácido sulfónico de 3-bencildenalcanfor, anisotriazina, dietilhexilbutamidotriazona, etilhexiltriazona, 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol), drometrizol trisiloxano, derivados de 3-bencildenalcanfor, derivados de ácido 4-

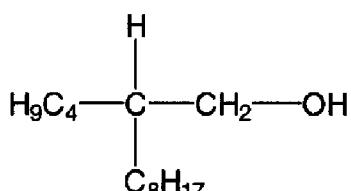
- aminobenzoico, derivados de benzofenona, derivados de 3-(4-(2,2-bis-etoxicarbonilvinil)fenoxi)propenil)-metoxisiloxan/dimetilsiloxanodibenzoolmetano [por ejemplo, 4-(ter-butil)-4'-metoxidibenzoolmetano, ácido fenilen-1,4-bis-(2-bencimidazil)-3,3'-5,5'-tetrasulfónico y / o sus sales, 1,4-di(2-oxo-10-sulfo-3-bornilidenmetil)benceno y / o sus sales y / o 2,4-bis-[{[4-(2 etil-hexiloxi)-2-hidroxifenil]-6-(4-metoxifénil)-1,3,5-triazina, óxidos metálicos, TiO₂, ZnO, Fe₂O₃, ZrO₂, SiO₂, MnO, Al₂O₃, Ce₂O₃, Aerosil®, pigmentos inorgánicos tratados en su superficie, dibromodicianobutano (2-bromo-2-bromometilglutarodinitril), 3-yodo-2-propinilbutilcarbamato, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, imidazolidinilurea, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-cloroacetamida, cloruro de benzalconio, alcohol bencílico, donantes de formaldehído, y combinaciones de los mismos.
- 10 En ciertas realizaciones preferidas, las composiciones pueden comprender aceites polares, por ejemplo esos del grupo de lecitinas y triglicéridos de ácidos grasos, a saber los ésteres de triglicerol de ácidos alcanocarboxílicos saturados y / o insaturados, ramificados y / o sin ramificar que tienen una longitud de cadena de 8 a 24, en particular 12 a 18 átomos de C. Los triglicéridos de ácidos grasos pueden, por ejemplo, ventajosamente ser elegidos del grupo de aceites sintéticos, semisintéticos y naturales, tal como aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soya, aceite de cacahuate, aceite de semilla de colza, aceite de almendras, aceite de palma, aceite de coco, aceite de ricino, aceite de germen de trigo, aceite de semilla de uva, aceite de cártamo, aceite de onagra, nuez de macadamia y similares. Ejemplos particularmente preferidos de aceites polares son triisostearina, triglicéridos o carbonatos caprílico / cáprico, tal como di-n-octil carbonatos, y combinaciones de los mismos.
- 15 20 Componentes de aceite más polar se pueden seleccionar del grupo de ésteres ácidos alcanocarboxílicos saturados y / o insaturados, ramificados y / o sin ramificar que tienen una longitud de cadena de 3 a 30 átomos de carbono y alcoholes saturados y / o insaturados, ramificados y / o sin ramificar que tienen una longitud de cadena de 3 a 30 átomos de carbono, y del grupo de ésteres de ácidos carboxílicos y alcoholes aromáticos saturados y / o insaturados, ramificados y / o sin ramificar con longitud de cadena de 3 a 30 átomos de carbono, y combinaciones de los mismos. Tales ésteres pueden entonces ser ventajosamente seleccionados del grupo que consiste de miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, estearato de isopropilo, oleato de isopropilo, estearato de n-butilo, laurato de n-hexilo, oleato de n-decilo, estearato de isoctilo, nonanoato de isoctilo, estearato de isononilo, isononanoato de isononilo, neopentanoato de isodecilo, isononanoato de cetearilo, cocoato de octilo, tridecilo, hexacaprat, tridecilo, isononanoato de cetearilo, hexacaprilato, dicaprato, dicaprilato, palmitato de 2-ethylhexilo, laurato de 2-ethylhexilo, esteearato de 2-hexildecilo, palmitato de 2-octildodecilo, oleato de oleilo, erucato de oleilo, oleato de erucilo, erucato de erucilo y mezclas sintéticas, semi-sintéticas y naturales de tales ésteres tal como aceite de jojoba.
- 25 30 Para emulsiones de agua / aceite, la fase de aceite puede elegirse ventajosamente del grupo de dialquil éteres, el grupo de alcoholes saturados o insaturados, ramificados o sin ramificar, tal como octildodecanol. Por ejemplo, la fase de aceite de las emulsiones W / O puede tener un contenido de benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅.
- 35 El uso de alcoholes de Guerbet en la cosmética es conocido *per se*. Tales especies en la mayoría de los casos se caracterizan por la estructura



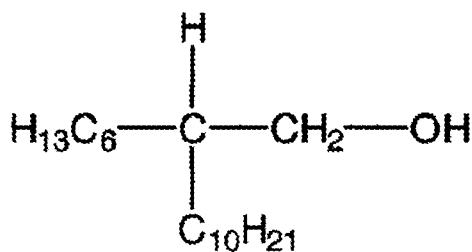
Como regla, R₁ y R₂ son radicales alquilo sin ramificar.

45 Por ejemplo, los alcoholes Guerbet pueden seleccionarse del grupo, en el que R₁ es propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo u octilo y R₂ es hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo o tetradecilo.

Alcoholes Guerbet preferidos pueden ser 2-butiloctanol:



50 o 2-hexildecanol:



o mezclas de los mismos, disponibles comercialmente.

- 5 La cantidad total de alcoholes Guerbet en las preparaciones cosméticas o dermatológicas terminadas puede elegirse ventajosamente de un intervalo hasta 25,0 % en peso, preferiblemente 0,5-15,0 % en peso, con base en el peso total de las preparaciones.
- 10 Un éster adicional adecuado es palmitato de cetilo.
- 10 Los aceites no polares pueden, por ejemplo, elegirse del grupo de hidrocarburos y ceras ramificados y sin ramificar, en particular jalea de petróleo (petrolato), aceite de parafina, escualano y escualeno, poliolefinas y polisobutenos hidrogenados. Entre las poliolefinas, los polidecenos son las sustancias preferidas.
- 15 Otros excipientes se pueden seleccionar del grupo de siliconas cíclicas y / o lineales, y aceites de silicona.
- 20 La feniltrimeticona puede elegirse ventajosamente como aceite de silicona. Otros aceites de silicona, tal como dimeticona, fenildimeticona, ciclometicona (octametilciclotetrasiloxano), por ejemplo hexametilciclotrisiloxano, polidimetilsiloxano, poli (metilfenilsiloxano), cetil dimeticona, behenoxidimeticona pueden usarse ventajosamente.
- 25 Mezclas de ciclometicona e isononanoato de isotrihexilo, así como esas de ciclometicona e isoestearato de 2-ethylhexilo son además ventajosas. También es ventajoso elegir aceites de silicona de constitución similar a los compuestos descritos antes cuyas cadenas secundarias orgánicas son derivatizadas, por ejemplo, polietoxiladas y / o polipropoxiladas. Para este fin, copolímeros de polisiloxano-polialquil-poliéter, tales como cetil dimeticona copoliol, incluyen, por ejemplo (cetil dimeticona copoliol y) poligliceril-4 isoestearato (y) hexil laurato). Otros excipientes pueden seleccionarse del grupo de ceras vegetales, ceras animales, ceras minerales, ceras petroquímicas, y combinaciones de las mismas. Tal como cera de candelilla, cera de carnauba, cera de Japón, pasta de esparto, cera de corcho, Guarumawachs, cera de aceite de germen de arroz, cera de caña de azúcar, cera de bayas, cera de ouricury, cera Montana, cera de jojoba, manteca de karité, cera de abeja, cera shellac, espermaceti, lanolina (cera de lana), grasa de uropígea, ceresina, ozokerita (cera de tierra), ceras de parafina y microceras, Syncrowax HRC (gliceril tribeneno), Syncrowax HGLC (triglicérido de ácido graso C₁₈₋₃₆) y Syncrowax AW 1C (ácido graso C₁₈₋₃₆) disponible de Croda GmbH y Dynasantipon, Montanesterwachse, ceras de sasol, ceras de jojoba hidrogenadas, cera de abeja sintética o modificada (por ejemplo, cera de abeja de dimeticona copoliol y / o cera de abeja de alquilo C₃₀₋₅₀), ceras de polialquilenos, ceras de polietilen glicol, pero también grasas químicamente modificadas tales como aceites vegetales hidrogenados (por ejemplo aceite de ricino hidrogenado y / o glicéridos grasos de coco hidrogenados), triglicéridos tal como trihidroxiestearina, ácidos grasos, éster de ácido graso y glicoéster tal como estearato de alquilo C₂₀₋₄₀, alquilhidroxiestearoilestearato C₂₀₋₄₀ y / o montanato de glicol, y combinaciones de los mismos. También es ventajoso ciertos compuestos de organosilicio que tienen similares propiedades físicas a componentes especificados de grasa y / o cera, tal como estearoxitrimetilsilano.
- 40 Una fase de aceite puede seleccionarse ventajosamente del grupo de isoestearato de 2-ethylhexilo, octildodecanol, isotrihexilo, butilen glicol dicaprilato / dicaprato, benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅, triglicérido de ácido caprílico-caprónico, dicaprilil éter, y combinaciones de los mismos.
- 45 Ventajosas pueden ser mezclas de octildodecanol, triglicérido de ácido caprílico-caprónico, dicaprilil éter, octil carbonatos, cocoglicéridos, o mezclas de benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ e isoestearato de 2-ethylhexilo, mezclas de benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ y butilen glicol dicaprilato / dicaprato y mezclas de benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅, isoestearato de 2-ethylhexilo, isotrihexilo, y combinaciones de los mismos.
- 50 De los hidrocarburos, aceite de parafina, cicloparafina, escualano, escualeno, polisobuteno hidrogenado, polideceno, y combinaciones de los mismos se pueden usar ventajosamente.
- 55 Excipientes adicionales pueden incluir lecitina, lanolina, cera microcristalina (cera microcristallina) mezclada con aceite de parafina (parafina líquida), ozokerita, aceite de ricino hidrogenado, poligliceril-3 oleato, mezclas de ácido de cera de lana, mezclas de alcohol y cera de lana pentaeritritolisoestearato, poligliceril-3-diisoestearato, cera de abejas (cera alba) y ácido esteárico, dihidroxicitilfosfato de sodio en mezcla con isopropilhidroxicitileter, metil glucosa dioleato, metil glucosa mezclado con cera de hidroxiestearato y cera de abejas, aceite mineral mezclado con petrolato y

- ozokerita y gliceril oleato y lanolina, mezcla de petrolato con ozokerita y aceite de ricino hidrogenado y gliceril y poligliceril-3 oleato, PEG-7 aceite de ricino hidrogenado, ozokerita y aceite de ricino hidrogenado, poliglyceril-4 isoestearato, poliglyceril-4 isoestearato en una mezcla con hexil laurato y cetil dimeticona copoliol, lauril meticona copoliol, cetil dimeticona copoliol, polímero cruzado de acrilato / acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀, poloxámero 101, poliglyceril-3-metilglucosadiestearato, poliglyceril-2-dipolihidroxiestearato, poliglyceril-3-diisoestearato, poliglyceril-4-dipolihidroxiestearato, PEG-30-dipolihidroxiestearato, ciisoestearoilpoliglyceril-3-diisoestearato, poliglyceril-2-dipolihidroxiestearato, poliglyceril-3 dipolihidroxiestearato, poliglyceril-4-dipolihidroxiestearato, poliglyceril-3 dioleato, y combinaciones de los mismos.
- 10 Las emulsiones de agua / aceite pueden, si se desea, contener uno o más co-emulsificantes, especialmente ventajosamente seleccionados del grupo de las siguientes sustancias que actúan generalmente como emulsificantes O / W: Estearato de glicerilo en una mezcla con ceteareth-20, ceteareth-25, ceteareth-6 en una mezcla con alcohol estearílico, triceteareth-4 fosfato, cetilestearil sulfato de sodio, triaureth-4 fosfato de lecitina, laureth-4 fosfato, ácido esteárico, propilen glicol estearato SE, PEG-25 aceite de ricino hidrogenado, PEG-54 aceite de ricino hidrogenado, PEG-6 glicéridos de ácido caprílico / caprónico, gliceril oleato en la mezcla con propilen glicol ceteth-2, ceteth-20, polisorbato 60, gliceril estearato en una mezcla con PEG-100 estearato, laureth-4, ceteareth-3, isoestearil gliceril éter, alcohol cetilestearílico en una mezcla con cetilestearil sulfato de sodio, laureth-23, steareth-2, gliceril estearato en una mezcla con PEG-30 estearato, PEG-40 estearato, gliceril diestearato, copolímero de PEG-22 dodecil glicol, poliglyceril-2 PEG-4 estearato, ceteareth-20, metil glucosa, steareth-10, PEG-20 estearato, steareth-2 en una mezcla con PEG-8 diestearato, steareth-21, steareth-20, isosteareth 20, copolímero de PE G-45 / dodecil glicol, copolímero de metoxi PEG-22 / dodecil glicol, PEG-20 gliceril estearato, PEG-20 gliceril estearato, PEG-8 cera de abejas, poliglyceril-2 laurato, isoestearildiglycerilsuccinato, estearamidopropil PG-dimonio cloro fosfato, gliceril estearato SE, ceteth-20, trietyl citrato, PEG-20 metil glucosa sesquistearato, ceteareth-12, gliceril estearato, cetil fosfato, triceteareth-4 fosfato, triaureth-4-fosfato, poliglycerilmethylglucosediesterato, potasio cetil fosfato, isosteareth-10, poliglyceril-2-sesquiosostearato, ceteth -10, oleth-20, isoceteth-20, gliceril estearato en una mezcla con ceteareth-20, ceteareth-12, alcohol cetoestearílico y alcohol cetílico, alcohol cetilestearílico en una mezcla con PEG-20 estearato, PEG-30 estearato, PEG-40 estearato, PEG-100 estearato.
- 30 También adecuados pueden ser los emulsificante de silicona, alquilmeticona y / o alquildimeticona copolioles, ABIL® B 8842, ABIL® B 8843, ABIL® B 8847, ABIL® B 8851, ABIL® B 8852, ABIL® B 8863, ABIL® B 8873 y ABIL® B 8883.
- La persona experta debe apreciar que cualquier número de tales portadores o excipientes puede incluirse en las composiciones.
- 35 En ciertas realizaciones, las composiciones pueden formularse como un gel, crema, pomada, loción, gotas, rociador incluyendo rociadores de aerosol, espuma, o polvo. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden estar comprendidas por una máscara, almohadilla, parche, un dispositivo de dos cámaras (sistema de dosificación de dos componentes), o maquillaje. Las presentes composiciones pueden estar destinadas típicamente como composiciones "sin enjuague".
- 40 Las presentes composiciones pueden administrarse una vez o múltiples veces. En ciertas realizaciones, la composición se administra a intervalos regulares, mientras en otras realizaciones se administra a intervalos irregulares. Por ejemplo, la composición puede administrarse cuatro veces al día, tres veces al día, o dos veces al día, o diario, o cada 2 días, 3 días, 4 días, o 5 días, o una vez a la semana, o una vez cada 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o 8 semanas o más o menos frecuentemente incluyendo todos los valores intermedios.
- 45 La duración de la administración de las composiciones puede estar limitada o puede ser ilimitada o de extremo abierto. Por ejemplo, la administración puede sostenerse por 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses, o 1, 2, 3, 4, o 5 o más años.
- 50 También se proporcionan cualquiera de las composiciones en kits mencionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, un kit comprende un contenedor que contiene bacterias vivas o un contenedor que contiene bacterias vivas liofilizadas. Los kits pueden incluir un segundo contenedor que incluye medios como la peptona. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir antibiótico(s), desinfectante(s) (por ejemplo, BPO) y/o ácido salicílico. En algunas realizaciones, el(los) antibiótico(s), desinfectante(s) y/o ácido salicílico se usan para tratar previamente la piel antes de la aplicación de la composición que comprende bacterias vivas. Los kits también pueden incluir instrucciones para administrar la composición. En ciertas realizaciones, se proporcionan instrucciones para mezclar las cepas bacterianas con otros componentes de la composición. En algunas realizaciones, un kit incluye además un aplicador para aplicar la composición bacteriana a un sujeto.
- 55 También se da a conocer pero no forma parte de la materia objeto reivindicada un método para el diagnóstico de enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, comprendiendo el método determinar la cantidad de RoxP o la cantidad de *C. acnes* en una muestra de piel del sujeto. En ciertas realizaciones, dicha enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo puede seleccionarse del grupo que comprende AK, BCC, SCC, caspa, dermatitis seborreica, acné, inflamación, dermatitis, psoriasis, rosácea, urticaria y vitíligo.

También se da a conocer pero no forma parte de la materia objeto reivindicada un método para la determinación de si un sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, comprendiendo el método determinar la cantidad de RoxP o la cantidad de *C. acnes* en una muestra de piel del sujeto.

- 5 El término "diagnóstico" es común y bien entendido en la práctica médica. A modo de explicación adicional y sin limitación el término "diagnóstico", o su formas alternativas tal como "diagnosticar", generalmente se refiere al proceso o actuar de reconocer, decidir o concluir en una enfermedad o condición en un sujeto con base en los síntomas y signos y/o de resultados de varios procedimientos de diagnóstico (tal como, por ejemplo, de conocer la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores característicos de la enfermedad o condición diagnosticada).
- 10 El término "diagnóstico" como se usa en el presente documento también abarca ampliamente aspectos de la práctica de diagnóstico que se pueden referir más específicamente a monitorear, pronosticar o predecir una enfermedad. El término "monitorizar" generalmente se refiere al seguimiento de una enfermedad o una condición en un sujeto para cualquier cambio que pueda ocurrir con el tiempo. El término "pronóstico" generalmente se refiere a una anticipación en la progresión de una enfermedad o condición y el prospecto (por ejemplo, la probabilidad, duración, y/o grado) de recuperación. Un buen pronóstico de una enfermedad o condición puede abarcar la anticipación de una recuperación satisfactoria parcial o completa de la enfermedad o condición, preferiblemente dentro de un periodo de tiempo aceptable. Un buen pronóstico también puede abarcar comúnmente la anticipación de no empeorar o agravar más la enfermedad o condición, preferiblemente dentro de un periodo de tiempo dado. Un pronóstico malo de una enfermedad o condición puede generalmente abarcar la anticipación de una recuperación subestándar y/o recuperación insatisfactoriamente lenta, o sustancialmente sin recuperación o incluso más empeoramiento de la enfermedad o condición.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- Los términos "predecir" o "predicción" generalmente se refieren a una declaración de avance, indicación o pronóstico de una enfermedad o condición en un sujeto que no tiene (aún) dicha enfermedad o condición. Por ejemplo, una predicción de una enfermedad o condición en un sujeto puede indicar una probabilidad, oportunidad o riesgo de que el sujeto desarrollará dicha enfermedad o condición, por ejemplo dentro de un cierto periodo de tiempo o por una cierta edad. Dicha probabilidad, oportunidad o riesgo puede indicarse entre otros como un valor absoluto, intervalo o estadística, o puede indicarse con respecto a un sujeto de control adecuado o población de sujetos (tal como, por ejemplo, con respecto a una población de sujetos general, normal o sujetos sanos). Por lo tanto, la probabilidad, oportunidad o riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad o condición puede indicarse ventajosamente como aumento o disminución, o como veces de aumento o veces de disminución con respecto a un sujeto de control adecuado o población de sujetos.
- 35 Los presentes métodos para el diagnóstico de enfermedades o condiciones o para la determinación de si un sujeto podría beneficiarse de un curso dado de acción o tratamiento puede calificarse adecuadamente como métodos *in vitro* en que aplican uno o más procesamientos *in vitro* y/o pasos de análisis a una muestra removida del sujeto. El término "*in vitro*" generalmente denota fuera, o externo a, un cuerpo, por ejemplo, un cuerpo animal o humano.
- 40 Los presentes métodos o usos pueden permitir preferiblemente la sensibilidad y/o especificidad (preferiblemente, sensibilidad y especificidad) de al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 %, por ejemplo, ≥ 85 % o ≥ 90 % o ≥ 95 %, por ejemplo, entre cerca de 80 % y 100 % o entre cerca de 85 % y 95 %.
- 45 Por lo tanto, en tales métodos, RoxP o *C. acnes* constituyen biomarcadores que se van a determinar en una muestra de piel del sujeto. En consecuencia, también se da a conocer el uso de RoxP o *C. acnes* como un biomarcador para el diagnóstico de enfermedades de la piel asociadas a estrés oxidativo en un sujeto o para la determinación de si un sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.
- 50 En ciertas realizaciones, los presentes métodos o usos pueden evaluar una sola variable, tal como un solo biomarcador. En otras realizaciones, los presentes métodos o usos pueden evaluar dos o más variables, tal como dos o más biomarcadores. Por ejemplo, los métodos o usos pueden evaluar RoxP y *C. acnes*. Cada variable así medida, tal como cada biomarcador, puede evaluarse por separado e independientemente, o uno puede generar un perfil de los valores o cantidades para las dos o más variables. Así también se ha de entender por el experto que cualquier valor o cantidad como se refiere en el presente documento también puede abarcar un perfil. Similarmente, cualquier valor de referencia como se refiere en el presente documento también puede abarcar un perfil de referencia.
- 55 60
- El término "biomarcador" es ampliamente usado en la técnica y comúnmente ampliamente denota una entidad o sustancia biológica, tal como por ejemplo una molécula biológica y/o una porción detectable de la misma, o una célula tal como una célula de microbio (por ejemplo, bacteriana), cuya evaluación cualitativa y/o cuantitativa en un sujeto es predictiva o informativa (por ejemplo, predictiva, de diagnóstico y/o pronóstico) con respecto a uno o más aspectos del fenotipo y/o genotipo del sujeto, tal como, por ejemplo, con respecto al estado del sujeto como a una enfermedad o condición dada, o como a un beneficio esperado de un cierto curso de acción o tratamiento del sujeto.
- 65 Típicamente, los biomarcadores pueden basarse en células, o basarse en péptido, polipéptido y/o proteína, o basarse en ácido nucleico. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una célula microbiana (por ejemplo, bacteriana) de un

- género dado, especie, tipo (por ejemplo, filotipo), subtipo o cepa, o una célula microbiana (por ejemplo, bacteriana) de un fenotipo o genotipo dado, o que expresa una proteína o polipéptido dado, o que porta un elemento genético o secuencia dados. Por ejemplo, un biomarcador puede estar compuesto por péptidos, polipéptidos y/o proteínas codificadas por un gen dado. Por ejemplo, los biomarcadores a base de ácido nucleico pueden abarcar ADN, ARN y moléculas hibridas de ADN/ARN, tales como ADN de un gen dado o una molécula de ARN transcrita de un gen dado, o cualquier molécula de ARN o ADN (por ejemplo, copia de ADN, ADNc) que se origina de o se deriva de la molécula transcrita de ARN.
- La referencia en el presente documento a cualquier biomarcador, si se basa en péptido, polipéptido, proteína, o ácido nucleico, también abarca fragmentos de los mismos. Particularmente, la referencia a RoxP como un biomarcador abarca RoxP de longitud completa y también abarca cualquier fragmento del mismo. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a determinar o medir (la cantidad de) un péptido, polipéptido, proteína, o ácido nucleico biomarcador dados, puede abarcar medir (la cantidad de) el péptido, polipéptido, proteína, o ácido nucleico recitados, y/o medir uno o más fragmentos de los mismos. Por ejemplo, cualquier biomarcador de péptido, polipéptido, proteína, o ácido nucleico, y/o uno o más fragmentos de los mismos puede medirse colectivamente, de modo que la cantidad medida corresponde a la suma de las cantidades de la especie medida colectivamente. En otro ejemplo, cualquier biomarcador de péptido, polipéptido, proteína, o ácido nucleico, y/o uno o más fragmentos de los mismos puede medirse individualmente. En consecuencia, "RoxP" en este contexto abarca biomarcadores basados en polipéptido o proteína RoxP o fragmentos de los mismos, o ácido nucleico RoxP o fragmentos de los mismos, incluyendo entre otros el promotor RoxP o cualquier parte del mismo y/o la secuencia codificante de RoxP o cualquier parte de la misma.
- El término "fragmento" en relación a péptidos, polipéptidos o proteínas se ha indicado generalmente en otro lado en esta especificación. En el presente contexto, cualesquier fragmentos de péptido, polipéptido o proteína que portan la información necesaria para el desempeño de los presentes métodos de diagnóstico o evaluación de beneficios son pretendidos en el presente documento. Tales fragmentos pueden surgir por cualquier mecanismo, *in vivo* y/o *in vitro*, tal como, sin limitación, por transcripción o traducción alternativa, exo- y/o endo-proteólisis, o degradación proteolítica del péptido, polipéptido, o proteína, tal como, por ejemplo, por proteólisis física, química y/o enzimática. Tales fragmentos pueden comprender preferiblemente al menos cerca de 30 %, por ejemplo, al menos cerca de 50 % o al menos cerca de 70 %, preferiblemente al menos cerca de 80 %, por ejemplo, al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, y aún más preferiblemente al menos cerca de 95 % o incluso cerca de 99 % de la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua del biomarcador de péptido, polipéptido, o proteína de longitud completa, tal como de RoxP. Por ejemplo, tal fragmento RoxP puede incluir una secuencia de ≥ 5 aminoácidos consecutivos, o ≥ 10 aminoácidos consecutivos, o ≥ 20 aminoácidos consecutivos, o ≥ 30 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 40 aminoácidos consecutivos, tal como por ejemplo ≥ 50 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 110 , ≥ 120 , ≥ 130 , ≥ 140 , o ≥ 150 aminoácidos consecutivos del correspondiente RoxP de péptido, polipéptido, o proteína de longitud completa.
- El término "fragmento" con referencia a un ácido nucleico (polinucleótido) generalmente denota una forma truncada en 5'- y/o 3' de un ácido nucleico. En el presente contexto, cualesquier fragmentos de ácido nucleico que portan la información necesaria para el desempeño de los presentes métodos de diagnóstico o de evaluación de beneficios son pretendidos en el presente documento. Tales fragmentos pueden surgir por cualquier mecanismo, *in vivo* y/o *in vitro*, tal como, sin limitación, por transcripción alternativa, exo- y/o endo-nucleólisis, o degradación nucleolítica del ácido nucleico, tal como, por ejemplo, por nucleólisis física, química y/o enzimática. Tales fragmentos pueden preferiblemente comprender al menos cerca de 30 %, por ejemplo, al menos cerca de 50 % o al menos cerca de 70 %, preferiblemente al menos cerca de 80 %, por ejemplo, al menos cerca de 85 %, más preferiblemente al menos cerca de 90 %, y aún más preferiblemente al menos cerca de 95 % o incluso cerca de 99 % de la secuencia de ácido nucleico contigua del biomarcador de ácido nucleico de longitud completa, tal como de ácido nucleico de RoxP. Por ejemplo, tales fragmentos de ácido nucleico de RoxP pueden incluir una secuencia de ≥ 15 nucleótidos consecutivos, o ≥ 30 nucleótidos consecutivos, o ≥ 60 nucleótidos consecutivos, o ≥ 90 nucleótidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 120 nucleótidos consecutivos, tal como por ejemplo ≥ 150 nucleótidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 180 , ≥ 210 , ≥ 240 , ≥ 270 , ≥ 300 , ≥ 330 , ≥ 360 , ≥ 390 , ≥ 420 , o ≥ 450 nucleótidos consecutivos del correspondiente ácido nucleico de RoxP de longitud completa, tal como del correspondiente promotor de RoxP de longitud completa y/o secuencia codificante de RoxP.
- Los términos "cantidad" y "nivel" son sinónimos y generalmente bien comprendidos en la técnica. Los términos como se usan en el presente documento pueden particularmente referirse a una cuantificación absoluta de un biomarcador en una muestra, o a una cuantificación relativa de un biomarcador en una muestra, es decir, con respecto a otro valor tal como con respecto a un valor de referencia, o a un intervalo de valores que indican un valor de referencia del biomarcador. Tales valores o intervalos de referencia pueden obtenerse de un solo sujeto o de un grupo de sujetos.
- Una cantidad absoluta de un biomarcador tal como un biomarcador basado en péptido, proteína, polipéptido, o ácido nucleico, en una muestra puede expresarse ventajosamente como peso o como cantidad molar, o más comúnmente como una concentración, por ejemplo, peso por volumen o moles por volumen, o peso por área de superficie de piel, o moles por área de superficie de piel, tal como 1,0 cm² de piel. Una cantidad absoluta de un biomarcador basado en células en una muestra puede expresarse ventajosamente como el número de células o unidades formadoras de

colonia (UFC), o más comúnmente como el número de células o UFC por volumen de muestra o por área de superficie de piel, tal como 1,0 cm² de piel. Una cantidad relativa de un biomarcador en una muestra puede expresarse ventajosamente como un aumento o disminución o como veces de aumento o veces de disminución con respecto a dicho otro valor, tal como con respecto a un valor de referencia. La realización de una comparación relativa entre

- 5 primeras y segundas variables (por ejemplo, primera y segunda cantidades) puede pero no necesitar requerir determinar primero los valores absolutos de dicha primera y segunda variables. Por ejemplo, un método de medición puede producir lecturas cuantificables (tal como, por ejemplo, intensidades de señal) para dicha primera y segunda variables, en donde dichas lecturas son una función del valor de dichas variables, y en donde dichas lecturas pueden compararse directamente para producir un valor relativo para la primera variable contra la segunda variable, sin la necesidad real de primero convertir las lecturas a valores absolutos de las respectivas variables. En ciertas realizaciones, una cantidad relativa de un biomarcador basado en células en una muestra puede expresarse ventajosamente como un aumento o disminución o como veces de aumento o veces de disminución del número, UFC o abundancia (por ejemplo, determinado por genotipificación o secuenciación) de células de un taxón dado (por ejemplo, filo, género, especie, tipo tal como filotipo, subtipo o cepa) en comparación con células de uno o más o todos los otros taxones en la muestra o célula de todos los taxones en la muestra.
- 10
- 15

Un biomarcador se "mide" o "determina" en una muestra cuando la presencia o ausencia y/o cantidad de dicho biomarcador se detecta o determina en la muestra, típicamente sustancialmente a la exclusión de otras entidades, tales como células, moléculas o analitos. Dependiendo de factores que pueden evaluarse y decidirse por una persona

- 20 experta, tal como entre otros el tipo de un biomarcador, el tipo de una muestra, la abundancia esperada del biomarcador en la muestra, el tipo, robustez, sensibilidad y/o especificidad del método de detección usado para detectar el biomarcador, etc., el biomarcador puede medirse directamente en la muestra, o la muestra puede someterse a uno o más pasos de procesamiento dirigidos a lograr una medición adecuada del biomarcador. A modo de ejemplo, la muestra puede someterse a uno o más pasos de aislamiento o separación, con lo cual el biomarcador se aísla de la muestra o con lo cual se prepara una fracción de la muestra que está enriquecida para el biomarcador. Por ejemplo, si el biomarcador es un péptido, polipéptido, o proteína, cualquier técnica conocida de purificación de proteína puede aplicarse a la muestra para aislar los péptidos, polipéptidos, y proteínas de la misma. Si el biomarcador es un ácido nucleico, cualquier técnica de purificación conocida de ácido nucleico puede aplicarse a la muestra para aislar los ácidos nucleicos de la misma. ejemplos no limitantes de métodos para purificar péptidos, polipéptidos, 30 proteínas, o ácidos nucleicos pueden incluir cromatografía, electroforesis preparativa, centrifugación, precipitación, purificación de afinidad, purificación usando matriz de criogel de impresión molecular, etc. Si el biomarcador es una célula, cualquier técnica de aislamiento de células conocida puede aplicarse a la muestra para aislar las células de la misma. ejemplos no limitantes de métodos para aislar células es clasificación celular por citometría de flujo, cultivo celular en medio sólido o líquido, etc.
- 25
- 30
- 35

Los términos "muestra" o "muestra biológica" como se usa en el presente documento incluyen cualquier espécimen biológico obtenido de un sujeto. Las muestras útiles son esas que comprenden un biomarcador o biomarcadores de interés como se enseña en el presente documento en cantidades detectables. Preferiblemente, una muestra puede ser fácilmente obtenible por métodos mínimamente invasivos que permiten la remoción / aislamiento de la muestra del

- 40 sujeto. El término "muestra de piel" es ampliamente usado en el presente documento para denotar cualquier muestra obtenida por muestreo de la piel de un sujeto o la superficie de la piel de un sujeto. Una muestra de piel puede pero no necesita contener células de la piel del sujeto. Un método conveniente pero no limitante para muestrear la superficie de la piel de un sujeto, compatible con los presentes métodos y usos, es hisopar un área dada de la superficie de la piel (por ejemplo, 1 x 1 cm, o 2 x 2 cm, o 3 x 3 cm, o 4 x 4 cm, o 5 x 5 cm, o entre 1 cm² y 25 cm²) con hisopos convencionales de piel (que pueden preferiblemente remojarse previamente en tampón) por una duración de tiempo dada, tal como entre 10 segundos y 1 minuto, por ejemplo, cerca de 30 segundos. El material recolectado en los hisopos puede liberarse en un medio líquido o solvente adecuado por sacudimiento, y prepararse para análisis según se requiera. En ciertas realizaciones, las muestras de piel adecuadas pueden obtenerse por métodos que muestrean (tal como preferiblemente sin desviación) al menos los microorganismos, tales como bacterias, que residen en la superficie 45 de la piel. En ciertas realizaciones, muestras de piel adecuadas pueden obtenerse por métodos que muestrean (tal como preferiblemente sin desviación) péptidos, polipéptidos o proteínas que residen en la superficie de la piel. En ciertas realizaciones, una o más muestras de piel (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6) pueden usarse para medir la cantidad de biomarcadores en la misma. El uso de múltiples muestras de piel puede compensar por posibles variaciones en la cantidad de biomarcador debido a la distribución potencialmente 50 heterogénea del biomarcador a través de la superficie de la piel. En ciertas realizaciones, el muestreo puede particularmente dirigirse a áreas de la piel que se sospecha que están enfermas o afectadas por una enfermedad o condición, por ejemplo como se concluye por inspección visual o microscópica.
- 55

Cualquier método de separación, detección y cuantificación discutidos en otro lado en esta especificación puede usarse para medir la cantidad de biomarcador de péptidos, polipéptidos o proteínas, tal como de RoxP, en la muestra. Por ejemplo, tales métodos pueden incluir métodos de ensayo bioquímico, métodos de inmunoensayo, métodos de análisis de espectrometría de masas, métodos de cromatografía, métodos de biosensor de capacitancia, o combinaciones de los mismos. El término "inmunoensayo" generalmente se refiere a métodos conocidos como tal para detectar una o más moléculas o analitos de interés en una muestra, en donde la especificidad de un inmunoensayo para la molécula(s) o analito(s) de interés es conferida por la unión específica entre un agente de unión específica, comúnmente pero sin limitación un anticuerpo, y la molécula(s) o analito(s) de interés. Las tecnologías de

inmunoensayo incluyen sin limitación inmunohistoquímica, ELISA directo (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima), ELISA indirecto, ELISA de emparedado, ELISA competitivo, ELISA múltiple, radioinmunoensayo (RIA), tecnologías ELISPOT, y otras técnicas similares conocidas en la técnica. Los principios de estos métodos de inmunoensayo se conocen en la técnica, por ejemplo John R. Crowther, "The ELISA Guidebook", 1^a ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282.

A modo de explicación adicional y no de limitación, ELISA directo emplea un agente de unión primario marcado, por ejemplo, anticuerpo, para unirse a y cuantificar de este modo el antígeno diana en una muestra inmovilizada en un soporte sólido tal como una placa de micropocillos. ELISA indirecto usa un agente de unión primario no marcado, por ejemplo, anticuerpo, que se une al antígeno diana y un agente de unión marcado secundario, por ejemplo, anticuerpo, que reconoce y permite la cuantificación del agente de unión primario unido al antígeno. En ELISA de emparedado el antígeno diana es capturado de una muestra usando un agente de unión de "captura" inmovilizado, por ejemplo, anticuerpo, que se une a un sitio antigénico dentro del antígeno, y subsecuente a la remoción de los analitos no unidos el antígeno así capturado es detectado usando un agente de unión de 'detección', por ejemplo, anticuerpo, que se une a otro sitio antigénico dentro de dicho antígeno, donde el agente de unión de detección puede marcarse directamente o detectarse indirectamente como antes. ELISA competitivo usa un 'competidor' marcado que puede ser ya sea el agente de unión primario, por ejemplo, anticuerpo, o el antígeno diana. En un ejemplo, el agente de unión inmovilizado primario no marcado, por ejemplo, anticuerpo, es incubado con una muestra, esta reacción se deja alcanzar el equilibrio, y entonces se agrega el antígeno diana marcado. Este último se unirá al agente de unión primario siempre que sus sitios de unión no estén ocupados aún por el antígeno diana no marcado de la muestra. Así, la cantidad detectada de antígeno marcado unido se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno no marcado en la muestra. ELISA Múltiple permite la detección simultánea de dos o más analitos dentro de un solo compartimento (por ejemplo, pocillo de microplaca) usualmente en una pluralidad de direcciones de ensayo (véase, por ejemplo, Nielsen & Geierstanger 2004. J Immunol Methods 290: 107-20 y Ling *et al.* 2007. Expert Rev Mol Diagn 7: 87-98 para guía adicional). Como se aprecia, el marcado en las tecnologías de ELISA es usualmente por conjugación de la enzima (tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano) y el punto final es típicamente colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente, magnético, piezoeléctrico, piroeléctrico y otros.

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica basada en competencia e involucra el mezclado de cantidades conocidas de antígeno diana marcado radioactivamente (por ejemplo, marcado con ¹²⁵I o ¹³¹I) con agente de unión, por ejemplo, anticuerpo, a dicho antígeno, entonces agregando antígeno no marcado o 'frío' de una muestra y midiendo la cantidad de antígeno marcado desplazado (véase, por ejemplo, "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", por Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198 para guía).

Generalmente, cualesquier técnicas espectrométricas de masa (MS) que son capaces de obtener información precisa de la masa de péptidos, y preferiblemente también en la fragmentación y/o secuencia (parcial) de aminoácidos de los péptidos seleccionados (por ejemplo, en espectrometría de masas en tandem, MS/MS; o en decaimiento de post-fuente, TOF MS), son útiles en el presente documento. Las técnicas y sistemas de MS y MS/MS de péptido adecuadas son bien conocidos *per se* (véase, por ejemplo, Methods in Molecular Biology, vol. 146: "Mass Spectrometry of Proteins and Peptides", por Chapman, ed., Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. Methods Enzymol 193: 455-79; o Methods in Enzymology, vol. 402: "Biological Mass Spectrometry", por Burlingame, ed., Academic Press 2005, ISBN 9780121828073) y se pueden usar en el presente documento. Las disposiciones de MS, instrumentos y sistemas adecuados para el análisis de péptido biomarcador pueden incluir, sin limitación, tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida en matriz (MALDI-TOF) MS; MALDI-TOF post-decaimiento de fuente (PSD); MALDI-TOF/TOF; espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser aumentada en superficie (SELDI-TOF) MS; espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)ⁿ (n es un entero mayor que cero); MS de trampa de iones ESI 3D o lineal (2D); MS de cuadrupolo triple de ESI; TOF ortogonal de cuadrupolo de ESI (Q-TOF); sistemas de MS de transformada de Fourier de ESI; desorción/ionización en silicio (DIOS); espectrometría de masas de ion secundario (SIMS); espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS)ⁿ; espectrometría de masas de fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS); APPI-MS/MS; y APPI-(MS)ⁿ. Las disposiciones de MS de fragmentación de iones de péptido en tandem (MS/MS) se pueden lograr usando las maneras establecidas en la técnica, tal como, por ejemplo, dissociación inducida por colisión (CID). La detección y cuantificación de biomarcadores por espectrometría de masas puede involucrar múltiple monitoreo de reacción (MRM), tal como se describe entre otros por Kuhn *et al.* 2004 (Proteomics 4: 1175-86). Los métodos de análisis de péptido por MS pueden combinarse ventajosamente con métodos de péptido en la dirección 5' o separación o fraccionamiento de proteína, tal como por ejemplo con los métodos cromatográficos y otros métodos descritos en el presente documento posteriormente.

La cromatografía también puede usarse para medir biomarcadores. Como se usa en el presente documento, el término "cromatografía" abarca métodos para separar sustancias químicas, referidas como tal y vastamente disponibles en la técnica. En un enfoque preferido, la cromatografía se refiere a un proceso en que una mezcla de sustancias químicas (analitos) portados por una corriente móvil de líquido o gas ("fase móvil") es separada en componentes como un resultado de la distribución diferencial de los analitos, a medida que fluyen alrededor o sobre un líquido estacionario o fase sólida ("fase estacionaria"), entre dicha fase móvil y dicha fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser usualmente un sólido finamente dividido, una lámina de material de filtro, o una película delgada de un líquido en la superficie de un sólido, o similares. La cromatografía también es ampliamente aplicable para la separación de

compuestos químicos de origen biológico, tal como, por ejemplo, aminoácidos, proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos, etc.

- 5 La cromatografía como se usa en el presente documento puede ser preferiblemente columnar (es decir, en donde la fase estacionaria se deposita o empaqueta en una columna), preferiblemente cromatografía líquida, y aún más preferiblemente HPLC. Aunque los particulares de la cromatografía son bien conocidos en la técnica, para guía adicional véase, por ejemplo, Meyer M., 1998, ISBN: 047198373X, y "Practical HPLC Methodology and Applications", Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993. Tipos de cromatografía ejemplares incluyen, sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase normal (NP-HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), tal como cromatografía de intercambio de catión o anión, cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) incluyendo cromatografía de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel, cromatoenfoque, cromatografía de afinidad tal como inmunoaфинidad, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, y similares.
- 10 15 La cromatografía, incluyendo cromatografía uni-, bi- o dimensional o de más dimensiones, puede usarse como un método de fraccionamiento de péptido junto con un método adicional de análisis de péptido, tal como por ejemplo, con un análisis de espectrometría de masas en dirección 3' como se describe en otro lado en esta especificación.
- 20 25 30 Métodos adicionales de separación, identificación o cuantificación de péptido o polipéptido pueden usarse, opcionalmente junto con cualquiera de los métodos de análisis antes descritos, para medir biomarcadores en la presente divulgación. Tales métodos incluyen, sin limitación, partición de extracción química, enfoque isoeléctrico (IEF) incluyendo enfoque isoeléctrico capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (CEC), y similares, electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), electroforesis en gel capilar (CGE), electroforesis de zona capilar (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electroforesis de flujo libre (FFE), etc.
- 35 Los biosensores capacitivos son biosensores de afinidad que operan al registrar la unión directa entre un elemento de biorreconocimiento en la superficie del sensor y el biomarcador cognado. Un elemento de biorreconocimiento puede ser por ejemplo una molécula inmunológica tal como un anticuerpo, o un polímero impreso molecularmente (MIP) que contiene cavidades de biorreconocimiento para el biomarcador. Los biosensores miden los cambios en las propiedades dieléctricas y/o espesores de la capa dieléctrica en la interfaz de electrolito/electrodo. Véase por ejemplo Ertürk *et al.* (2018 PLoS ONE 13:e0193754).
- 40 45 50 El nivel de biomarcadores al nivel de ácido nucleico puede detectarse usando herramientas de medición de ADN, ARN o ADNc cuantitativa estándar conocidas en la técnica. ejemplos no limitantes incluyen análisis a base de hibridación, análisis de expresión de micromatriz, expresión génica digital (DGE), hibridación de ARN *in situ* (RISH), análisis de transferencia de tipo Northern y similares; PCR, RT-PCR, RT-qPCR, PCR de punto final, PCR digital, PCR digital de gotícula, o similares; detección soportada de oligonucleótido, pirosecuenciación, secuenciación cíclica de polonio por síntesis, secuenciación bidireccional simultánea, secuenciación de una sola molécula, secuenciación de una sola molécula en tiempo real, secuenciación de una sola molécula verdadera, secuenciación de nanoporo asistida por hibridación, secuenciación por síntesis, o similares.
- 55 Para determinar la composición de microbioma de una muestra, el ADN puede aislarse de una muestra, y un elemento genético adecuado o región (tal como por ejemplo gen de ARN ribosomal, tal como preferiblemente ARNr 16S, tal como más preferiblemente la región V1-V3 de ARNr 16S) puede amplificarse y secuenciarse del mismo, típicamente a alta profundidad de secuenciación. Las lecturas resultantes pueden clasificarse usando herramientas estadísticas conocidas y bases de datos de secuencia de microbioma públicamente disponibles, tal como Human Oral Microbiome Database (HOMD) (<http://www.homd.org/>) con una inclusión manual de bacterias de la piel relevantes (Chen *et al.* 2010 Database: the journal of biological databases and curation baq013).
- 60 65 Para determinar los tipos o subtipos de la población de *C. acnes* en muestras hisopadas de piel, pueden emplearse esquemas de tipificación de secuencia multilocus conocidos (MLST) o esquemas de tipificación de secuencia de un locus (SLST), generalmente involucrando la amplificación y secuenciación de loci selectos y análisis de secuencia de los alelos tal como usando www.medbac.dk/slst/pacnes (McDowell *et al.*, 2012 PLoS ONE 7:e41480; Scholz *et al.* 2014 PLoS ONE 9:e104199).
- Varias técnicas para medir biomarcadores pueden emplear agentes de unión para dichos respectivos biomarcadores. Por lo tanto, se dan a conocer además agentes de unión capaces de unirse específicamente a marcadores, péptidos, polipéptidos, proteínas, o ácidos nucleicos como se enseña en el presente documento. Los agentes de unión como se pretende a través de toda esta especificación pueden incluir entre otros un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético, ácido nucleico tal como un oligonucleótido, o una molécula pequeña.
- El término "se une específicamente" como se usa a través de toda esta especificación significa que un agente (indicado en el presente documento también como "agente de unión específica") se une a una o más moléculas o analitos deseados sustancialmente a la exclusión de otras moléculas que son aleatorias o no relacionadas, y opcionalmente

- sustancialmente a la exclusión de otras moléculas que están estructuralmente relacionadas. El término "se une específicamente" no necesariamente requiere que un agente se una exclusivamente a su diana(s) pretendida(s). Por ejemplo, se puede decir que un agente se une específicamente a la o las dianas de interés si su afinidad para tal o tales dianas pretendidas bajo las condiciones de unión es al menos cerca de 2 veces mayor, preferiblemente al menos cerca de 5 veces mayor, más preferiblemente al menos cerca de 10 veces mayor, aún más preferiblemente al menos cerca de 25 veces mayor, incluso más preferiblemente al menos cerca de 50 veces mayor, e incluso más preferiblemente al menos cerca de 100 veces o más mayor, que su afinidad para una molécula no diana.
- 5 Agentes de unión específica como se usa a través de toda esta especificación pueden incluir entre otros un anticuerpo, aptámero, spiegelmer (L-aptámero), fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético, ácido nucleico tal como un oligonucleótido, o una molécula pequeña.
- 10 Preferiblemente, el agente puede unirse a su diana(s) pretendida(s) con una constante de afinidad (K_A) de tal unión $K_A \geq 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, aún más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, incluso más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, e incluso más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ o $K_A \geq 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, en donde $K_A = [\text{SBA}_T]/[\text{SBA}][T]$, SBA denota el agente de unión específica, T denota la diana pretendida. La determinación de K_A puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, tal como por ejemplo, usando diálisis de equilibrio y análisis de gráfico de Scatchard.
- 15 20 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y generalmente se refiere a cualquier agente de unión inmunológica. El término específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (por ejemplo, 2, 3 o más valencias) y/o multi-específicos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o más) formados de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo en tanto que exhiban la actividad biológica deseada (particularmente, la capacidad de unirse específicamente a un antígeno de interés), así como compuestos multivalentes y/o multi-específicos de tales fragmentos. El término "anticuerpo" no solo es inclusivo de anticuerpos generados por métodos que comprenden inmunización, sino también incluye cualquier polipéptido, por ejemplo, un polipéptido expresado recombinantemente, que se forma para abarcar al menos una región determinante de complementariedad (CDR) capaz de unirse específicamente a un epítopo en un antígeno de interés. Por lo tanto, el término aplica a tales moléculas independientemente si se producen *in vitro* o *in vivo*.
- 25 30 Un anticuerpo puede ser de cualquier clase de IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y preferiblemente anticuerpo de clase IgG. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, por ejemplo, un antisero o inmunoglobulinas purificadas de los mismos (por ejemplo, purificado por afinidad). Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un mezcla de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden dirigirse a un antígeno particular o un epítopo particular dentro de un antígeno con mayor selectividad y reproducibilidad. A modo de ejemplo y no de limitación, los anticuerpos monoclonales pueden formarse por el método de hibridoma primero descrito por Kohler *et al.* 1975 (Nature 256: 495), o pueden formarse por métodos de ADN recombinante (por ejemplo, como en el documento US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpo de fago usando técnicas como se describen por Clackson *et al.* 1991 (Nature 352: 624-628) y Marks *et al.* 1991 (J Mol Biol 222: 581-597), por ejemplo.
- 35 40 Los agentes de unión a anticuerpo pueden ser fragmentos de anticuerpo. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fv y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una cadena; y anticuerpos multivalentes y/o multiespecíficos formados de fragmento(s) de anticuerpo, por ejemplo, dicuerpos, tricuerpos, y multicuerpos. Las designaciones anteriores Fab, Fab', F(ab')2, Fv, scFv etc. pretenden tener su significado establecido en la técnica.
- 45 50 El término anticuerpo incluye anticuerpos que se originan de o que comprenden una o más porciones derivadas de cualquier especie animal, preferiblemente especie de vertebrado, incluyendo, por ejemplo, aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, gallina de guinea, codorniz, o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, de murino (por ejemplo, ratón, rata, etc.), burro, conejo, cabra, oveja, cobaya, camello (por ejemplo, *Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), llama (por ejemplo, *Lama pacos*, *Lama glama* o *Lama vicugna*) o caballo.
- 55 60 Una persona experta entenderá que un anticuerpo puede incluir una o más delecciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones conservadoras), en tanto que tales alteraciones conserven su unión del respectivo antígeno. Un anticuerpo también puede incluir una o más modificaciones nativas o artificiales de sus residuos de aminoácidos constituyentes (por ejemplo, glucosilación, etc.).
- 65 Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales así como fragmentos de los mismos se conocen bien en la técnica, ya que son métodos para producir anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos (véase por ejemplo, Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1988; Harlow and Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", por Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", por Dean & Shepherd, eds., Oxford University Press

2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921).

El término "aptámero" se refiere a oligo-ADN, oligo-ARN u oligo-ADN/ARN monocatenario o bicatenario o cualquier análogo del mismo que específicamente se une a una molécula diana tal como un péptido. Ventajosamente, los aptámeros presentan bastante alta especificidad y afinidad (por ejemplo, K_A en el orden $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) para sus dianas. La producción de aptámeros se describe entre otros en el documento US 5.270.163; Ellington & Szostak 1990 (Nature 346: 818-822); Tuerk & Gold 1990 (Science 249: 505-510); o "The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications", por Klussmann, ed., Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592. El término "fotoaptámero" se refiere a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que pueden unirse covalentemente a o entrelazarse con una molécula diana. El término "spiegelmer" se refiere a un aptámero que incluye L-ADN, L-ARN, u otras moléculas tipo nucleótido o derivados de nucleótido de mano izquierda. Los aptámeros que contienen nucleótidos de mano izquierda son resistentes a degradación por enzimas naturales, que normalmente actúan en sustratos que contienen nucleótidos de mano derecha. El término "peptidomimético" se refiere a un agente no peptídico que es un análogo topológico de un correspondiente péptido. Los métodos para designar racionalmente los peptidomiméticos se conocen en la técnica. Por ejemplo, el diseño racional de tres peptidomiméticos basados en el péptido sulfatado de 8-meros CCK26-33, y de dos peptidomiméticos basados en el péptido de 11-meros sustancia P, y principios relacionados de diseño de peptidomiméticos, se describen en Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134). El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos, preferiblemente compuestos orgánicos, con un tamaño comparable a esas moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta cerca de 5000 Da, por ejemplo, hasta cerca de 4000, preferiblemente hasta 3000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, incluso más preferiblemente hasta cerca de 1000 Da, por ejemplo, hasta cerca de 900, 800, 700, 600 o hasta cerca de 500 Da. El término "oligonucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico (incluyendo análogos y miméticos de ácido nucleico) oligómero o polímero como se definen en el presente documento. Preferiblemente, un oligonucleótido, tal como más particularmente un oligonucleótido antisentido, es (sustancialmente) monocatenario. Los oligonucleótidos como se pretende en el presente documento pueden estar preferiblemente entre cerca de 10 y cerca de 100 unidades de nucleósido (es decir, nucleótidos o análogos de nucleótido) en longitud, preferiblemente entre cerca de 15 y cerca de 50, más preferiblemente entre cerca de 20 y cerca de 40, también preferiblemente entre cerca de 20 y cerca de 30. Los oligonucleótidos como se pretende en el presente documento pueden comprender uno o más o todas las bases heterocíclicas no naturales y/o uno o más o todos los grupos azúcar no naturales y/o uno o más o todos los enlaces inter-nucleósido no naturales, cuya inclusión puede mejorar las propiedades tal como, por ejemplo, aumento de estabilidad en la presencia de nucleasas y aumento de afinidad de hibridización, aumento de tolerancia para malos apareamientos, etc. Los agentes de unión de ácido nucleico, tales como agentes de unión de oligonucleótido, típicamente son al menos parcialmente antisentido a un ácido nucleico diana de interés. El término "antisentido" generalmente se refiere a un agente (por ejemplo, un oligonucleótido) configurado para anillarse específicamente con (hibridarse a) una secuencia dada en un ácido nucleico diana, tal como por ejemplo en un ADN o ARN diana, y típicamente comprende, consiste esencialmente de o consiste de una secuencia de ácido nucleico que es complementaria o sustancialmente complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana. Los agentes antisentido adecuados para su uso en el presente documento pueden típicamente ser capaces de anillarse con (hibridarse a) las respectivas secuencias diana de ácido nucleico en condiciones de alta rigurosidad, y son capaces de hibridarse específicamente a la diana bajo condiciones fisiológicas. Los términos "complementario" o "complementariedad" como se usa en el presente documento con referencia a ácidos nucleicos, se refieren a la unión normal de ácidos nucleicos monocatenarios bajo condiciones de sal permisiva (fuerza iónica) y temperatura por apareamiento de bases, preferiblemente apareamiento de bases de Watson-Crick. A modo de ejemplo, el apareamiento de base complementario de Watson-Crick ocurre entre las bases A y T, A y U o G y C. Por ejemplo, la secuencia 5'-A-G-U-3' es complementaria a la secuencia 5'-A-C-U-3'. La referencia a oligonucleótidos puede en particular pero sin limitación incluir sondas de hibridación y/o cebadores de amplificación y/o cebadores de secuenciación, etc., como se usa comúnmente en las tecnologías de detección de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, los reactivos tales como agentes de unión como se enseña en el presente documento pueden comprender una marca detectable. El término "marca" se refiere a cualquier átomo, molécula, porción o biomolécula que puede usarse para proporcionar una lectura o propiedad detectable y preferiblemente cuantificable, y que pueda unirse o hacerse parte de una entidad de interés, tal como un agente de unión. Las marcas pueden ser detectables convenientemente por ejemplo por medios espectrométricos de masa, espectroscópicos, ópticos, colorimétricos, magnéticos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Las marcas incluyen sin limitación tintes, radiomarcas tales como ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I ; reactivos densos a los electrones; enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina como comúnmente se usa en inmunoensayos); porciones de unión tal como biotina-estreptavidina; haptenos tal como digoxigenina; porciones luminogénicas, fosforescentes o fluorogénicas; etiquetas de masa; y tintes fluorescentes solos o en combinación con porciones que pueden suprimir o cambiar los espectros de emisión por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). En algunas realizaciones, los agentes de unión pueden proporcionarse con una etiqueta que permite la detección con otro agente (por ejemplo, con un socio de unión a sonda). Tales etiquetas pueden ser, por ejemplo, biotina, estreptavidina, etiqueta his, etiqueta myc, maltosa, proteína de unión a maltosa o cualquier otro tipo de etiqueta conocido en la técnica que tiene un socio de unión. Ejemplos de asociaciones que pueden utilizarse en la disposición de sonda:socio de unión puede ser cualquiera, e incluye, por ejemplo biotina:estreptavidina, etiqueta his:ion metálico (por ejemplo, Ni^{2+}), maltosa:proteína

de unión a maltosa, etc. El conjugado biomarcador - agente de unión puede asociarse con o unirse a un agente de detección para facilitar la detección. ejemplos de agentes de detección incluyen, pero no se limitan a, marcas luminiscentes; marcas colorimétricas, tales como tintes; marcas fluorescentes; o marcas químicas, tales como agentes electroactivos (por ejemplo, ferrocianida); enzimas; marcas radioactivas; o marcas de radiofrecuencia. El agente de detección puede ser una partícula. ejemplos de tales partículas incluyen, pero no se limitan a, partículas coloidales de oro; partículas coloidales de azufre; partículas coloidales de selenio; partículas coloidales de sulfato de bario; partículas coloidales de sulfato de hierro; partículas de yodato metálico; partículas de haluro de plata; partículas de silice; partículas coloidales de óxido metálico (hidroso); partículas coloidales de sulfuro metálico; partículas coloidales de selenuro de plomo; partículas coloidales de selenuro de cadmio; partículas coloidales de fosfato metálico; partículas coloidales de ferrita metálica; cualquiera de las partículas coloidales antes mencionadas revestidas con capas orgánicas o inorgánicas; moléculas de proteína o péptido; liposomas; o partículas de látex de polímero orgánico, tales como perlas de látex y poliestireno. Las partículas preferibles pueden ser partículas coloidales de oro.

Los presentes métodos o usos pueden involucrar comparar la cantidad del uno o más biomarcadores medidos en una muestra de un sujeto con un valor de referencia adecuado, en donde dicho valor de referencia representa un resultado conocido.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

(a) determinar la cantidad de RoxP en la muestra de piel del sujeto;

(b) comparar la cantidad determinada de RoxP con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia un diagnóstico conocido de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo;

(c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de RoxP de dicho valor de referencia; y

(d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a un diagnóstico particular de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en el sujeto.

En ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

(a) determinar la cantidad de *C. acnes* en la muestra de piel del sujeto;

(b) comparar la cantidad determinada de *C. acnes* con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia un diagnóstico conocido de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo;

(c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de *C. acnes* de dicho valor de referencia; y

(d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a un diagnóstico particular de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en el sujeto.

En ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

(a) determinar la cantidad de RoxP y la cantidad de *C. acnes* en la muestra de piel del sujeto;

(b) comparar la cantidad determinada de RoxP y la cantidad determinada de *C. acnes* con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia un diagnóstico conocido de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo;

(c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de RoxP y la cantidad determinada de *C. acnes* de dicho valor de referencia;

(d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a un diagnóstico particular de la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en el sujeto.

En ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

(a) determinar la cantidad de RoxP en la muestra de piel del sujeto;

(b) comparar la cantidad determinada de RoxP con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia una indicación conocida del beneficio de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP;

- (c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de RoxP de dicho valor de referencia; y
 (d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a una indicación particular de si el sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

5 En ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

- 10 (a) determinar la cantidad de *C. acnes* en la muestra de piel del sujeto;
 (b) comparar la cantidad determinada de *C. acnes* con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia una indicación conocida del beneficio de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP;
- 15 (c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de *C. acnes* de dicho valor de referencia; y
 (d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a una indicación particular de si el sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

20 En ciertas realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, los métodos o usos pueden comprender:

- 25 (a) determinar la cantidad de RoxP y la cantidad de *C. acnes* en la muestra de piel del sujeto;
 (b) comparar la cantidad determinada de RoxP y la cantidad determinada de *C. acnes* con un valor de referencia, representando dicho valor de referencia una indicación conocida del beneficio de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP;
- 30 (c) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad determinada de RoxP y la cantidad determinada de *C. acnes* de dicho valor de referencia;
 (d) atribuir dicho hallazgo de desviación o no desviación a una indicación particular de si el sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

35 Los valores de referencia pueden establecerse de acuerdo con procedimientos conocidos empleados previamente para otros biomarcadores. Por ejemplo, un valor de referencia puede establecerse en un individuo o una población de individuos caracterizados por un diagnóstico particular conocido de la enfermedad de la piel asociada con estrés, o una indicación particular, conocida del beneficio de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP. Tal población puede comprender sin limitación ≥ 2 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 50 , ≥ 100 , o incluso más individuos. Como se mencionó antes, cuando dos o más biomarcadores se van a evaluar, cada biomarcador puede evaluarse por separado e independientemente, o uno puede generar un perfil de valores o cantidades para los dos o más biomarcadores. En consecuencia, cualquier valor de referencia como se refiere en el presente documento también puede abarcar un perfil de referencia.

40 A modo de ejemplo, un método para establecer un valor de referencia de la cantidad de RoxP y/o de *C. acnes*, representando dicho valor de referencia:

- 45 (a) un diagnóstico de que un sujeto tiene una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, o
 (b) un diagnóstico de que un sujeto no tiene una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo,
 50 puede comprender:
 (i) medir la cantidad de RoxP y/o de *C. acnes* en:
 55 a. una o más muestras de piel de uno o más sujetos diagnosticados como que tienen la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, o
 b. una o más muestras de piel de uno o más sujetos diagnosticados como que no tienen la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, y
 60 (ii) almacenar la cantidad de RoxP y/o de *C. acnes*:
 a. como se mide en "(i) a." como el valor de referencia que representa el diagnóstico de que el sujeto tiene la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, o
 65 b. como se mide en "(i) b." como el valor de referencia que representa el diagnóstico de que el sujeto no tiene la

enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo.

A modo de ejemplo, un método para establecer un valor de referencia de la cantidad de RoxP y/o de *C. acnes*, representando dicho valor de referencia:

5 (a) una indicación de que un sujeto se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, o

10 (b) una indicación de que un sujeto no se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP,

puede comprender:

15 (i) medir la cantidad de RoxP y/o de *C. acnes* en una o más muestras de piel de una pluralidad de sujetos (tal como preferiblemente sujetos que no tienen una enfermedad asociada a estrés oxidativo) y determinar la cantidad promedio o mediana de RoxP y/o de *C. acnes* en dichas muestras de piel, y

(ii) almacenar una cantidad de RoxP y/o de *C. acnes*:

20 a. menor que la cantidad promedio o mediana como se mide en "(i)." como el valor de referencia que indica que un sujeto se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, o

25 b. igual a o mayor que la cantidad promedio o mediana como se mide en "(i)." como el valor de referencia que indica que un sujeto puede no beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

25 Las comparaciones entre valores, por ejemplo, un valor obtenido en una muestra y un valor de referencia, pueden generalmente incluir cualquier medio para determinar la presencia o ausencia de al menos una diferencia y opcionalmente del tamaño de tal diferencia entre los valores que se están comparando. Un comparación puede incluir una inspección visual, una comparación aritmética o estadística de mediciones. Tales comparaciones estadísticas incluyen, pero no se limitan a, aplicar una regla.

30 En una realización, que no se encuentra dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, el o los valores de referencia como se pretenden en el presente documento pueden portar cantidades absolutas de los biomarcadores como se pretenden en el presente documento. En otra realización, la cantidad de biomarcadores en una muestra de un sujeto probado puede determinarse directamente con respecto al valor de referencia (por ejemplo, en términos de aumento o disminución, o veces de aumento o veces de disminución). Ventajosamente, esto puede permitir la comparación de la cantidad de los biomarcadores en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras para medir la cantidad relativa de los biomarcadores en la muestra del sujeto vis-à-vis el valor de referencia) sin la necesidad de primero determinar las cantidades absolutas respectivas de los biomarcadores.

35 Una "desviación" de un primera valor de un segundo valor puede generalmente abarcar cualquier dirección (por ejemplo, aumento: primer valor > segundo valor; o disminución: primer valor < segundo valor) y cualquier grado de alteración.

40 Por ejemplo, una desviación puede abarcar una disminución en un primer valor por, sin limitación, al menos cerca de 10 % (cerca de 0,9 veces o menor), o al menos por cerca de 20 % (cerca de 0,8 veces o menor), o al menos por cerca de 30 % (cerca de 0,7 veces o menor), o al menos por cerca de 40 % (cerca de 0,6 veces o menor), o al menos por cerca de 50 % (cerca de 0,5 veces o menor), o al menos por cerca de 60 % (cerca de 0,4 veces o menor), o al menos por cerca de 70 % (cerca de 0,3 veces o menor), o al menos por cerca de 80 % (cerca de 0,2 veces o menor), o al menos por cerca de 90 % (cerca de 0,1 veces o menor), con respecto a un segundo valor con el que se hace la comparación.

45 Por ejemplo, una desviación puede abarcar un aumento de un primer valor por, sin limitación, al menos cerca de 10 % (cerca de 1,1 veces o más), o al menos por cerca de 20 % (cerca de 1,2 veces o más), o al menos por cerca de 30 % (cerca de 1,3 veces o más), o al menos por cerca de 40 % (cerca de 1,4 veces o más), o al menos por cerca de 50 % (cerca de 1,5 veces o más), o al menos por cerca de 60 % (cerca de 1,6 veces o más), o al menos por cerca de 70 % (cerca de 1,7 veces o más), o al menos por cerca de 80 % (cerca de 1,8 veces o más), o al menos por cerca de 90 % (cerca de 1,9 veces o más), o al menos por cerca de 100 % (cerca de 2 veces o más), o al menos por cerca de 150 % (cerca de 2,5 veces o más), o al menos por cerca de 200 % (cerca de 3 veces o más), o al menos por cerca de 500 % (cerca de 6 veces o más), o al menos por cerca de 700 % (cerca de 8 veces o más), o similar, con respecto a un segundo valor con el que se hace la comparación.

50 Preferiblemente, una desviación puede referirse a una alteración observada estadísticamente significativa. Por ejemplo, una desviación puede referirse a una alteración observada que se encuentra fuera de los márgenes de error de valores de referencia en una población dada (según se expresa, por ejemplo, por desviación estándar o error estándar, o por un múltiplo predeterminado del mismo, por ejemplo, $\pm 1xSD$ o $\pm 2xSD$, o $\pm 1xSE$ o $\pm 2xSE$). La desviación

también puede referirse a un valor que se encuentra fuera de un intervalo de referencia definido por valores en una población dada (por ejemplo, fuera de un intervalo que comprende $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ o incluso $\geq 100\%$ de valores en dicha población).

5 En una realización adicional, una desviación puede concluirse si una alteración alterada está más allá de un umbral o corte dado. Tal umbral o corte se puede seleccionar como generalmente se conoce en la técnica para proporcionar una sensibilidad y/o especificidad elegida de los métodos de predicción, por ejemplo, sensibilidad y/o especificidad de al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %.

10 Por ejemplo, la curva de análisis característica de receptor-operador (ROC) puede usarse para seleccionar un valor de corte óptimo de la cantidad de un biomarcador dado con base en la sensibilidad y especificidad aceptables, o mediciones de desempeño relacionado que son bien conocidas *per se*, tal como valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV), proporción de probabilidad positiva (LR+), proporción de probabilidad negativa (LR-), índice de Youden, o similar.

Tal comparación puede revelar la presencia o ausencia de una desviación o no desviación entre la cantidad de cualquiera uno o más biomarcadores como se enseña en el presente documento medido en una muestra de un sujeto y un valor de referencia dado.

20 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de RoxP en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con un valor de referencia que representa el diagnóstico de la ausencia de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo (es decir, estado saludable). La cantidad reducida de este modo puede permitir el diagnóstico de que el sujeto tiene la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

30 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de *C. acnes* en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con un valor de referencia que representa el diagnóstico de la ausencia de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo (es decir, estado saludable). La cantidad reducida de este modo puede permitir el diagnóstico de que el sujeto tiene la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

35 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de RoxP en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con la cantidad media o mediana de RoxP en una población de sujetos sanos. La cantidad reducida de este modo puede permitir concluir que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

40 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de *C. acnes* en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con la cantidad media o mediana de *C. acnes* en una población de sujetos sanos. La cantidad reducida de este modo puede permitir concluir que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

50 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de *C. acnes* en una muestra de piel puede evaluarse con respecto a otro microbio, y más particularmente taxón bacteriano, tal como género o especie (por ejemplo, % de abundancia, tal como % de abundancia por secuenciación profunda del gen de ARNr 16S) en esa muestra de piel. Por ejemplo, con respecto a uno o más géneros seleccionados de *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, o *Stafilococcus*. Por ejemplo, la abundancia relativa (%) de *C. acnes* en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con la cantidad media o mediana de abundancia relativa (%) de *C. acnes* en una población de sujetos sanos. La abundancia relativa reducida de este modo puede permitir concluir que el sujeto tiene o está a un riesgo de desarrollar una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP.

60 En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de tipos o subtipos de *C. acnes* puede evaluarse con respecto a otros tipos o subtipos de *C. acnes* (por ejemplo, % de abundancia, tal como % de abundancia por secuenciación profunda del gen de ARNr 16S) en una muestra de piel. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos y usos pueden comprender además determinar la cantidad relativa de dos o más tipos de *C. acnes* (por ejemplo, filotipos), tipos de MLST, tipos de SLST, o cepas en la muestra de piel del sujeto. Por ejemplo, la abundancia del tipo I contra tipo II de *C. acnes* (por ejemplo, proporción de tipo I / tipo II) en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con la abundancia media o mediana del tipo I contra el tipo II de *C. acnes* en una población de sujetos sanos. La abundancia reducida de este modo del tipo I contra tipo II de *C. acnes* puede permitir concluir que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de

C. acnes que secreta RoxP.

En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de una o más secuencias promotoras de RoxP, secuencias de caja -35 de RoxP, y/o secuencias de caja -10 de RoxP (por ejemplo una o más secuencias promotoras de RoxP, secuencias de caja -35 de RoxP, y/o secuencias de caja -10 de RoxP mostradas en la figura 8) puede evaluarse en términos absolutos o con respecto a todas o con respecto a una o más o todas otras secuencias promotoras de RoxP, secuencias de caja -35 de RoxP, y/o secuencias de caja -10 de RoxP (por ejemplo con respecto a todas o con respecto a uno o más o todas otras secuencias promotoras de RoxP, secuencias de caja -35 de RoxP, y/o secuencias de caja -10 de RoxP mostradas en la figura 8). Por ejemplo, la cantidad de una o más secuencias promotoras de RoxP asociadas con expresión comparativamente alta de RoxP, tales como esas de SEQ ID NO: 7-12 en la figura 8, puede evaluarse en términos absolutos o con respecto a todas las secuencias promotoras de RoxP o con respecto a una o más o todas las secuencias promotoras de RoxP asociadas con la expresión comparativamente baja de RoxP, tales como esas de SEQ ID NO: 5-6 en la figura 8. Tales datos son informativos de la capacidad de C. acnes presente en la muestra de piel para producir RoxP.

En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de una o más secuencias codificantes de RoxP (por ejemplo uno o más tipos de secuencias codificantes de RoxP mostradas en la figura 10) puede evaluarse en términos absolutos o con respecto a todas las secuencias codificantes de RoxP o con respecto a una o más o todas otras secuencias codificantes de RoxP (por ejemplo con respecto a todos los tipos de secuencias codificantes de RoxP o con respecto a uno o más o todos otros tipos de secuencias codificantes de RoxP mostradas en la figura 10). Por ejemplo, la cantidad de uno o más tipos de secuencias codificantes de RoxP que pertenecen al segundo tipo como se caracteriza en la figura 10 (por ejemplo, que contiene la secuencia codificante de RoxP KPA171202), puede evaluarse en términos absolutos o con respecto a todos los tipos de secuencias codificantes de RoxP caracterizadas en la figura 10, o con respecto a uno o ambos del primer tipo y tercer tipo como se caracteriza en la figura 10. Tales datos son informativos de la capacidad de C. acnes presente en la muestra de piel para producir RoxP.

La cantidad absoluta de uno o más tipos de promotor de RoxP y/o tipos de secuencias codificantes de RoxP en una muestra de piel puede determinarse por métodos cuantitativos conocidos para mediciones de ácido nucleico en muestras biológicas, mencionadas en otro lado en esta especificación, tal como sin limitación PCR cuantitativo, tal como PCR digital de gotícula. La cantidad relativa de uno o más tipos de promotor de RoxP y/o tipos de secuencias codificantes de RoxP en una muestra de piel puede determinarse por métodos conocidos tal como amplificación de promotor o amplicones de secuencia codificante y la secuenciación típicamente a alta profundidad de secuenciación, y la asignación cuantitativa de las lecturas de secuencia a dicho uno o más tipos de promotor de RoxP y/o tipos de secuencias codificantes de RoxP.

Por lo tanto, también se da a conocer el método para el diagnóstico de enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto o para la determinación de si un sujeto podría beneficiarse de la administración de RoxP o una cepa viva de C. acnes que secreta RoxP, comprendiendo el método determinar la cantidad absoluta o relativa de uno o más tipos de secuencias codificantes de RoxP y/o tipos de promotor de RoxP en una muestra de piel del sujeto.

En ciertas realizaciones preferidas, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, la cantidad de RoxP secretado por C. acnes medida en una muestra de piel también puede evaluarse. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos y usos pueden comprender además determinar la cantidad de RoxP secretado por la C. acnes en la muestra de piel del sujeto.

Por ejemplo, la cantidad total de RoxP producida por C. acnes o la abundancia relativa de alta-RoxP que expresa tipos, subtipos o cepas de C. acnes contra los tipos, subtipos o cepas que expresan el promedio o bajo RoxP de C. acnes, en una muestra de piel de un sujeto puede reducirse en comparación con las correspondientes mediciones en una población de sujetos sanos. La cantidad total reducida de este modo de RoxP producida por C. acnes o la abundancia relativa de los tipos, subtipos o cepas que expresan alto RoxP de C. acnes puede permitir concluir que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo y/o se beneficiará de la administración de RoxP o una cepa viva de C. acnes que secreta RoxP.

En ciertas realizaciones, los presentes métodos y usos también pueden comprender áreas afectadas contra no afectadas de la piel del mismo sujeto.

Por lo tanto, ciertas realizaciones del método, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, para el diagnóstico de enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto pueden comprender:

- a) determinar la cantidad de RoxP en una muestra de un área de la piel del sujeto que se sospecha que está afectada por una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo;
- b) determinar la cantidad de RoxP en una muestra de un área sana de la piel del sujeto; y
- c) comparar las cantidades de RoxP determinadas en los pasos a) y b);

en donde una menor cantidad de RoxP determinada en el paso a) en comparación con la cantidad de RoxP determinada en el paso b) indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo.

5 Ciertas otras realizaciones, que no se encuentran dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, del método para el diagnóstico de enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto pueden comprender:

- 10 a) determinar la cantidad de cepas de tipo I, tipo II y tipo III de *C. acnes* en una muestra de un área de la piel del sujeto que se sospecha que está afectada por una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo;
- 15 b) determinar la cantidad de cepas de tipo I, tipo II y tipo III de *C. acnes* en una muestra de un área sana de la piel del sujeto; y

15 c) comparar las cantidades de cepas de tipo I, tipo II y tipo III de *C. acnes* determinadas en los pasos a) y b);

en donde una menor cantidad relativa de *P. acnes* tipo I cepas en la muestra de un área de la piel del sujeto se sospecha que está afectado por una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en comparación con la cantidad relativa de cepas de tipo I de *P. acnes* en la muestra de un área sana de la piel del sujeto indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo.

20 También se contemplan enfoques de medicina personalizada y de diagnóstico acompañantes que emplean los presentes métodos de diagnóstico o evaluación de beneficios o usos para seleccionar sujetos que tienen o están en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, o como unos que podrían beneficiarse de la administración de una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP o de la administración de RoxP. Los sujetos así seleccionados pueden someterse a las intervenciones profilácticas o terapéuticas dadas a conocer en el presente documento que comprenden la administración de una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP o la administración de RoxP.

30 Por lo tanto, un aspecto proporciona una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento. Un aspecto relacionado proporciona un método para la prevención o tratamiento una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento. Otro aspecto relacionado proporciona el uso de una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento. Un aspecto adicional relacionado proporciona el uso de una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para la prevención o tratamiento una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento.

35 Otro aspecto, que no se encuentra dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, proporciona un método que comprende administrar una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP a un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como uno que podría beneficiarse de la administración de una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP por los métodos dados a conocer en el presente documento.

40 Otro aspecto proporciona una composición que comprende RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento, y en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC). Un aspecto relacionado proporciona un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar a la piel del sujeto una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición que comprende RoxP, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento, y en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC). Otro aspecto relacionado proporciona el uso de una composición que comprende RoxP para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel

asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento, y en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC). Un aspecto adicional relacionado proporciona el uso de una composición que comprende RoxP para la prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo en un sujeto, en donde el sujeto se ha seleccionado como que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo por los métodos dados a conocer en el presente documento, y en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).

10 Un aspecto adicional, que no se encuentra dentro del alcance de la materia objeto reivindicada, proporciona un método que comprende administrar una composición que comprende RoxP, en donde el sujeto se ha seleccionado como uno que podría beneficiarse de la administración de RoxP por los métodos dados a conocer en el presente documento.

15 Por lo tanto, la presente solicitud también proporciona aspectos y realizaciones como se establece en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones, y variaciones serán evidentes para esos expertos en la técnica a la luz de la descripción anterior.

20 Los aspectos y realizaciones dados a conocer en el presente documento de la invención se apoyan además por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos usados en los ejemplos 1 a 6

Cepas bacterianas y cultivo

30 Aislados de *Cutibacterium acnes*, representativos de las cepas tipo I, II y III, se cultivaron a 37 °C bajo condiciones anaerobias en caldo anaerobio de Wilkins-Chalgren (WC) hasta alcanzar ya sea la fase exponencial (1-3 días) o estacionaria (5-7 días). Información adicional acerca de cepas específicas de *C. acnes* y su aislamiento pueden encontrarse en Homberg *et al.* 2009 Clin Microbiol Infect 15:787-95, e información acerca de sus respectivos homólogos de RoxP se puede encontrar en Allhorn *et al.* 2016 Sci Rep 6:36412. Los aislados por ejemplo incluyeron la cepa *C. acnes* KPA171202, disponible públicamente de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares del Leibniz Institute DSMZ bajo el número de acceso DSM-16379. El genoma completo de *C. acnes* KPA171202 se ha anotado en Genbank bajo los números de acceso NC_006085.1/AE017283.1. Los aislados además incluyeron la cepa *C. acnes* subsp. *defendens* disponible públicamente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) bajo el número de acceso ATCC 11828. El genoma completo de *C. acnes* ATCC 11828 se ha anotado en Genbank bajo los números de acceso NC_017550.1/CP003084.1. Los aislados además incluyeron la cepa de *C. acnes* disponible públicamente de ATCC bajo el número de acceso ATCC 6919. El genoma completo de *C. acnes* ATCC 6919 se ha anotado en Genbank bajo los números de acceso NZ_CP023676.1/CP023676.1. Los aislados además incluyeron la cepa *C. acnes* disponible públicamente de DSMZ bajo el número de acceso DSM 1897. Los aislados además incluyeron las siguientes cepas de *C. acnes* cuyos genomas completos se han anotado en Genbank bajo los respectivos números de acceso: SK137 (NC_014039.1/CP001977.1), 266 (NC_017534.1/CP002409.1), 6609 (NC_017535.1/CP002815.1), P.acn33 (NC_016516.1/CP003195.1), P.acn17 (NC_016512.1/CP003196.1), P.acn31 (NC_016511.1/CP003197.1), C1 (NC_018707.1/CP003877.1), HL096PA1 (NC_021085.1/CP003293.1), hdn-1 (NZ_CP006032.1/CP006032.1), KCOM 1861 (= ChDC B594) (NZ_CP012647.1/CP012647.1), PA_15_1_R1 (NZ_CP012355.1/CP012355.1), PA_21_1_L1 (NZ_CP012351.1/CP012351.1), PA_15_2_L1 (NZ_CP012352.1/CP012352.1), PA_12_1_L1 (NZ_CP012354.1/CP012354.1), KCOM 1315 (NZ_CP031442.1/CP031442.1), PA_30_2_L1 (NZ_CP012350.1/CP012350.1), PA_12_1_R1 (NZ_CP012353.1/CP012353.1), A1-14 (NZ_CP013693.1/CP013693.1). En total, se han analizado 155 aislados o secuencias de genoma de *C. acnes* disponibles de las fuentes anteriores.

Análisis de qPCR de la expresión del gen roxP

El contenido de ARN de la fase exponencial y/o estacionaria de cultivos de *C. acnes* se extrajo usando el kit RNeasy® Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) complementado con reactivo protector de bacterias (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cultivos de *C. acnes* se mezclaron con un volumen igual de reactivo protector de bacterias para asegurar la estabilización del ARN antes de la interrupción de las estructuras de membrana. La lisis celular se logró subsecuentemente a través de la adición de tampón TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) suplementado con 15 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) y proteinasa K (Qiagen). Las muestras fueron tratadas posteriormente con tampón suplementado con β-mercaptoetanol RLT (kit RNeasy Mini), etanol, y se agregó a columnas RNeasy spin de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones resultantes de ARN se midieron usando NanoDrop® (Saveen Werner, Limhamn, Suecia) y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta uso posterior.

La abundancia relativa los transcritos de *roxP* y *gapdh* se determinó a través de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando Power SYBR® Green ARN-a-Ct 1-Step Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) mezclado 1:1 (v/v) con 10 ng de ARN y 100 nM de cebadores en agua libre de nucleasa:

5 *roxP*: 5'-GCATCTAGCCCTCTCACCAT-3' (SEQ ID NO: 13) y
 5'-CTGAGAGTCCGGTAGGTGGT-3' (SEQ ID NO: 14);
gapdh: 5'-GCATCATGACTACCGTCCAC-3' (SEQ ID NO: 15)
 10 5'-CGGTGGTCTCCTTAGAGGT-3' (SEQ ID NO: 16).

Las placas se ejecutaron con transcripción inversa durante 30 min a 48 °C, 10 min a 95 °C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C alternando con 1 minuto a 60 °C, en un iCycler iQ® (Bio-Rad, Hercules, CA). Los resultados se interpretaron vía análisis de Cq doble delta, usando los valores registrados para la cepa *C. acnes* 266 como una referencia. El experimento se ejecutó en duplicados biológicos y tecnológicos.

15 Generación de un vector de levadura que expresa RoxP

20 Una versión truncada de *roxP* (residuos de aminoácidos 24-161, omitiendo el péptido de señal N-terminal) de la cepa *C. acnes* KPA171202 se amplificó (cebadores: 5'-GGCTGAAGCTGAATTACACCCATCGATGAGAGCCAAC-3' (SEQ ID NO: 17) más 5'-GATGATGATGGTCGACTCCTGCTGCGCCGTTGAGGGCGGGATCCACC-3' (SEQ ID NO: 18)) para generar un fragmento de *roxP* que contiene un enlazador C-terminal GAAG, y se clonó en los sitios EcoRI y Sall del vector pPICZαA (ThermoFisher Scientific). Se usaron plásmidos linealizados de secuencia verificada para transfectar SuperMan5 *Pichia pastoris*.

25 Expresión de RoxP recombinante (rRoxP)

30 Una cepa generada de SuperMan5 *Pichia pastoris* que alberga el vector descrito anteriormente, se tomó en alícuota y se almacenó a -80 °C en medio YPD suplementado con 50 % (v/v) de glicerol. Para la expresión eficiente de proteína recombinante, los cultivos congelados descongelados se cultivaron en un medio complejo de glicerol tamponado (BM* (70 %, v/v), 0,5 M de tampón de potasio pH 6,0 (10 %, v/v), YNB (1,4 %, p/v), >99 % de glicerol (1 %, v/v), biotina (4 x 10⁻⁷ %, p/v)) por 24 h antes de resuspenderse en medio complejo de metanol tamponado (BM* (70 %, v/v), 0,5 M de tampón de potasio pH 6,0 (10 %, v/v), YNB (1,4 %, p/v), 99,8 % de metanol (1,5 %, v/v), biotina (4 x 10⁻⁷ %, p/v)). Los cultivos se mantuvieron subsecuentemente en una incubadora agitada (30 °C, 180 r. p. m.) durante 5 días con la inducción continua de *roxP* que se logró a través de la adición de metanol (1 % v/v) cada 24 h.

35 *BM: Extracto de levadura (1,4 %, p/v), peptona (2,9 %, p/v), aminoácidos CAS (1,4 %, p/v).

40 Purificación de rRoxP

45 Tras una centrifugación de 10 min a 800 x g y paso a través de un filtro de 0,22 µm, el sobrenadante de levadura se cargó sobre columnas de níquel (His Gravitrapp™, GE Healthcare, Chicago, IL) y se eluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando un tampón de imidazol (20 mM de fosfato de sodio pH 7,4, 500 mM de NaCl, 500 mM de imidazol). La proteína purificada volvió a tamponarse inmediatamente en fosfato de sodio (20 mM, pH 7,4) a modo de diálsis (MWCO: 6-8 kDa, Novagen®), después de lo cual la concentración de la proteína se determinó espectrofotométricamente a través de NanoDrop® (Saveen Werner) y la pureza de la muestra vía un 15 % de SDS-PAGE.

50 Criogelación

55 El método usado para criogelación se ha descrito previamente por Ertürk *et al.* (2013 J Mol Recognit 26:633-642). Brevemente, el monómero funcional N-metacriloil-1-histidina metil éster (1 mM) y plantilla de RoxP (1 mM) se disolvieron en agua desionizada para pre-complejación. Se preparó 2-hidroxietil metacrilato (20 mM) simultáneamente (1:1 v/v). Las soluciones de monómero se mezclaron entonces con un volumen igual de agente de entrelazamiento, N,N'-metilenbisacrilamida (concentración final de 90 mM), y la mezcla de reacción se purgó con óxido nitrico. La polimerización se inició subsecuentemente por la adición de persulfato de amonio (4,4 mM) y N,N,N',N'-tetrametilen etilendiamina (0,125 %). La solución resultante se tomó en alícuotas en jeringas de plástico de 4 x 5 ml (\varnothing = 1,3 cm) con salidas inferiores cerradas y se colocó inmediatamente a 14 °C por 24 h. Despues de descongelarse, las columnas se lavaron inicialmente con H₂O y la plantilla de proteína se removió después con un tampón de imidazol (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4). La elución se descontinuó cuando no se pudo detectar RoxP en el flujo pasante (espectrofotométricamente determinado a 280 nm).

60 Purificación de RoxP nativo

La variante principal de RoxP se purificó de la fase estacionaria de medio de cultivo de *C. acnes* KPA171202, siguiendo un procedimiento de precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico que se ha descrito previamente (Allhorn *et al.* 2016 Sci Rep 6:36412). La purificación de la variante menos común del medio de cultivo de *C. acnes* AD24, requirió el uso de una técnica más sensible. La fracción de proteína del sulfato de amonio (80 %) de la fase estacionaria de *C. acnes* AD24 se hizo pasar a través de una columna de criogel pre-equilibrada usando una bomba peristáltica (1 ml/min). Para habilitar la absorción de RoxP nativo, la fracción de proteína se hizo pasar repetidamente a través del gel bajo agitación continua durante 1 h. El RoxP unido se eluyó usando tampón de imidazol (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4) y la concentración resultante de la proteína y la pureza de la muestra se analizaron a través de NanoDrop® (Saveen Werner) y un 15 % de SDS-PAGE, respectivamente.

Ensayos de catión de radical de ABTS

La reducción de cationes de radical ABTS preformados en la presencia de RoxP se analizó usando un ensayo espectrofotométrico descrito previamente por Re *et al.* (1999 Free Radic Biol Med 26:1231-1237). Ácido 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfónico) sal de diamonio (ABTS) (Sigma-Aldrich) se disolvió inicialmente en ddH₂O a una concentración de 7 nM. Se añadió persulfato de potasio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 2,45 mM y la solución resultante se mantuvo en la oscuridad y se incubó durante la noche a T. A.. Los radicales formados de ABTS se diluyeron con PBS (pH 7,4) hasta alcanzar una absorbancia de aproximadamente 0,7 a 734 nm. Se añadieron antioxidantes (1,7 µM) (1:9 v/v) y el espectro de absorbancia 500 a 900 nm se registró después de 30 s.

Cultivo Celular

Se cultivaron queratinocitos humanos (células HaCat; dadas a conocer en Boukamp *et al.* 1988 J Cell Biol 106:761-71 y disponibles de Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, info@cell-lines-service.de; y también disponibles comercialmente por ejemplo de Addexbio, San Diego, CA, número de catálogo T0020001) en medio SFM suplementado con L-glutamina, EGF (factor de crecimiento epidérmico) y extracto hipofisario bovino (Gibson, Invitrogen) hasta 90 % de confluencia en placas de 96 pocillos (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca). Monocitos humanos (células THP-1; dadas a conocer en Tsuchiya *et al.* 1980 Int J Cancer 26:171-6; disponibles comercialmente por ejemplo de Sigma-Aldrich, número de catálogo 88081201; proporcionadas amablemente por el Dr Arne Egesten, Lund University) se cultivaron en medio R. P. M. I 1640 suplementado con Glutamax-1 (Gibco®, ThermoFisher Scientific), 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de penicilina, y 10 % v/v de suero de ternero fetal (ThermoFisher Scientific). Todas las células se cultivaron a 37 °C en 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Ensayo MTT

Células HaCat cultivadas a 90 % de confluencia, o células THP-1 (1,2 × 10⁶ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos se trataron con 2 mM de paraquat (Sigma-Aldrich) y/o 5 µM de RoxP por 24-48 h. Las células HaCat se mantuvieron en su medio de cultivo, mientras que los monocitos se transfirieron a un tampón de HEPES-HBSS (solución salina balanceada de Hank) a pH 7,4. La viabilidad se midió por la adición de 0,5 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) durante 1-5 horas. Las células se lavaron con PBS seguido por la adición de DMSO. Las muestras se incubaron durante 30 minutos y la absorbancia a 550 nm se midió usando un contador Wallac 1420 Multilabel (Bio-Rad).

Recolección de hisopados de piel

Las muestras se recogieron entre noviembre de 2016 y mayo de 2017 en el Departamento de Dermatología del Lund University Hospital, Suecia. A pacientes (n = 54, de edad entre 50 - 70) que presentan queratosis actínica (AK) que se sospecha clínicamente o carcinoma de células basales superficial/nodular (BCC) de la cara, cuello, pecho superior o regiones del hombro, se les invitó a participar.

Tabla 1. Características de pacientes y valores de referencia seleccionados. Grupos de pacientes se compararon usando una prueba de ANOVA de una vía. AK: Queratosis actínica. BCC: Carcinoma de células basales. * estadísticamente significativo

	Control	AK	BCC	Valor P
Edad				0,058
Intervalo	51-70	53-69	50-70	
Media ± SD	61,56 ± 4,58	60,5 ± 5,52	64,61 ± 5,51	
Mediana	61	60,5	66,5	0,932

Sexo, n				
Masculino	9	8	8	
Femenino	9	10	10	
Ubicación de hisopo				0,010*
Cuero cabelludo	0	1	0	
Frente	0	3	1	
Ceja	0	4	0	
Sien	0	1	2	
Nariz	0	0	5	
Mejilla	18	7	4	
Labio	0	1	0	
Pecho	0	0	2	
Hombro	0	1	4	

Los individuos se hisoparon (Venturi Transystem, Copan, Italia) con hisopos pre-remojados en tampón por 30 s en regiones lesionadas (4 cm^2) y por 30 s a un sitio sano anatómicamente idéntico (4 cm^2), funcionando así como su propio control. Los hisopos se sacudieron suavemente en su solución de almacenamiento líquido, se almacenaron a 4 °C durante la noche, y entonces se prepararon para análisis. Los criterios de exclusión incluyeron pacientes con: maquillaje aplicado, la cara recién lavada (<1 h), diabetes, deterioro cognitivo, otros trastornos activos de la piel, tumores ulcerados, inmunosupresión, tratamiento en curso/recientemente terminado de antibiótico o corticosteroides (sistémico o tópico, <4 semanas). El estudio fue aprobado por el comité de ética en Malmö/Lund (2016/465), y de conformidad con la Declaración de Helsinki. Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los pacientes antes de la inclusión.

Análisis de concentración de RoxP en muestras hisopadas de piel usando un biosensor de capacitancia

La abundancia de RoxP en muestras tomadas de ya sea voluntarios sanos o pacientes con AK/BCC se analizó en un biosensor capacitivo, aplicando una técnica de impresión molecular descrita previamente por Ertürk *et al.* (2018 PLoS ONE 13:e0193754). Considerando cualquier fondo potencial, una curva de calibración se obtuvo inicialmente de hisopos de piel falsos salpicados con RoxP (0,14 - 0,71 mM) (Venturi Transystem, Copan, Italia), diluidos 1:100 (v/v) en tampón de fosfato de sodio (10 mM, pH 7,4). Las células y desechos de hisopos de pacientes se eliminaron subsecuentemente a través de centrifugación (15 min, 4000 x g), se diluyó el sobrenadante 1:100 (v/v) en tampón de fosfato de sodio, y eventualmente se injectó en el sistema capacitivo por triplicado. La curva de calibración se usó para la determinación de concentraciones de RoxP en cada muestra antes de combinar y representar gráficamente como abundancia en piel sana, AK y BCC, respectivamente.

Preparación de ADN de hisopados de piel

Palitos de algodón con hisopados de piel de pacientes e individuos sanos se almacenaron a 4 °C durante la noche. El material celular se recogió del tampón de almacenamiento líquido a través de centrifugación (5000 g, 10 min), y el ADN se extrajo usando Qiagen DNeasy. La cantidad y calidad de las extracciones de ADN se evaluaron por NanoDrop® (Saveen Werner).

Secuenciación de ADN y análisis bioinformático

Para determinar el microbioma de la piel, la región V1-V3 del gen de ARNr 16S se amplificó y los amplicones se sometieron a secuenciación profunda usando tecnología Illumina, realizada por Eurofins (Alemania). Para reducir la tasa de error de las lecturas, el procesamiento de las lecturas en bruto de la plataforma Illumina se realizó usando el software Mothur v1.39.1 y siguiendo el MiSeq SOP con algunas modificaciones. Inicialmente, las lecturas de extremos apareados se combinaron usando el comando "make.contig" (Kozich *et al.* 2013 Applied and environmental microbiology 79:5112-20). Las lecturas combinadas se recortaron entonces de la secuencia de cebador y las secuencias que contienen bases ambiguas o que contienen estiramientos más largos de homopolímeros que ocho se descargaron del análisis posterior. Las lecturas se alinearon después contra la alineación de referencia Silva v128 y la alineación resultante se filtró de modo que todas las lecturas solo se superpusieron en la misma región. Para reducir

además el número de errores de secuenciación, se desarrolló un paso de pre-agrupamiento que implementa un algoritmo de pseudo-enlace único originalmente desarrollado por Huse *et al.* (2010 Environmental microbiology 12(7):1889-98) con la variable "diff" establecida a cuatro. Se eliminaron las quimeras usando la versión incorporada del algoritmo UCHIME en Mothur (Edgar *et al.* 2011 Bioinformatics 27:2194-200). Finalmente, todos los singletes, 5 duplicados, y triplicados se eliminaron antes del análisis final para precluir la inclusión de secuencias de contaminación potencial o errores de secuencia que no se han detectado en pasos previos. Las lecturas resultantes se clasificaron entonces con el comando classify.seqs usando el método Bayesiano y las guías taxonómicas v14.51 de la Base de datos de Microbioma Oral Humano (HOMD) (<http://www.homd.org/>) con una inclusión manual de las bacterias 10 relevantes de la piel (Chen *et al.* 2010 Database: the journal of biological databases and curation baq013). El corte de confianza fue establecido a 80 %. El análisis discriminante lineal (LDA) acoplado con medición de tamaño de efecto (LEfSe) para detectar diferencialmente taxón bacteriano abundante (filo, género, especie) entre grupos. Los valores alfa para las pruebas de Kruskal-Wallis factorial y de Wilcoxon por parejas se establecieron a 0,05 y el umbral de puntuación de LDA para los aspectos discriminativos se estableció a 3,5. Se usó la versión en línea del programa LEfSe (Segata *et al.* 2011 Genome Biology 12:R60).

15 Para determinar los filotipos de la población de *C. acnes* en muestras hisopadas de piel se usó el enfoque de SLST establecido previamente (Scholz *et al.* 2014 PLoS ONE 9:e104199). Los amplicones de SLST se sometieron a secuenciación de MiSeq, realizado por Eurofins (Alemania). Todos los pares leídos de la secuencia de alta calidad se 20 asignaron a alelos de SLST; todos los alelos de SLST actualmente conocidos son accesibles en www.medbac.dk/slst/pacnes.

Ejemplo 1: La expresión de *roxP* es dependiente del filotipo de *C. acnes*

25 Las tasas de expresión de *roxP* se determinaron a través de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en todos los filotipos principales de *C. acnes*. Los aislados de *C. acnes* identificados como filotipo I presentaron niveles de expresión significativamente mayores de *roxP* en comparación con las cepas de mayor filotipo II o III (Figura 1). El tabla 2 siguiente presenta la cohorte de cepas utilizadas en el experimento subyacente de la figura 1. Las veces de cambio representan los valores obtenidos, normalizados contra *gapdh* y puestos con relación a la expresión de *roxP* notada de la cepa de *C. acnes* 266.

30 Tabla 2. Cohorte de cepas utilizadas en el experimento subyacente de la figura 1

Cepa	Veces de cambio	Filotipo/SLST	Variante de promotor de RoxP de acuerdo con la figura 8
266	1	IA/A1	Tipo PA12.1.L1
12.1.L1	1,1604519	IA/A1	Tipo PA12.1.L1
21.1.L1	1,527945494	IB/H1	Tipo KPA171202
30.2.L1	1,54985506	IA/D1	Tipo PA15.1.R1
15.1.R1	1,779504667	IA/C1	Tipo PA15.1.R1
12.1.R1	1,790863582	IA/A1	Tipo PA12.1.L1
09 - 323	0,003734342	II/K8	Tipo 09-09
11 -79	0,008892697	II/K2	Tipo 09-09
09 - 09	0,025317342	II/K1	Tipo 09-09
10 - 43	0,025606243	II/K2	Tipo 09-09
09 - 23	1,947152474	II/K1	Tipo 09-109
PM H5	0,585279135	III/L1	Tipo PMH5
PM H7	0,839982175	III/L1	Tipo PMH5

35 La secuenciación de las respectivas regiones promotoras reveló la existencia de 8 secuencias dominantes de la región en dirección 5' de RoxP (Figura 9), y además reveló una sustitución de base en las cepas tipo II, que afecta la región -35 del promotor pronosticado de *roxP*, potencialmente capaz de influir negativamente en las tasas de transcripción (Figura 8). La comparación de 155 genomas secuenciados de *C. acnes* reveló que la mayoría de las cepas de filotipo I compartieron la misma región en dirección 5' de *roxP*, asociada con alta expresión, mientras la región en dirección 40 5' de *roxP* de la mayoría de las cepas de filotipo II fue distinto (Figura 9). Las secuencias -35 ACTTCGAT o ACTTCAAT parecieron preferidas para lograr una expresión comparativamente mayor de RoxP. La secuencia -10 TGCTATACT pareció preferida para lograr una expresión comparativamente mayor de RoxP, mientras la secuencia -10 TGCTACACT también logró una expresión comparativamente buena de RoxP.

45 También se investigaron las capacidades de crecimiento aerobias/anaerobias de las cepas. Aunque un aumento de expresión de *roxP*, presentada por las cepas de mayor filotipo I, se correlacionaba con una capacidad de crecer igualmente bien en entornos óxicos y anóxicos, la baja expresión de *roxP* dio como resultado el crecimiento reducido o demorado en configuraciones ricas en oxígeno (Figura 2).

Ejemplo 2: Los homólogos de RoxP presentan actividades antioxidantes comparables

Aunque RoxP está altamente conservado, con 99-100 % de identidad de aminoácidos en la mayoría (aproximadamente 93 %) de los aislados, un subconjunto de cepas (aproximadamente 7 %) clasificadas como filotipo II y III de *C. acnes* expresa una proteína relacionada más distamente, con aproximadamente 83 % de identidad de aminoácidos (Figura 10). Se comparó la actividad reductora de diferentes homólogos de RoxP. La variante principal pudo aislarse exitosamente de medio de cultivo de *C. acnes* KPA171202 (tipo IB), y el homólogo menos común de medio de cultivo de *C. acnes* AD24 (tipo II). El último se purificó usando criogeles macroporosos impresos con RoxP recombinante (Figura 11), después de lo cual se verificó la identidad de la proteína a través de análisis de transferencia de tipo Western (datos no mostrados). Como se demuestra por una disminución de absorbancia a 734 nm, los dos homólogos fueron capaces de reducir el sustrato de ABTS⁺ catiónico con igual eficiencia y, al hacer esto, presentaron actividades antioxidantes altamente similares (Figura 3A: radicales ABTS⁺ preformados, figura 3B: radicales ABTS preformados más NaCl). Aunque la variante más comúnmente expresada por las cepas de filotipo I presentaron una actividad continuamente mayor, la diferencia fue solo menor y no estadísticamente significativa.

15 Ejemplo 3: La actividad antioxidante de RoxP se mantiene en condiciones rigurosas

RoxP presentó una actividad reductora dependiente de la concentración (Figura 4A), tuvo una pérdida de actividad en presencia de CaCl₂ pero soportó las concentraciones fisiológicas de NaCl (Figura 4B). La proteína fue además capaz de soportar temperaturas de por encima de 70 °C sin ninguna pérdida significativa de actividad (Figura 4C), así como almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente (Figura 4D). Estos datos muestran que RoxP permanece activo en las configuraciones fisiológicas y presenta una estabilidad notable bajo condiciones rigurosas, probando su funcionalidad en la piel y su utilización como agente biofarmacéutico.

20 Ejemplo 4: RoxP puede proteger las células humanas de daño oxidativo *in vitro*

25 Para investigar la capacidad de RoxP de reducir radicales libres en un sistema biológico, se expusieron células humanas a oxidación (usando paraquat) y se investigó la capacidad de RoxP de rescatar las células de estrés oxidativo letal. Incluso a una proporción de 1:400 (RoxP:oxidante) que se añade de una manera subsecuente, el RoxP inhibió completamente el efecto oxidativo negativo de paraquat (Figura 5). El efecto fue más prominente en monocitos, 30 mientras los queratinocitos respondieron menos bien, tanto a oxidación como a antioxidadación (Figura 5A-5B). Notablemente, el RoxP también pudo aumentar la viabilidad global de las células humanas en la ausencia de un oxidante agregado.

35 Ejemplo 5: RoxP es menos abundante en enfermedad de la piel asociada con estrés oxidativo

35 Se estudiaron las abundancias de la proteína RoxP en queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC). Se obtuvieron hisopados de piel ($n = 54$) de individuos con piel sana, con AK de condición pre-cáncerosa y con BCC desarrollado, en ambas de regiones afectadas con enfermedad y no afectadas. Las muestras se analizaron subsecuentemente usando un biosensor capacitivo altamente sensible, que previamente mostró detectar 40 concentraciones tan bajas como 8,25 ng de RoxP/cm² de piel (Ertürk y Lood *et al.* 2018 J Vis Exp, doi: 10.3791/57208), y los cambios de capacitancia registrados se equilibraron a la curva de calibración preestablecida (Figura 12). Los resultados se analizaron en una población (Figura 6) y base individual (Figura 13). En el último caso, los pacientes se excluyeron si la determinación precisa de la concentración de RoxP, en regiones ya sea afectadas o no afectadas, no fue exitosa (datos no mostrados). Una mayor abundancia total de RoxP se observó entre pacientes con BCC (Figura 45 6). Los individuos con AK mostraron un declive adicional de la concentración de RoxP en las áreas enfermas, mientras que esos con BCC presentaron niveles similares en ambos sitios afectados y no afectados (Figura 13).

50 Ejemplo 6: La disbiosis en enfermedad oxidativa de la piel se caracteriza por disminución de la prevalencia de *C. acnes*

50 Se estudió la composición bacteriana en AK y BCC al nivel de género, especie y filotipo de *C. acnes*. Los hisopados de piel, rastreados por secuenciación profunda del amplicón de ADNr 16S, revelaron abundancias marcadamente disminuidas de *Propionibacterium* y elevadas de *Staphylococcus* en piel enferma en comparación a piel sana (Figura 7A y figura 14). Una caída en la prevalencia de *C. acnes* durante las etapas agudas de la enfermedad oxidativa (AK) al parecer procedieron a surgir en la especie de estafilococos, particularmente *S. aureus*, durante las últimas etapas de la enfermedad (BCC) (Figura 7A). La caracterización adicional de las poblaciones de *C. acnes* a través de tipificación de secuencia de locus único (SLST) reveló que la prevalencia de tipos específicos de *C. acnes* también cambió en AK y, en un menor grado, en la piel afectada por BCC (Figura 7B). Las cepas que pertenecen al tipo II de *C. acnes* pudieron más comúnmente aislarse de regiones enfermas de la piel, mientras que las áreas sanas de la piel presentaron una redominancia más cercana al promedio de las cepas de tipo I.

60 Materiales y métodos usados en los ejemplos 7 a 11

65 Se instruyó a Synelvia SAS (Labège, Francia) a que sometiera a prueba el efecto protector de sobrenadante de *C. acnes* que contiene RoxP (incluido como un ingrediente activo a 10 % v/v en el medio) contra estresantes celulares en un modelo de epidermis humana reconstituida (RHE). Los estudios relevantes del análisis se establecen a

continuación.

Ingrediente activo

- 5 El sobrenadante que contiene RoxP de *C. acnes* se preparó como sigue. Una cepa de H1 se cultivó en un fermentador de 20 l a 37 °C por 3 días en un medio adecuado. Entonces el sobrenadante se concentró usando filtraciones de flujo tangencial. En un primer paso, se usó un corte de 30 kDa y en un segundo paso se usó un corte de 3 kDa. El concentrado final se analizó por filtración en gel en un HPLC iProminence (Shimadzu, Kyoto, Japón) usando TSKgel QC-PAK (Tosoh Bioscience, Griesheim, Alemania). El concentrado fue RoxP puro al 80 % y a una concentración de 10 alrededor de 2 mM (~34 mg/ml). Se añadió 5 % v/v de glicerol puro al producto antes de que se almacenara a -80 °C antes del usarlo en ensayos. Este sobrenadante altamente enriquecido con RoxP de *C. acnes* se añadió como 10 % v/v al medio para los experimentos; el medio entonces contenía cerca de 0,16 mM de RoxP.

Estresantes y condiciones

- 15 Estrés por ozono: La producción de ozono se realizó a 0,3 l/min al introducir una mezcla de O₂ y O₃ (99/1 % (v/v)) en el medio de cultivo de RHE (epidermis humana reconstituida) (burbujeo). Este procedimiento produjo cerca de 1 % de ozono que es equivalente a 4 ppm de exposición a ozono.
- 20 La reacción de ozonolisis induce muchos productos llamados productos primarios y secundarios de acuerdo con el reordenamiento de Criegee. El ozónido primario resultante se descompone en un carbonilo primario (un aldehído o una cetona) y un carbonil-O-óxido (a menudo denominado un intermediario de Criegee). Los productos secundarios reaccionan con la molécula parental bajo ozono para generar otros productos de degradación. La reacción de ozonolisis también podría inducir oxidación de proteína o daño al ADN.
- 25 Estrés por UV: RHEs se expusieron a radiación UV (UVA + UVB) a 2 MED (dosis mínima de eritema) usando un sistema Bio-Sun (Vilber Lourmat, Collégien, Francia).
- 30 La foto-oxidación induce oxidación de lípidos y proteínas, daño al ADN y genera productos específicos de oxidación/degradación tales como CPD u 8-OHdG.

Las siguientes condiciones se han sometido a prueba.

- 35 Control negativo 1: RHEs no estresadas sin ingrediente activo. Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 10. En el día 10, se recuperaron las RHEs y el medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.
- 40 Control negativo 2: RHEs no estresadas con ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP). Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 8. En los días 8, y 9, se añadió el ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP) en el medio a 10 % v/v. En el día 10, se recuperaron las RHEs y el medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.
- 45 Control positivo 1: RHEs estresadas con UV. Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 8. En el día 9, las RHEs se introdujeron en la cámara y se expusieron a 2 MED (UVA: 9 J/cm² (365 nm) y UVB 300 mJ/cm² (312 nm)). Después del estrés, se añadió un nuevo medio a las RHEs. En el día 10, se recuperaron las RHEs y el medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.
- 50 Prueba 1: RHEs estresadas con UV en contacto con el ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP). Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 8. En el día 8, se añadió el ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP) en el medio a 10 % v/v. En el día 9, las RHEs se introdujeron en la cámara y se expusieron a 2 MED (UVA: 9 J/cm² (365 nm) y UVB 300 mJ/cm² (312 nm)) con el medio que contiene el ingrediente activo a 10 % v/v. Después del estrés, se añadió un nuevo medio que contiene el ingrediente activo a 10 % v/v a RHE. En el día 10, se recuperaron las RHEs y el medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.
- 55 Control positivo 2: RHE estresada con ozono. Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 8. En el día 9, las RHE se sometieron a estrés con ozono (en la cámara de reacción). El medio de reacción se enfrió a 5 °C durante la reacción con ozono (cerca de 1 minuto). Después del estrés, se añadió un nuevo medio a RHE. En el día 10, se recuperaron RHE y medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.
- 60 Prueba 2: Las RHEs sometidas a estrés con ozono en contacto con el ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP). Las RHEs se produjeron durante 10 días bajo 5 % de CO₂, 37 °C en incubadora y el medio se cambió cada dos días hasta el día 8. En el día 8, se añadió el ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes* enriquecido con RoxP) en el medio a 10 % v/v. En el día 9, las RHE se sometieron a estrés con ozono (en la cámara de reacción). El medio de reacción se enfrió a 5 °C durante la reacción con ozono (cerca de 1 minuto). Después del estrés, se

añadió un nuevo medio que contiene el ingrediente activo a RHE. En el día 10, se recuperaron RHE y medio y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.

Cada condición fue realizada por triplicado.

5 El ingrediente activo (sobrenadante de *C. acnes*) se esterilizó por filtración antes del uso en ensayos de cultivo celular.

Evaluación de morfología

10 La morfología se evaluó usando la coloración de eosina Hemalun.

Evaluación de la eficacia

15 Evaluación del daño de ADN - CPD (análisis de inmunofluorescencia): Para evaluar la foto-protección inducible producida por el ingrediente activo, se evaluó el daño de ADN usando inmunotinción de CPD. La radiación UVB (290-320 nm), el componente mutagénico y carcinogénico más energético de la radiación solar, es directamente absorbido por el ADN, dando lugar a fotoproductos diméricos entre bases de pirimidina adyacentes. Se producen dos tipos de estas modificaciones en volumen, a saber, dímeros de ciclobutanopirimidina (CPD) y fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona (Cadet *et al.* 2005 *Mutat Res* 571:3-17). Ambos de estos productos involucran la dimerización de pirimidinas adyacentes en la misma cadena de ADN. La relevancia de la formación de CPD se describe además en Sproul *et al.* 2014 *Photochem Photobiol* 90:145-154).

20 Evaluación del daño de ADN - 8-OHdG (análisis de inmunofluorescencia): En el ADN nuclear y mitocondrial, 8-hidrox-2-desoxiguanosina (8-OHdG) u 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) es una de las formas predominantes 25 de lesiones oxidativas inducidas por radicales libres, y por lo tanto se ha usado ampliamente como biomarcador para estrés oxidativo y carcinogénesis. La relevancia de este biomarcador por ejemplo se describe en Valavanidis *et al.* 2009 *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:120-39 y Nu *et al.* 1999 *Br J Dermatol* 140:226-31.

30 Evaluación del sistema de desintoxicación (análisis de GPx por kit colorimétrico): La glutationa peroxidasa (GPx) representa una familia de enzimas antioxidantes que contienen selenio con actividad de peroxidasa cuyo papel biológico principal es proteger al organismo de daño oxidativo. El GPx reduce eficazmente los peróxidos de H₂O₂ y lipídicos a agua y alcoholes lipídicos, respectivamente, y a su vez oxida la glutationa a glutationa disulfuro (Arthur JR. 2000 *Cell Mol Life Sci* 57:1825-1835). La importancia de la glutationa peroxidasa para la protección de estrés oxidativo 35 también se ilustra por el hecho de que la inactivación de la actividad de glutationa peroxidasa contribuye a la formación de carcinoma de células escamosas inducido por UV (Walshe *et al.* 2007 *Cancer Res* 67:4751-8). Los carcinomas de células escamosas cutáneas (CSCC) son una malignidad común de los queratinocitos que surge en sitios de la piel expuestos a excesiva radiación UV.

40 Evaluación de la apoptosis (Caspasa-3 por análisis de inmunofluorescencia): Las caspasas (proteasas específicas de cisteinil aspartato) son una familia de importantes moléculas de señalización con varias tareas dependiendo del subtipo y órgano involucrado. La caspasa 3 se ha implicado como una caspasa "efectora" asociada con el inicio de la "cascada de muerte" y es por lo tanto un marcador importante del punto de entrada de la célula en la trayectoria de señalización apoptótica. La caspasa-3 se activa por la caspasa-8 y caspasa-9 en dirección 5', y ya que sirve como un punto de convergencia para diferentes trayectorias de señalización, es muy conveniente como una lectura en un ensayo de apoptosis (Nicholson *et al.* 1995 *Nature* 376:37-43; Shi 2002 *Molecular Cell* 9:459-470).

Ejemplo 7: Evaluación de la morfología del efecto de RoxP en epidermis humanas reconstituidas estresadas con UV (RHEs)

50 Control negativo 1 (RHEs no estresadas sin sobrenadante de *C. acnes*): Las RHEs se diferenciaron completamente con cuatro capas (capa basal, espinosa, granular y cornificada). La capa basal es el compartimento proliferativo, pudieron observarse células columnares alineadas con núcleos elípticos ricos en cromatina; las células basales están unidas a la membrana de policarbonato. Los cuatro estratos de la capa espinosa mostraron células poligonales en las capas inferiores que se aplaron en las capas superiores. La capa de células granulares estaba formada por 2-3 estratos de células granulares aplastadas que contenían gránulos visibles de queratohialina. Véase la figura 15A.

55 Control negativo 2 (RHEs no estresadas con sobrenadante de *C. acnes* al 10 % v/v)

60 Las RHEs tratadas con el ingrediente activo al 10 % v/v en el medio parecieron más delgadas con la capa basal anormal y con un proceso de diferenciación defectuoso. De hecho, los queratinocitos basales no estuvieron bien alineados no mostraron una forma cúbica. Además, se observaron una disminución del número de gránulos de queratohialina y una paraqueratosis (retención de núcleos en el estrato córneo). Finalmente, en comparación con las RHEs no estresadas, se incrementó el número de células apoptóticas (células color anaranjado) en las RHEs tratadas con el ingrediente activo. Este fenotipo particular fue indicativo de algo de toxicidad del ingrediente activo a una concentración de 10 % v/v en el medio. Véase la figura 15B.

Control positivo 1 (RHEs estresadas con UV): Las RHE estresadas con UVA/UVB mostraron un fenotipo típico con las células quemadas por el sol. De hecho, la primera evidencia de apoptosis de queratinocitos inducida por UV fue la aparición de células quemadas por el sol en la epidermis. Las células quemadas por el sol características tienen forma redonda, pérdida de conexión con los queratinocitos circundantes combinados con una condensación típica de cromatina en el núcleo. La apoptosis es una respuesta protectora principal de la piel a la inducción de daño de ADN. Lleva a una muerte celular preventiva para evitar la acumulación de mutaciones en las células que se dividen con daño en su genoma, y así bloquea el inicio de la tumorigénesis. Las células más quemadas por el sol aparecieron en las capas basal y espinosa pero algunas se distinguieron en la capa granular. Todas las células de la capa basal parecieron estar en apoptosis que lleva a una ausencia de células proliferativas y a la muerte de la epidermis. Pudo apreciarse la disminución de gránulos de queratohialina también. La evidencia para la inducción de apoptosis fue también provista por la detección *in situ* de la caspasa-3 usando un anticuerpo dirigido contra la forma escindida y activa de la enzima (véase lo siguiente). Véase la figura 15C.

Prueba 1 (RHEs estresadas con UV, con sobrenadante de *C. acnes* al 10 % v/v): Las RHEs tratadas con ingrediente activo y estresadas con UVA/UVB mostraron un fenotipo menor en la capa espinosa pero el núcleo en la capa basal estuvo ausente o fue anormal. Aunque el total de los queratinocitos basales estuvieron en apoptosis, el número de células quemadas por el sol en las capas espinosas disminuyó. Por lo tanto, bajo estrés de UV, el número de células quemadas por el sol clásicas observadas en las capas basal y espinosa disminuyó en presencia de ingrediente activo. Véase la figura 15D.

Ejemplo 8: Evaluación del daño de ADN / CPD del efecto de RoxP en RHEs estresadas con UV

El tejido se procesó para detectar el nivel de dímeros de ciclobutanopirimidina (CPD) de secciones de parafina usando una detección fluorescente roja. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Las líneas discontinuas corresponden al inserto de membrana en el modelo RHE y a la unión dérmica epidérmica en la piel humana. La barra de escala en la figura 16 = 50 µm.

No se observó formación de dímeros en las RHEs no estresadas con (Figura 16B) o sin (Figura 16A) ingrediente activo. Bajo condiciones de UV, se formaron fotoproductos diméricos (CPD) en las capas nucleadas de las RHEs (Figura 16C, 16D). El ingrediente activo pareció disminuir el daño de ADN inducido por UV (Figura 16D, 16E).

Ejemplo 9: Evaluación del daño de ADN / 8-OHdG del efecto de RoxP en RHEs estresadas por UV

El tejido se procesó para detectar el nivel de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) de secciones de parafina usando una detección fluorescente roja. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Las líneas discontinuas corresponden al inserto de membrana en el modelo RHE y a la unión dérmica epidérmica en la piel humana. La barra de escala en la figura 17 = 50 µm.

Se detectó 8-OHdG en RHEs no estresadas sin ingrediente activo (Figura 17A, E). El ingrediente activo aumentó ligeramente la producción de 8-OHdG (Figura 17B, E) que confirmó la toxicidad limitada del ingrediente activo a la concentración elegida ya observada en la evaluación de morfología.

Bajo UV, todas las capas nucleadas mostraron daño de ADN con una fuerte formación de 8-OHdG (Figuras 17C-E). El ingrediente activo pareció tener un efecto protector con una disminución de la detección de 8-OHdG (Figuras 17D-E).

Ejemplo 10: Evaluación del sistema de desintoxicación (análisis de GPx)

La actividad de glutationa peroxidasa se determinó usando un kit colorimétrico de BioAssay Systems (Hayward, CA) (EGPX-100). Los resultados se establecen en la tabla 3 y la figura 18.

Tabla 3. Medición de la actividad de glutationa peroxidasa.

Condiciones	Actividad de GPX en el medio (U/I) Media ± SEM	Evolución contra control negativo 1 (%)
Control negativo 1		
RHEs no estresadas sin ingrediente activo	50,3 ± 1,9	/

Control negativo 2	$44,3 \pm 1,2$	-12
RHEs no estresadas con ingrediente activo		
Control positivo 1	0	-100
RHEs estresadas con UV		
Prueba 1		
RHEs estresadas con UV en contacto con el ingrediente activo	$40,0 \pm 1,5$	-20
Control positivo 2	$0,33 \pm 0,3$	-99
RHEs estresadas con ozono		
Prueba 2		
RHEs estresadas con ozono en contacto con el ingrediente activo	$32,7 \pm 0,7$	-35

Para ambos de estrés por UV y ozono, el ingrediente activo inhibió el efecto del estrés en la actividad de GPX.

Ejemplo 11: Evaluación de apoptosis (caspasa-3 activa)

El tejido se procesó para detectar el nivel de caspasa-3 activa de secciones de parafina usando una detección fluorescente roja. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Las líneas discontinuas corresponden al inserto de membrana en el modelo de RHE y a la unión dérmica epidérmica en la piel humana. La barra de escala en la figura 19 = 50 μ m.

Solo unas pocas células mostraron una inmunotinción de caspasa-3 activa en RHEs no estresadas sin ingrediente activo (Figura 19A, E barra n.º1). En presencia de ingrediente activo, la caspasa-3 se activó ligeramente indicando que el ingrediente activo indujo apoptosis en las RHEs (Figura 19B, E barra n.º2). La caspasa-3 se activó fuertemente bajo estrés por UV, de la capa basal a la capa espinosa mostrando células apoptóticas (Figura 19C, E barra n.º3). El ingrediente activo redujo la activación de la caspasa-3 en la capa basal (Figura 19D, E barra n.º4).

Ejemplo 12: Péptidos de RoxP con actividad antioxidante

Dos péptidos derivados de RoxP se sometieron a prueba para detectar la actividad antioxidante en un ensayo de catión de radical ABTS esencialmente como se describe en experimentos previos, y en un ensayo de capacidad de absorbancia de radical oxígeno (ORAC).

Los péptidos (denotados "péptido RoxP 1" y "péptido RoxP 2" en el presente documento) corresponden a las posiciones de aminoácidos 66-83 y 128-140 de la proteína RoxP nativa mostradas en SEQ ID NO: 1, y reproducidas a continuación con las posiciones de aminoácidos correspondientes al péptido RoxP 1 y péptido RoxP 2 indicados en letras negritas y *negritas + cursivas*, respectivamente:

M**FVQIAASLAAASSIALGIPGAATPIDESQLPVGPQSVTDSAQHTGPFAASSPLTITVKP**
GAPCVRADGYQESMVTRVLDDKGHQVWTGTFDESKLIGGTGLGTATFHVGS*PA**AAF*
NFHGSERTTYRTLSYCAYPHYVN*GTRERLSQSVVKTFMVDPALN* (SEQ ID NO: 1)

Las secuencias de los péptidos se establecen a continuación:

Péptido RoxP 1: VRADGYQESMVTRVLDDK (SEQ ID NO: 20),

Péptido RoxP 2: RTLSYCAYPHYVN (SEQ ID NO: 21).

La figura 20A y B demuestran que ambos péptidos presentaron actividad antioxidante en el ensayo de ABTS, que aumentó con la concentración de los péptidos.

Los ensayos de ORAC miden la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, tal como fluoresceína o beta-ficoeritrina, después de mezclarse con generadores de radicales libres, tales como compuestos iniciadores azo, tal como diclorhidrato de AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)). Los iniciadores azo típicamente producen radicales peroxilo con la descomposición térmica, lo que provoca la oxidación y de este modo el apagado de la fluorescencia de la molécula fluorescente. La adición de un antioxidante previene la degeneración oxidativa de la molécula

fluorescente, y el grado de esta protección puede cuantificarse por un fluorímetro. Ventajosamente, el radical libre de peroxilo se encuentra comúnmente en el cuerpo, lo que hace a los ensayos ORAC particularmente informativos de las propiedades antioxidantes de los compuestos de prueba *in vivo*.

- 5 En el presente ejemplo, el ensayo ORAC (Zenbio, número de orden AOX-2) se realizó como sigue:

La dilución de la muestra de RoxP se preparó en el tampón de ensayo provisto. Entonces todas las soluciones y máquinas se precalentaron a 37 °C y 150 µl de solución de trabajo de fluoresceína se añadieron a una placa negra de 10 96 pocillos con fondo transparente. Entonces 25 µl de las muestras se agregaron a los pocillos que contienen fluoresceína y la placa se colocó en una incubadora a 37 °C durante 10 minutos en la oscuridad. Entonces, se añadieron 25 µl de solución de AAPH recientemente preparada (diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida) y la placa se puso en un lector de placa. La lectura se realizó en modo fluorescente con excitación a 485 nm y emisión entre 528 y 538 nm. Las figuras 21A y B demuestran que ambos péptidos presentaron actividad antioxidante en el 15 ensayo ORAC, que aumentó con la concentración de los péptidos.

Ejemplo 13: RoxP inhibe la generación de radicales hidroxilo (•OH)

El ensayo de desoxiribosa es un método bien establecido para medir la generación de radicales hidroxilo en sistemas biológicos y para evaluar la capacidad de los antioxidantes de reducir la generación de radical •OH. Tales ensayos se describen por ejemplo en Gutteridge & Halliwell (Biochem J. 1988, vol. 253(3), 932-933) y las referencias en la misma. En particular, la desoxiribosa incubada con H₂O₂ y Fe²⁺ (o Fe³⁺ más un reductor) se degradó en productos que pueden reaccionar para formar el cromógeno de ácido tiobarbiturico-malondialdehido (ensayo clásico de TBA-MDA). Esta reacción es impulsada por los radicales •OH. Una reducción en la prevalencia de radicales •OH resultará en menos complejos formados y menor absorbancia.

Una mezcla de reacción que contiene 5 mM de 2-desoxiribosa, 100 µM de FeCl₃, 100 µM de EDTA, 1 mM de H₂O₂, y 7,6 µg/ml de ácido ascórbico en tampón A (20 mM de KH₂PO₄-KOH, pH 7,4), incluyendo o no 2 mg/ml de RoxP, por triplicado, se incubó a 37 °C durante 1 h (volumen total 1 ml). Después de la incubación, se añadieron 1 % p/v de TBA (ácido tiobarbiturico) en 50 mM de NaOH, y 2-8 % v/v TCA (ácido tricloroacético), seguido por incubación a 95 °C 30 durante 15 minutos, y la lectura de absorbancia a 532 nm.

La adición de RoxP redujo la absorbancia a 532 nm en el ensayo TBA-MDA, lo que indica su capacidad de disminuir la generación de radicales •OH (véase la figura 22).

Ejemplo 14: RoxP disminuye los niveles de hidroperóxido lipídico en plasma irradiado

La peroxidación lipídica, la degradación oxidativa de lípidos, resulta de la acción de radicales libres en lípidos. La peroxidación de lípidos en las membranas celulares puede resultar en daño celular.

40 Los hidroperóxidos reaccionan con iones Fe²⁺ para producir iones Fe³⁺ que se detectan usando ion tiocianato como cromógeno. La menor abundancia de iones Fe³⁺ resultó en la disminución de absorbancia, los que indica menor nivel de hidroperóxidos lipídicos en plasma irradiado.

45 La sangre se recogió en tubos de EDTA. Las muestras que contienen 500 µl de sangre + 150 µl de RoxP (300 µg de RoxP), o 500 µl de sangre + 150 µl de PBS, se sometieron a irradiación:

Irradiación UVA 3 x 5000 µJ/cm²; los tubos se hicieron rotar entre los pasos de irradiación; o

Irradiación UVB 1 x 9000 µJ/cm², 2 x 5000 µJ/cm².

50 Los controles que tienen composición idéntica a las muestras, pero no irradiados, se incluyeron en el experimento.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 x g, el plasma se recogió y congeló a -80 °C. Los hidroperóxidos lipídicos se cuantificaron usando kit de ensayo de hidroperóxido lipídico (Cayman Chemical, nº. de artículo 705002).

55 La adición de RoxP a plasma (tanto irradiado como no irradiado) resultó en niveles reducidos de hidroperóxido lipídico (véase la figura 23).

Ejemplo 15: RoxP reduce Fe³⁺

60 La fenantrolina quela específicamente Fe²⁺ y genera absorbancia a 550 nm. Por lo tanto, a más Fe²⁺ presente en una muestra, mayor la absorbancia a 550 nm.

65 Una mezcla de reacción que contiene 0,7 mM de sulfato de amonio y hierro (II) hexahidratado (de 1,4 mM de solución de trabajo en PBS) o 0,5 mM de sulfato de amonio y hierro (III) dodecahidratado (de 1,0 mM de solución de trabajo en

PBS); y que contiene además 10 µg o 20 µg de RoxP (de 2 mg/ml de solución de trabajo de RoxP en PBS) o volumen equivalente de PBS como control; y que contiene además 0,75 mM de fenantrolina (de 5 mM de solución de trabajo en PBS); volumen total de 200 µl; se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 550 nm.

5 La adición de RoxP redujo Fe³⁺ a Fe²⁺ y generó alta absorbancia, aunque no afectó a la reacción cuando solo estuvo presente el Fe²⁺ (véase la figura 24).

10 Estos resultados se corroboraron usando el ensayo de ferrozina, que confirmó la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ por RoxP (véase la figura 25). Los reactivos usados en el ensayo de ferrozina incluyeron 100 µl de 50 mM de hierro y amonio dodecahidratado, 100 µl de 2 mM de ferrozina en H₂O, y RoxP (50 µl) dando como resultado varias concentraciones de RoxP indicadas en el gráfico, diluidas de una solución de reserva de 2 mg/ml de RoxP en PBS. La Incubación fue incubación de 17 horas.

15 Ejemplo 16: Interacción de RoxP con coproporfirina III

1 mg/ml de RoxP (100 µl) se mezcló con 50 µg de coproporfirina (10 µl) y el volumen total se ajustó a 290 µl con PBS. La absorbancia se midió a diferentes longitudes de onda. Las curvas de absorbancia indican la unión de coproporfirina III por RoxP (véase la figura 26).

20 Ejemplo 17: Efectos de FMN/FDN sobre RoxP en reacción con ABTS

Se midió el efecto de flavina mononucleótido (FMN)/flavina adenina dinucleótido (FDN) sobre la actividad de RoxP en el ensayo de ABTS. Los componentes de la reacción incluyeron ABTS (oxidado de acuerdo con el protocolo), 20 x en PBS, precalentado a 37° C, 89 µl añadidos; RoxP, 2 mg/ml, 10 µl; FMN/FDN 1 mM, 1 µl o 3 µl ("1FMN", "1FDN" o "3FMN", "3FDN" en el gráfico, respectivamente); el volumen total se ajustó a 100 µl con PBS. Los resultados mostraron un aumento en la reducción del radical ABTS por RoxP cuando se agregó FMN/FDN, especialmente FDN. (Véase la figura 27).

30 Ejemplo 18: RoxP inhibe la generación de radicales formados a través de porfirinas

El sebo de seres humanos normales contiene altas cantidades de porfirinas que están implicadas en la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) en la piel. La cantidad de porfirinas puede visualizarse fácilmente por luz UV o fotografía de fluorescencia.

35 El tinte verde de sensor de oxígeno singlete se disolvió en metanol y se añadió en tampón de PBS para alcanzar una concentración final de 0,4 µM. Esta solución se distribuyó en una placa transparente de 96 pocillos. A los pocillos se les añadió 1 µM de coproporfirina III, o 1 µM de protoporfirina IX. Entonces se añadieron cantidades variables de RoxP. Cada condición se estableció como 4 réplicas. Dos de las réplicas se cubrieron con papel de aluminio durante la exposición, aunque dos pocillos se expusieron durante 10 min a una lámpara de UV. Después de la exposición, la fluorescencia del tinte verde de sensor de oxígeno singlete se leyó indicando la cantidad de oxígeno singlete generada.

40 El RoxP inhibió eficientemente la generación de radicales formados a través de las porfirinas (véase la figura 32) y puede así ser una manera preferencial de reducir el daño provocado por la generación de oxígeno singlete inducida por UV.

45 Ejemplo 19: RoxP mostró potencial antioxidante cuando se administró a sujetos humanos en un estudio de irradiación de UVA/UVB

50 El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de protección de UV de tres composiciones que contienen RoxP en 7 sujetos sanos al medir el efecto antioxidant y el eritema de la piel. El estrés oxidativo fue inducido por exposición a luz UVA y UVB a la piel en la espalda superior. La actividad antioxidante de los productos de prueba se evaluó por medición de los niveles de oxidación de lípido de sebo (concentración de monohidroperóxido de escualeno) de muestras hisopadas de la superficie de la piel. El potencial se evaluó después de dos aplicaciones de RoxP en comparación con agua, un control sin tratar y un antioxidante hidrófilo estándar (H1) después de la inducción de una quemadura con luz solar (1,25 MED). Kits de muestreo específico (Synelvia) se usaron para obtener muestras de lípido para análisis. Además, el potencial de protección UV de los productos se evaluó al medir el eritema producido (cromámetro).

55 Los productos sometidos a prueba fueron como sigue: sin tratar ("UT"); agua desmineralizada ("agua"); antioxidante H1, un catecol hidrófilo natural 1 % en agua (control positivo) ("H1"); 0,3 mM ("EC-AA-001"), 1,2 mM ("YE-LU-001") o 4,0 mM ("CA-FT-001") de proteína RoxP de longitud completa en una solución acuosa. Las muestras se proporcionaron como soluciones y se almacenaron a temperatura ambiente. Para toda referencia el control de agua se usó a medida que las muestras se aplicaron como una solución acuosa.

65

El estudio se diseñó como aleatorizado, doble ciego, para análisis de lípidos de sebo, con comparaciones intra-individuales, y controlado con placebo.

- 5 El eritema se evaluó (cromámetro) a t1 = valor de referencia antes de la irradiación, t2 = 30 a 50 minutos después de la irradiación, y t3 = 16 a 24 horas después de la irradiación. El monohidroperóxido de escualeno (SQOOH) se cuantificó a 25 a 45 minutos después de la irradiación.
- 10 El área de prueba general fue la espalda superior. Las áreas de tratamiento tuvieron un tamaño de 4,5 cm x 4,5 cm. Las áreas de irradiación tuvieron un tamaño de 4 cm x 4 cm. El área de hisopado redonda tuvo un diámetro de aprox. 2,6 cm. Los números de las áreas de prueba se asignaron comenzando en el lado superior izquierdo de la espalda hacia el lado superior derecho de la espalda construyendo una fila (área 1 a 4). Una segunda fila comenzó bajo la primera fila en el lado izquierdo (área 5 y 6). Dos áreas se irradiaron siempre juntas (por ejemplo el área 1 y 3, 2 y 4, 5 y 6). Véase la figura 28. Los tratamientos se asignaron balanceados a las áreas de prueba de acuerdo con cuadrados latinos ortogonales de 6 x 6 con bloques permutados aleatoriamente de tamaño fijo.
- 15 15 Se aplicaron 45 µl (aprox. 2 mg/cm²) de la respectiva solución de prueba con una pipeta. Después de aplicar el producto de prueba al área de prueba, se dispersaron rápidamente por frotado suave (tacto suave con ligera presión) con un dedal no saturado, primero con rotación seguido por movimientos en sección transversal para un revestimiento uniforme final en la piel.
- 20 20 Se aplicaron criterios de inclusión y exclusión adecuados. Los sujetos incluyeron tanto masculinos como femeninos, al menos de 18 años de edad, con piel sana en el área de prueba, color de piel uniforme y sin eritema o pigmentación oscura en el área de prueba, e ITA>28 en el área de prueba. Los sujetos con, por ejemplo, enfermedad de piel activa en el área de prueba, uso reciente regular de camas de bronceado, lunares, tatuajes, cicatrices, piel irritada, vello, etc. en el área de prueba que pudieran influir en la investigación, uso reciente de medicamento con potencial conocido foto-tóxico y/o foto-sensibilizante, uso reciente de cualquier medicación tópica en el área de prueba, y/o toma de suplementos dietéticos con efectos antioxidantes, se excluyeron del estudio. Se instruyó a los sujetos a que evitaran factores que pudieran influir en la investigación a través de toda la duración del estudio.
- 25 30 El día 1, antes de las mediciones instrumentales, los sujetos se tendieron sobre su estómago al menos durante 15 minutos en el área de espera a temperatura ambiente para permitir a la piel secar en caso de sudoración. El tipo de piel (ITA°) de los sujetos se clasificó mediante el uso de mediciones colorimétricas de la piel. Después de que se irradiaran 6 puntos de aprox. 1 cm x 1 cm en la espalda (separados de las áreas de tratamiento) para detectar la dosis mínima de eritema (MED). La dosis de UV-B se aumentó de punto a punto por un incremento de 25 %.
- 35 35 Entonces, los productos de estudio se aplicaron de acuerdo con el esquema de aleatorización por un técnico. Para evitar la absorción de los productos de prueba por la ropa, los sujetos permanecieron sin vestir a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.
- 40 40 En el día 2, los sujetos regresaron al sitio del estudio 20 ± 4 horas después de la irradiación. Antes de las mediciones instrumentales los sujetos se tendieron sobre sus estómagos al menos durante 15 minutos en el área de espera a temperatura ambiente para permitir a la piel secar en caso de sudoración. La lectura del MED se realizó y el tiempo de irradiación para 1 MED se determinó. La dosis correcta para la irradiación de las áreas de prueba se calculó al multiplicar la dosis de irradiación de 1 MED con el factor para irradiación (1,25).
- 45 50 Las mediciones de cromámetro se realizaron en todas áreas de prueba (valor de referencia) para evaluar el eritema. Los productos de estudio se aplicaron de acuerdo con el esquema de aleatorización. Para evitar la absorción de los productos de prueba por la ropa, los sujetos permanecieron sin vestir a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. 45 min ± 5 min después de la aplicación, cada área de tratamiento se irradió con 1,25 MED. 25 a 45 min después de la irradiación, se realizó el hisopado en todas las áreas de tratamiento de acuerdo con el método de hisopado y se analizaron como se describe por Synelvia (apéndice 2). 5 a 10 minutos después del hisopado, se repitieron las mediciones en el cromámetro.
- 55 55 El día 3 los sujetos regresaron al sitio del estudio 20 ± 4 horas después de la irradiación. Antes de las mediciones instrumentales los sujetos se tendieron sobre sus estómagos al menos durante 15 minutos en el área de espera a temperatura ambiente para permitir a la piel secar en caso de sudoración. Las mediciones de cromámetro se repitieron en todas las áreas de prueba.
- 60 60 Se realizaron las siguientes mediciones instrumentales:
- 65 - Cromámetro CR 400 (Minolta, Dispositivo D-Langenhangen, Alemania): El color de la piel se puede cuantificar objetivamente por mediciones de reflectancia con un cromámetro triestímulo. El principio de medición se basa en la reflexión de un destello de xenón que ilumina difusamente la piel en un área de 8 mm de diámetro. La luz reflejada verticalmente de la piel es entonces detectada por fotodiodos de sílice de alta sensibilidad que proporcionan un análisis de color de la luz detectada. El cromámetro define el color medido en el sistema de coordenadas de color L*a*b*. El valor L* define la brillantez. El color se define por los parámetros a* (eje rojo-

5 verde; valor a* negativo verde, valor a* positivo rojo) y b* (eje azul-amarillo, valor b* negativo azul, valor b* positivo amarillo). El valor de a* se correlaciona bien con las evaluaciones visuales del enrojecimiento de la piel (eritema). a* es una medida para eritema. Un aumento en el valor de a* corresponde a un aumento en el grado de enrojecimiento de la piel. Parámetro: a* enrojecimiento de la piel. 3 mediciones por área de prueba y tiempo de evaluación para las evaluaciones o eritema.

Se realizaron los siguientes métodos de investigación:

10 - Irradiación de UV (simulador solar UVASPORT 1000, Dr. Höhne AG, Gräfelfing, Alemania).

15 - Las irradiaciones se realizaron con el UVA Spot 1000. Produce un campo grande, homogéneo de irradiación (aproximadamente 20 cm x 20 cm a distancia de 50 cm de la fuente de radiación). El espectro está definido por filtros específicos. Se usó el filtro "H2" (radiación UVB y UVA). El simulador de sol se usó para irradiar las áreas de prueba con la intensidad de irradiación solicitada en el área de prueba. Múltiples puntos pueden haberse irradiado al mismo tiempo. El simulador de sol irradia un área de aprox. 20 cm x 20 cm. 1 irradiación por área de prueba.

20 - Muestreo por hisopado, almacenamiento y envío. El muestreo por hisopado se realizó en cada área de prueba por un técnico entrenado. Hisopos de algodón se humedecieron con tampón de muestreo y se toma un primer hisopado al aplicar presión por 45 segundos durante movimientos regulares del hisopo sobre toda el área de prueba. El hisopo se cortó con tijeras, de modo que se ajusta en el tubo Eppendorf proporcionado que contiene un tampón. El procedimiento se repitió en la misma área de prueba con un segundo hisopo humedecido con tampón. El segundo hisopo se almacenó en el mismo tubo Eppendorf que el primer hisopo. Los tubos Eppendorf que contienen dos hisopos por área de prueba se almacenaron directamente en hielo después del muestreo y se pusieron en un congelador a -20 °C dentro de las 2 horas después del muestreo y se almacenaron a -20 °C hasta el envío. El envío de las muestras se realizó en hielo seco con un servicio de mensajería apropiado después del final del estudio (el siguiente día laboral). 1 hisopo por área de prueba.

25 - Análisis de muestreo de hisopado. El análisis de las muestras del hisopo para determinar el contenido del producto de peroxidación de lípido de sebo monohidroperóxido de escualeno (SQOOH) se realizó por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS).

30 El investigador decidió cuáles desviaciones de protocolo que ocurrieron en el estudio se consideraron menores y mayores antes de que se analizaran los datos. Los sujetos válidos se definieron en los sujetos incluidos quienes terminaron en estudio sin desviaciones mayores del protocolo y quienes no retiraron su consentimiento. No se realizó reemplazo de datos faltantes y las evaluaciones afectadas fueron consideradas como perdidas para análisis. Las variables demográficas (edad, género) se dieron para la población de análisis. No fue necesario quitar el ciego para el análisis de los datos, porque el análisis estadístico se realizó usando los códigos de tratamiento. La desaleatorización pudo haberse realizado al combinar datos a la lista de aleatorización usando una variable de identificador único. Los datos sin procesar (contenido de escualeno (ng/mg) y valores a* de cromámetro) se enumeraron por tiempo de evaluación y tratamiento. Para los valores de cromámetro, se calcularon las diferencias con el valor de referencia (antes de irradiación) y se enumeraron por tiempo de evaluación y tratamiento. N, media, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo se proporcionaron para datos sin procesar y diferencias del valor de referencia. Los valores medios de los datos sin procesar y las diferencias del valor de referencia sobre los sujetos se presentan en diagramas de barras por tiempo de tratamiento y evaluación con desviación estándar.

35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035

absorbido más luz por la piel llevando a mayores niveles de oxidación. Las áreas irradiadas tratadas con el control positivo "H1" mostraron valores muy bajos para SQOOH, como se esperaba. Los tres productos de prueba dieron como resultado la disminución de valores en SQOOH: el producto de prueba EC-AA-001 mostró la eficacia antioxidante más baja, seguido por YE-LU-001 y el producto de prueba CA-FT-001 mostró la tendencia más alta para una eficacia antioxidante. Esta diferencia en la eficacia del producto coincidió con las concentraciones de antioxidantes. La diferencia entre el producto de prueba CA-FT-001 y el control de agua fue estadísticamente significativa con un valor $p < 0,05$.

La irradiación con 1,25 MED dio como resultado un aumento de la media de color de la piel a* sobre todos los sujetos durante 24 horas, por lo tanto dio como resultado un ligero eritema. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los productos sometidos a prueba y los controles; sin embargo se vio una clara tendencia para la reducción de eritema en todos los antioxidantes sometidos a prueba y el tamaño del efecto fue igual entre todos los antioxidantes. Aunque el control de agua aumentó por una mediana de 6 unidades los campos tratados con RoxP solo aumentaron por una mediana de 3,4 unidades que coincide con el aumento del control H1 de la mediana de 3,5 unidades. Debido a la alta desviación estándar, no se pudo observar una significancia estadística en este tamaño de muestra. Especialmente en la medición 30-50 min después de la irradiación UV, los campos tratados con RoxP mostraron menor eritema que el control de agua e igual o menor eritema que el control positivo.

El presente estudio así mostró, en configuraciones cosméticamente y terapéuticamente relevantes, es decir, en la piel de sujetos humanos reales, que RoxP mostró un efecto antioxidante importante e incluso estadísticamente significativo después de irradiación UV de la piel, y que el efecto antioxidante aumentó con el aumento de la concentración del RoxP administrado.

Ejemplo 20: Composiciones

Composición de leche corporal	% en peso
Cloruro de magnesio	3
Ascorbato de calcio	3
Estearato de glicerilo	1
Sinnowax AO® (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Alemania) (alcohol cetearílico (y) Ceteareth-30) o alcoholes grasos similares	3
Alcohol cetílico	1
Dimeticona (DC 200 Fluid®, vendido por Dow Corning, Midland, MI)	1
Vaselina líquida	6
Miristato de isopropilo (Estol IMP 1514®, vendido por Uniqema, Goole, Reino Unido)	3
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP/sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	0,005-0,3
Vitamina C y E (formas estabilizadas)	0,05
Glicerol	20
Conservante	0,3
Agua	Llenar hasta el 100 %

Loción para el cuerpo / composición de cuero cabelludo	% en peso
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP /sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	0,005-0,3

30

Loción para el cuerpo / composición de cuero cabelludo	% en peso
Antioxidante	0,05
Isopropanol	40
Conservante	0,3
Agua	Llenar hasta el 100 %

Leche para el cuidado del cuerpo / composición de cuero cabelludo	% en peso
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP /sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	0,001-1
Estearato de glicerilo	1
Sinnowax AO® (BASF) o alcoholes grasos similares	3
Alcohol cetílico	1
Dimeticona (DC 200 Fluid® vendido por Dow Corning)	1
Vaselina líquida	6
Miristrato de isopropilo	3
Antioxidantes	0,05
Conservante	0,3
Agua	Llenar hasta el 100 %

Gel para el cuidado del cuerpo / composición de cuero cabelludo	% en peso o molar
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP/sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	2 µM-2 mM de RoxP
Hidroxipropilcelulosa	1
Vitamina E o derivado	2,5
Antioxidante	0,05
Isopropanol	40
Conservante	0,3
Agua	Llenar hasta el 100 %

Composición en gel para el cuidado del cabello	% en peso o molar
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP/sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	2 µM-2 mM de RoxP
Citrato de cobre	2

Composición en gel para el cuidado del cabello	% en peso o molar
Antioxidante	0,05
Vitamina C	2,5
Isopropanol	40
Conservante	0,3
Aqua	Llenar hasta el 100 %

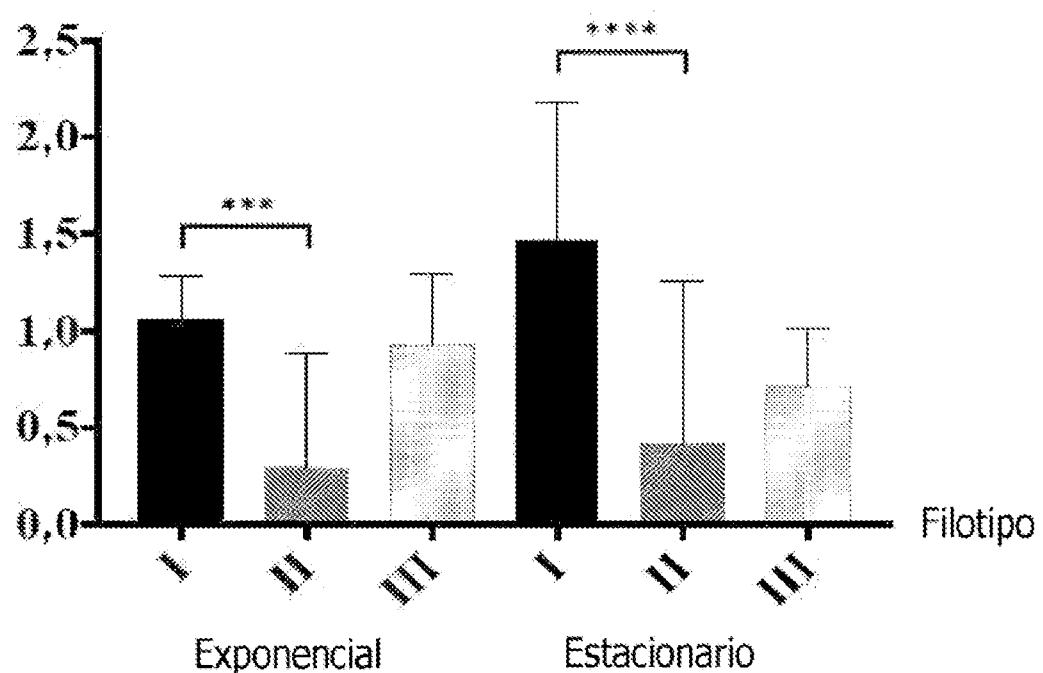
Composición de loción para la cara	% en peso o molar
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP/sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	2 µM-2 mM
Antiinflamatorio	0,05
Antioxidante	0,05
Isopropanol	40
Conservante	0,3
Aqua	Llenar hasta el 100 %

Composición tópica	Cantidad
Ingrediente activo (por ejemplo, preparación de RoxP/sobrenadante de <i>C. acnes</i> enriquecido con RoxP)	5 mg
Poloxámero 188	10 g
Paraoxibenzoato de metilo	200 mg
Hidrogenofosfato de disodio	340,23 mg
Cloruro de sodio	832,77 mg
Ácido fosfórico	Para ajustar el pH
Aqua purificada	Llenar hasta 100 ml
Total	100 ml

Formulaciones para la reconstitución de bacterias liofilizadas de <i>C. acnes</i>			
Ingredientes (p/v)	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Carragenina	0,2 %	-	-
Citrato	0,17 %	0,17 %	0,17 %
Glicerol	-	5 %	1 %
Hialuronato	-	1 %	-
Ácido poliacrílico	-	-	0,2 %
Ácido cítrico	0,09 %	0,09 %	0,09 %
Aqua	Llenar hasta 100 %	Llenar hasta 100 %	Llenar hasta 100 %

REIVINDICACIONES

1. Un uso cosmético de una composición que comprende una cepa viva de *Cutibacterium acnes* que secreta RoxP (radical oxigenasa de *Propionibacterium acnes*) para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto.
2. Una composición que comprende una cepa viva de *C. acnes* que secreta RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).
3. El uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde:
 - la cepa de *C. acnes* secreta RoxP endógenamente;
 - la cepa de *C. acnes* no está diseñada genéticamente;
 - la composición comprende dos o más cepas de *C. acnes* que secretan RoxP;
 - la cepa de *C. acnes* secreta, o las dos o más cepas de *C. acnes* secretan individual o colectivamente, al menos 1 µg de RoxP por ml de medio cuando se mide en fase estacionaria;
 - el promotor de RoxP endógeno de la cepa de *C. acnes*, o de al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes*, comprende la caja -10 que tiene una secuencia seleccionada de TGCTATACT o TGCTACACT, preferiblemente TGCTATACT, y/o la caja -35 que tiene una secuencia seleccionada de ACTTCGAT o ACTTCAAT;
 - la cepa de *C. acnes* es, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* es cada una independientemente, de tipo I, II o III, preferiblemente de tipo IA, IB o III; y/o
 - la cepa de *C. acnes* es, o al menos una de las dos o más cepas de *C. acnes* es cada una independientemente, de tipo SLST A, C, G, H, L o K.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en donde
 - la cepa de *C. acnes* está, o las dos o más cepas de *C. acnes* están individual o colectivamente, presente(s) en la composición en una cantidad de al menos 100 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de la composición; y/o
 - la composición está configurada para administración tópica a la piel, tal como en donde la composición es un gel, crema, pomada, loción, gotas, rociador incluyendo rociadores de aerosol, espuma o polvo, opcionalmente en donde la composición está compuesta por una máscara, almohadilla, parche, un dispositivo de dos cámaras, o maquillaje.
5. Un uso cosmético de una composición que comprende RoxP para la prevención o reducción del envejecimiento de la piel en un sujeto.
6. Una composición que comprende RoxP para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo, en donde la enfermedad de la piel asociada a estrés oxidativo se selecciona del grupo que comprende queratosis actínica (AK) y carcinoma de células basales (BCC).
7. El uso según la reivindicación 5 o la composición para su uso según la reivindicación 6, en donde:
 - la composición comprende sobrenadante o una fracción de sobrenadante enriquecida con RoxP de una cepa cultivada viva de *C. acnes* que secreta RoxP, preferiblemente que secreta endógenamente RoxP;
 - la composición comprende al menos 1×10^{-9} M de RoxP; y/o
 - la composición está configurada para administración tópica a la piel, tal como en donde la composición es un gel, crema, pomada, loción, gotas, rociador incluyendo rociadores de aerosol, espuma, o polvo, opcionalmente en donde la composición está compuesta por una máscara, almohadilla, parche, un dispositivo de dos cámaras, o maquillaje.

FIG. 1Veces de cambio, *roxP*

ES 2 994 459 T3

FIG. 2

A

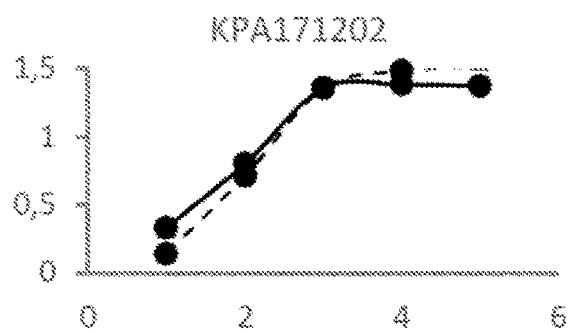
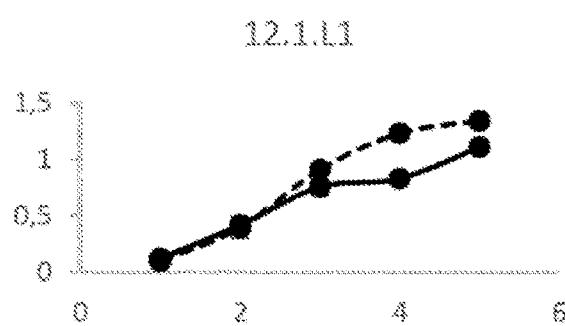
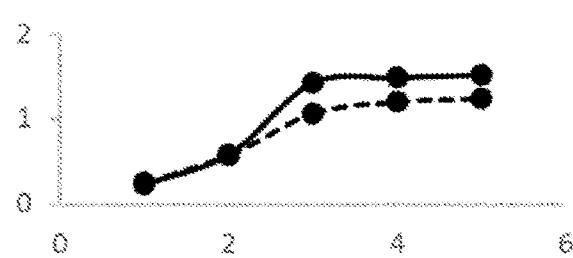
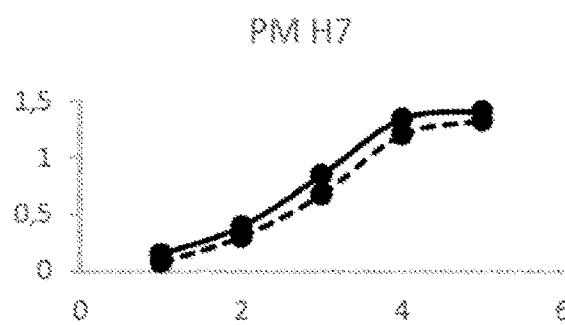
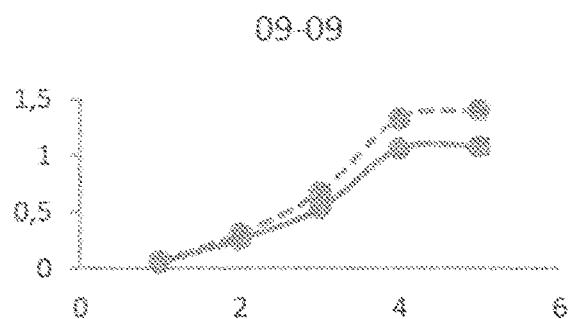
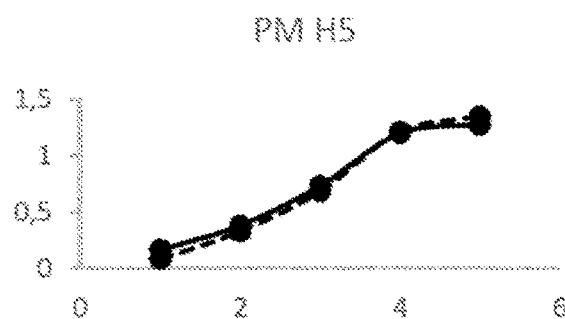
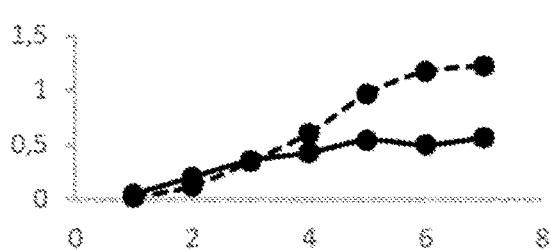
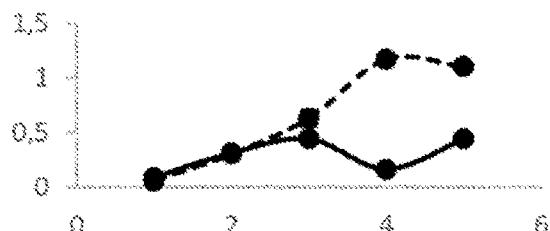


FIG. 2 (Cont.)**B**

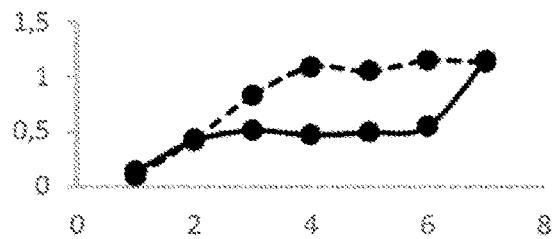
15.1.R1



09-23



266



21.1.L1

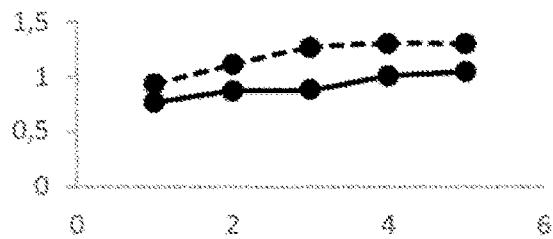
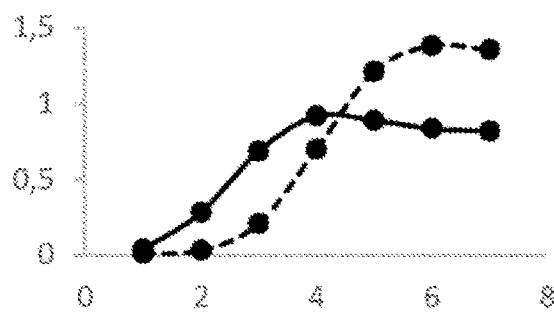
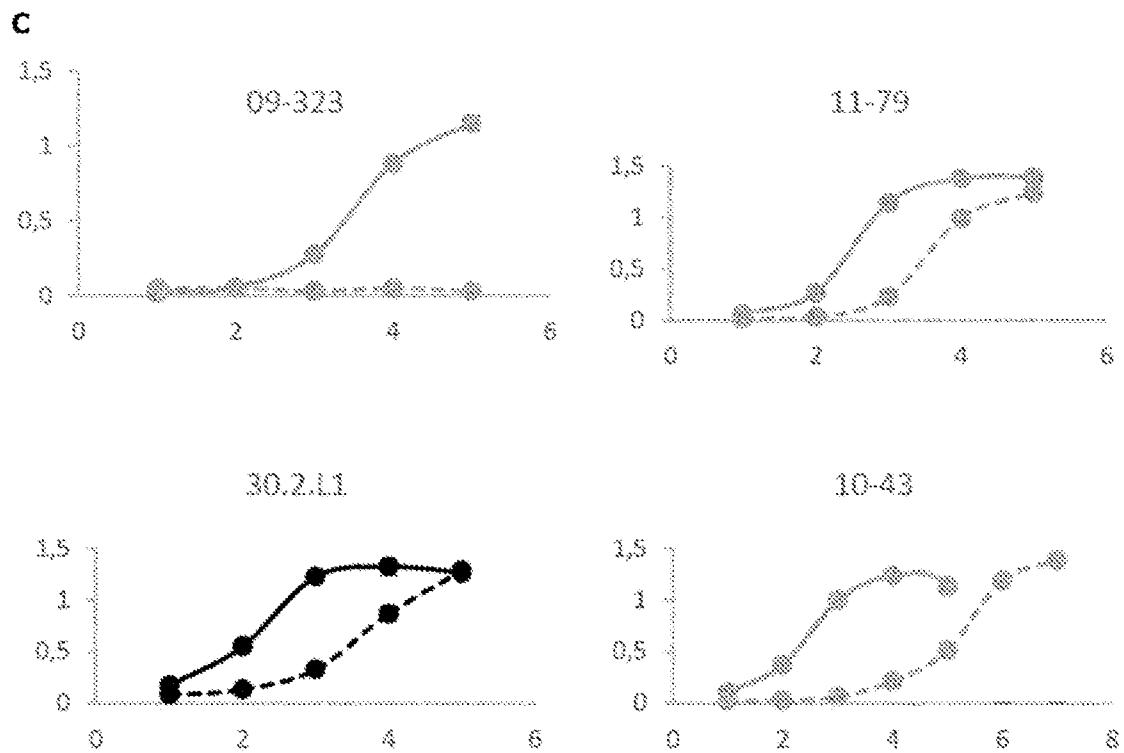
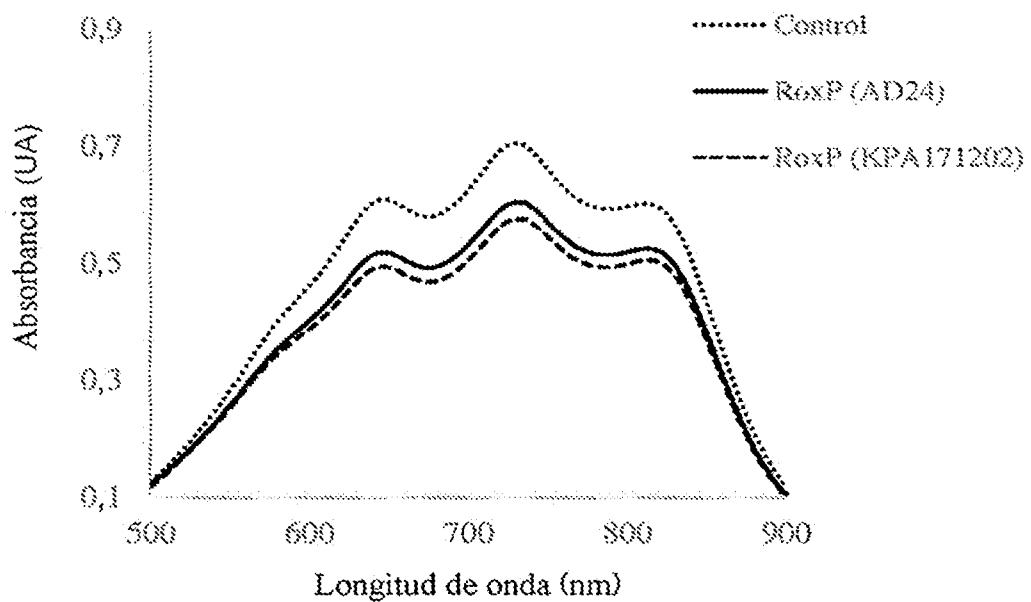
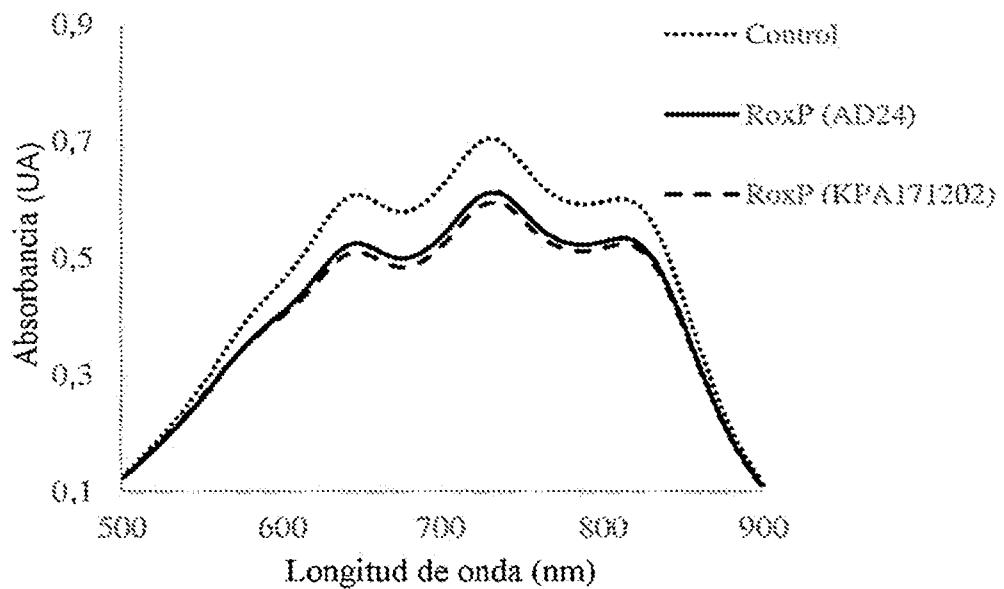
*dRoxP*

FIG. 2 (Cont.)

(A)

FIG. 3

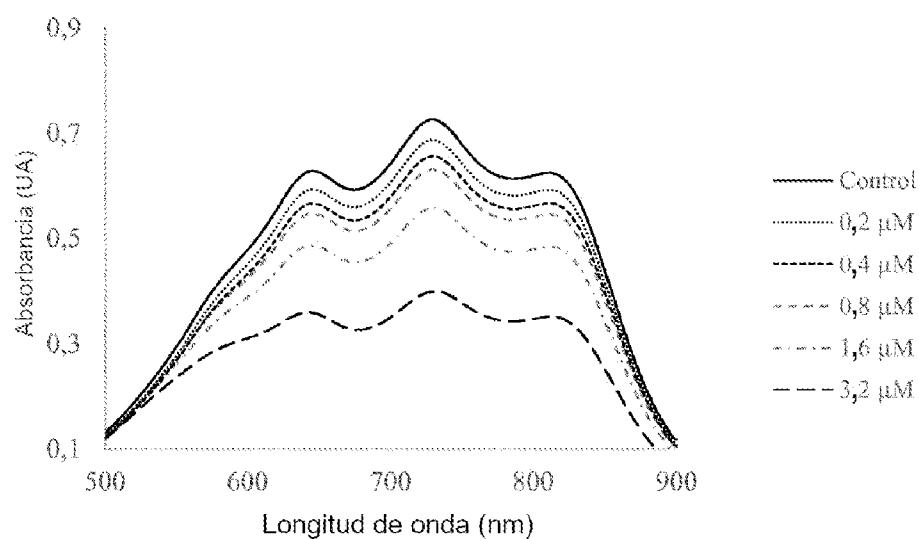
(B)



ES 2 994 459 T3

FIG. 4

A



B

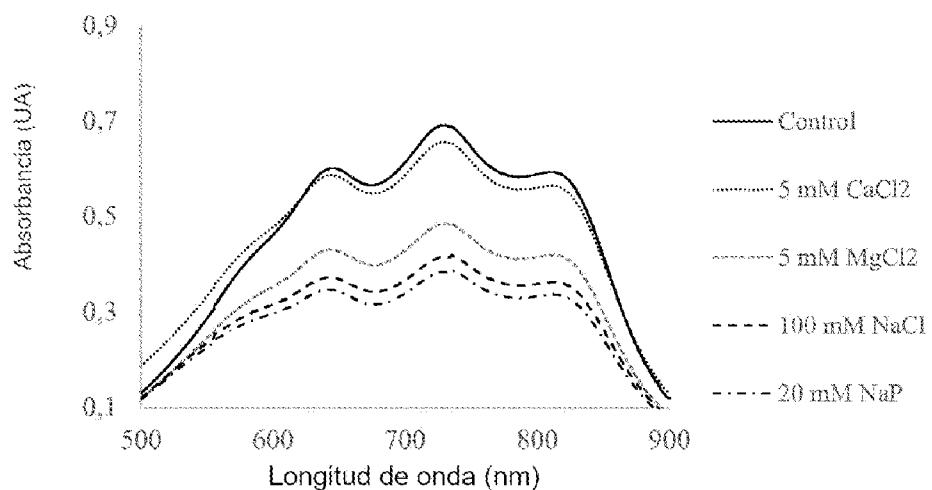


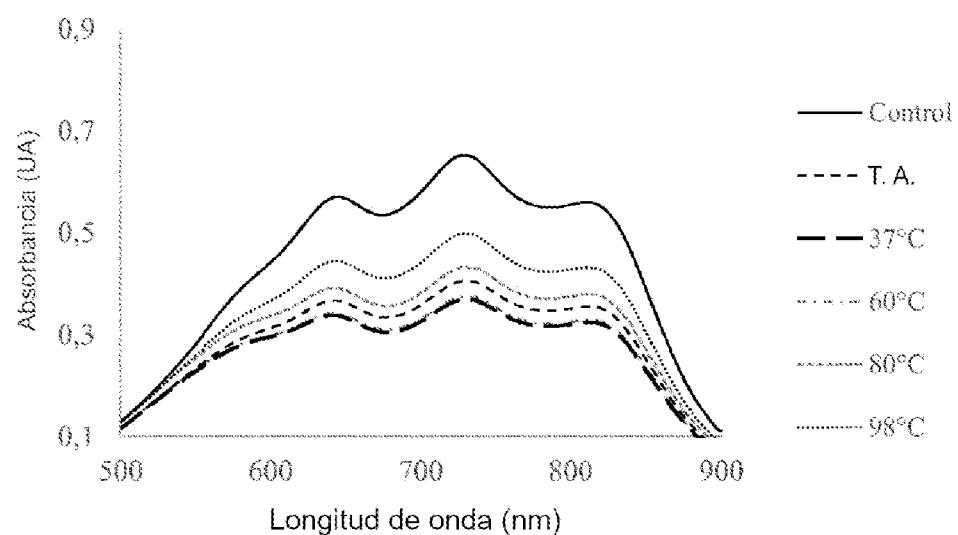
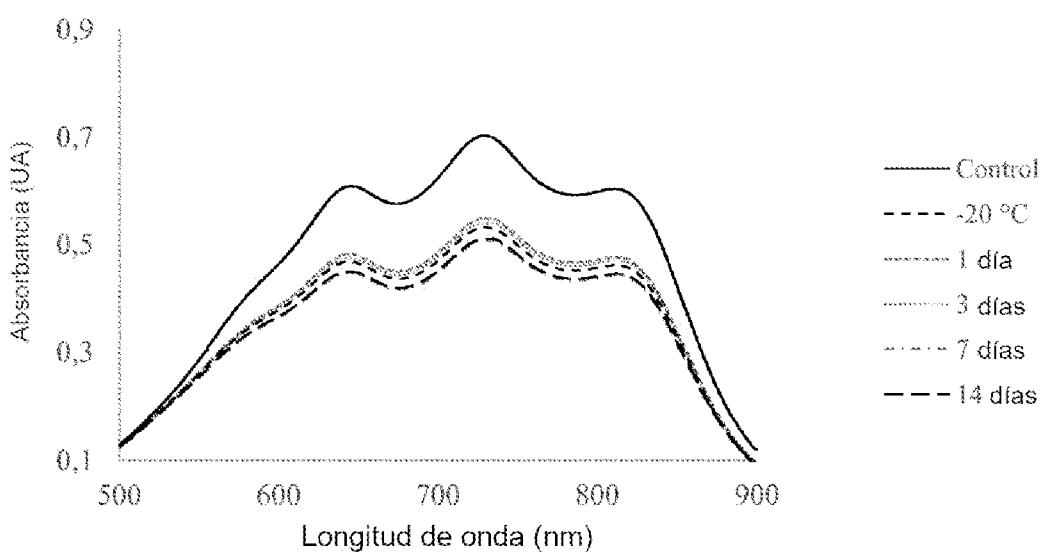
FIG. 4 (Cont.)**C****D**

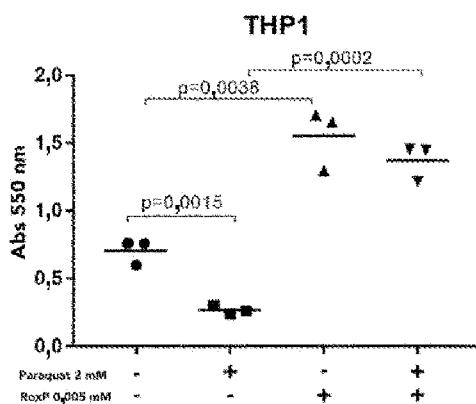
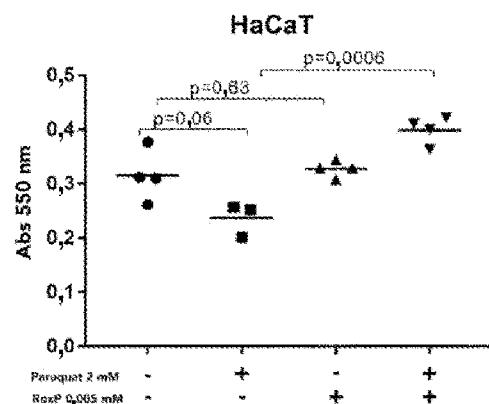
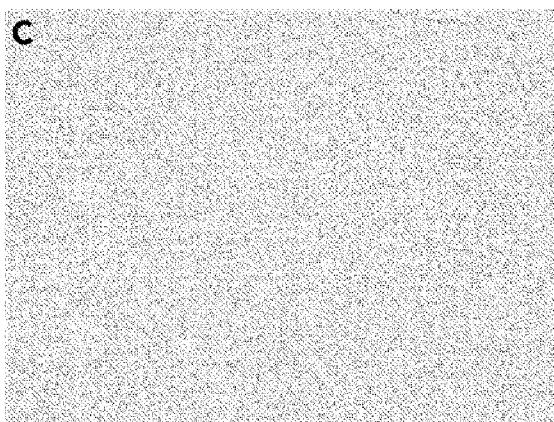
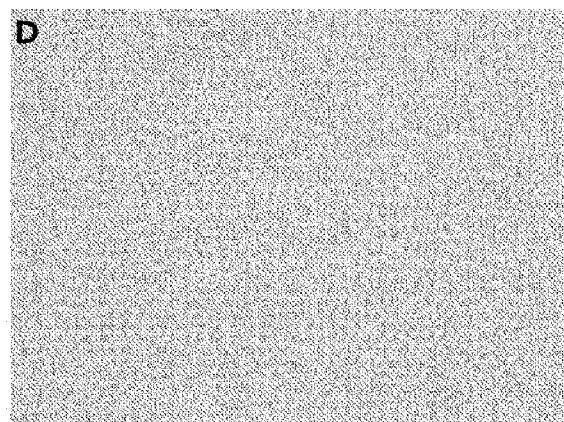
FIG. 5**A****B****C****D**

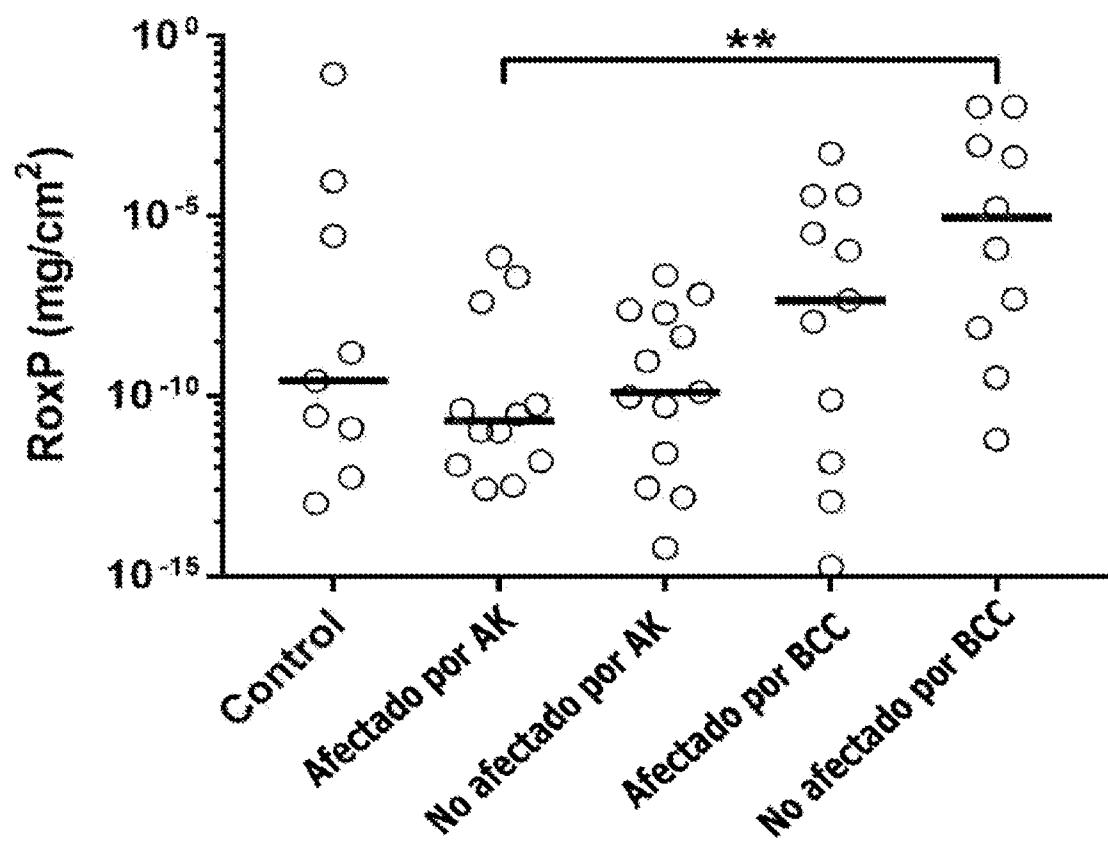
FIG. 6

FIG. 7

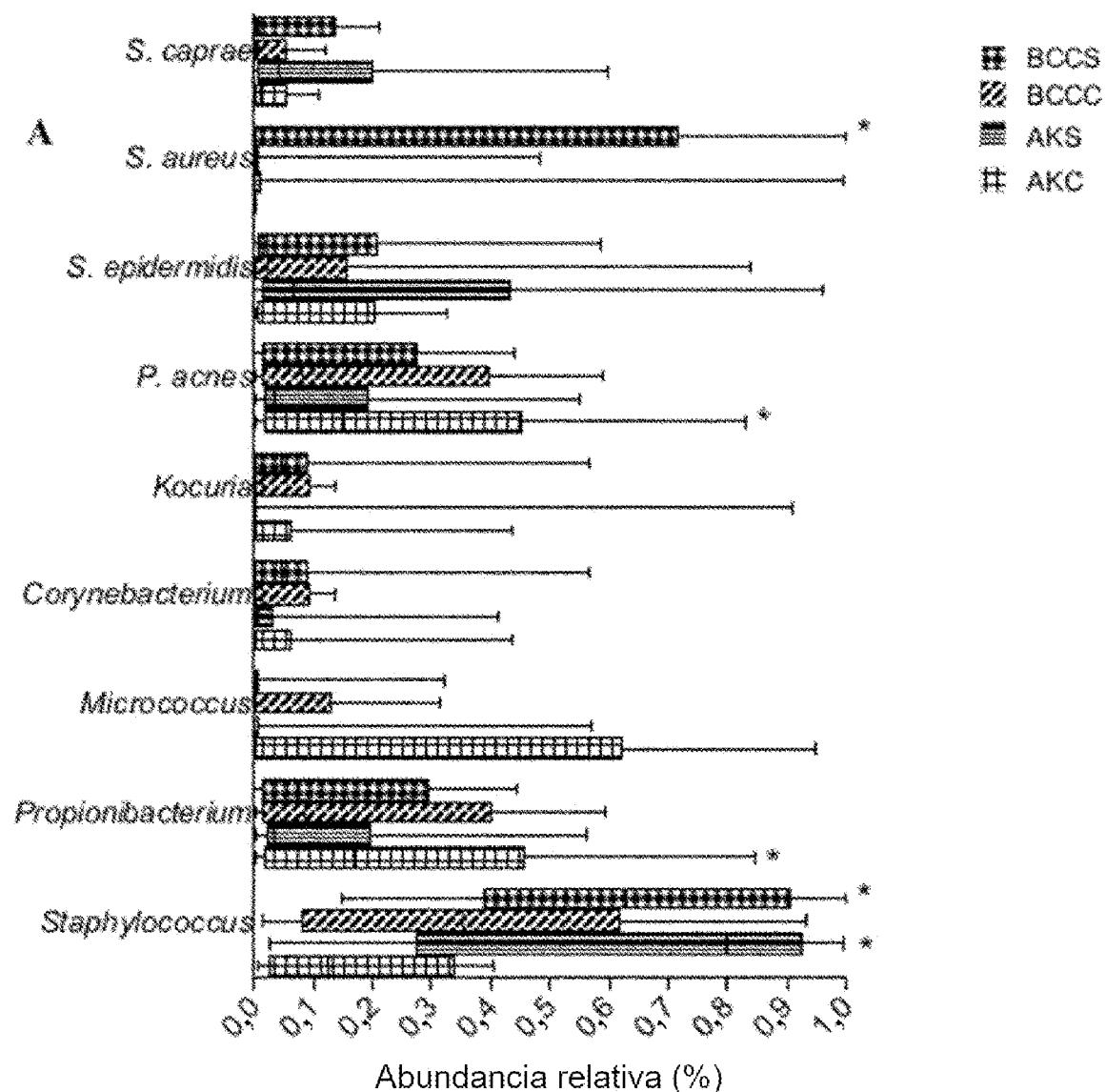


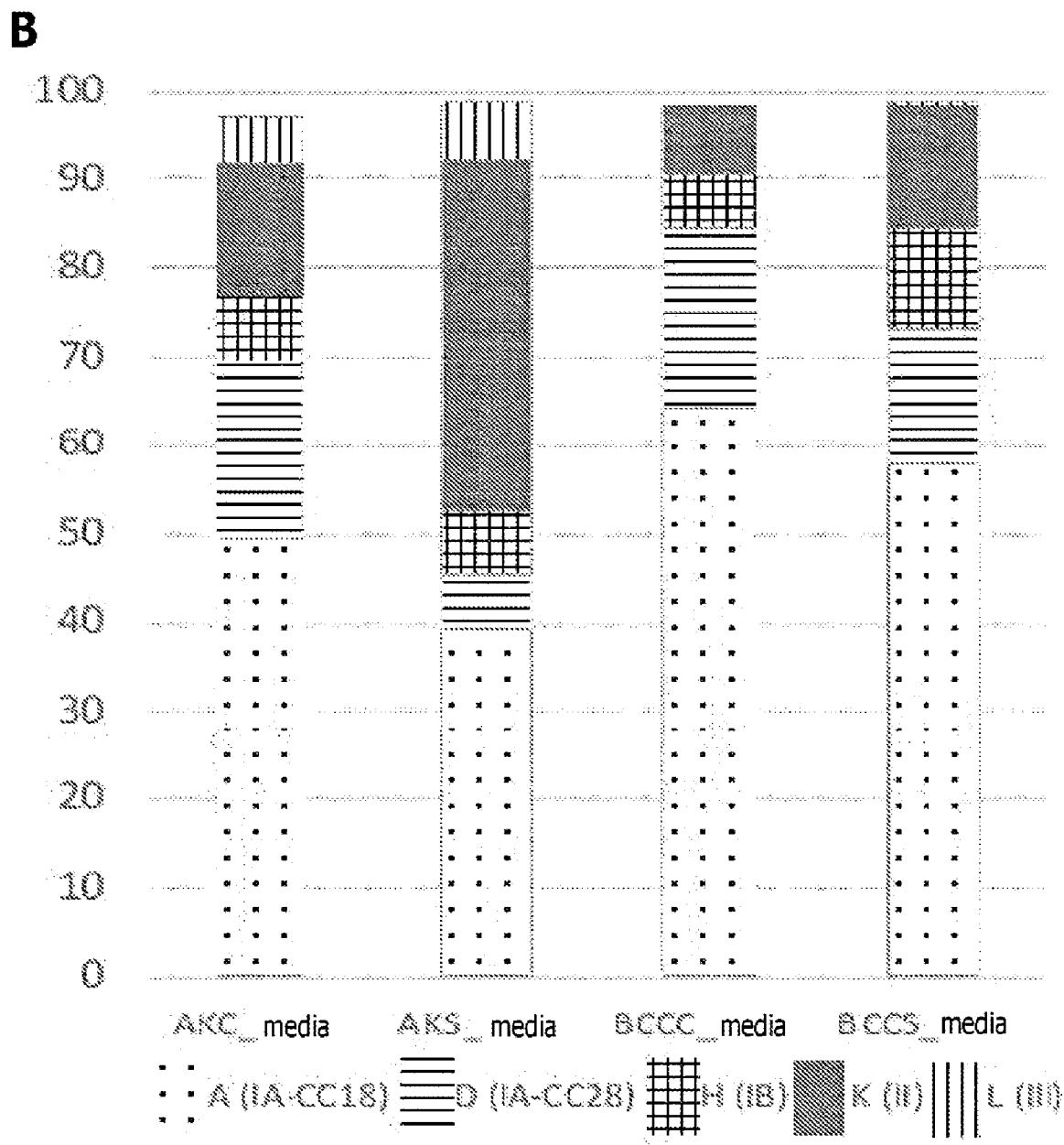
FIG. 7 (Cont.)

FIG. 8

- 35

09_9_tipo_II_K1	(1. 37) AAGCCGGAAAGGAGATAAACCTCT-ACCGGGACCCGTCTCCAACACC <u>TAGGAC</u>
ATCC_11828_tipo_II_L	(1. 37) AAGCCGGAAAGCAGATAAACCTCT-ACCGGGACCCGTCTCCAACACC <u>TAGGAC</u>
PMHS5_tipo_II_L_G	(0. 73) AAACCGAAAGCAGAAACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC
523_tipo_TA_G	(1. 94) AACCGAAAGCAGACAGACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC
PA_12_1_L1_tipo_TA_A	(3. 11) AAACCGAAAGCAGACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC
PA_15_1_R1_tipo_TA_C	(3. 11) AAACCGAAAGCAGACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC
09_109_tipo_II_K5	(2. 10) AAACCGAAAGCAGACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC
KPA171202_tipo_IB_H	(2. 10) AAACCGAAAGCAGACCCACCCCTAACGGCTAACCTTGGGGACCGGATGGAC

*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***

09_9_tipo_II_K1	-10
ATCC_11828_tipo_II_K9	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
PMHS5_tipo_II_L	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
523_tipo_TA_G	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
PA_12_1_L1_tipo_TA_A	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
PA_15_1_R1_tipo_TA_C	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
09_109_tipo_II_K5	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA
KPA171202_tipo_IB_H	ACTATGCA <u>G</u> CTATGCTCCAAACGA <u>AAGTC</u> TAATGATTTCGCTTAATTCCCATACGTA

*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***

09_9_tipo_II_K1	SEQ ID NO: 5)
ATCC_11828_tipo_II_K9	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 6)
PMHS5_tipo_II_L	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 7)
523_tipo_TA_G	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 8)
PA_12_1_L1_tipo_TA_A	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 9)
PA_15_1_R1_tipo_TA_C	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 10)
09_109_tipo_II_K5	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 11)
KPA171202_tipo_IB_H	CGACATATCGGGAGACCATC <u>TATG</u> (SEQ ID NO: 12)

*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***

FIG. 9

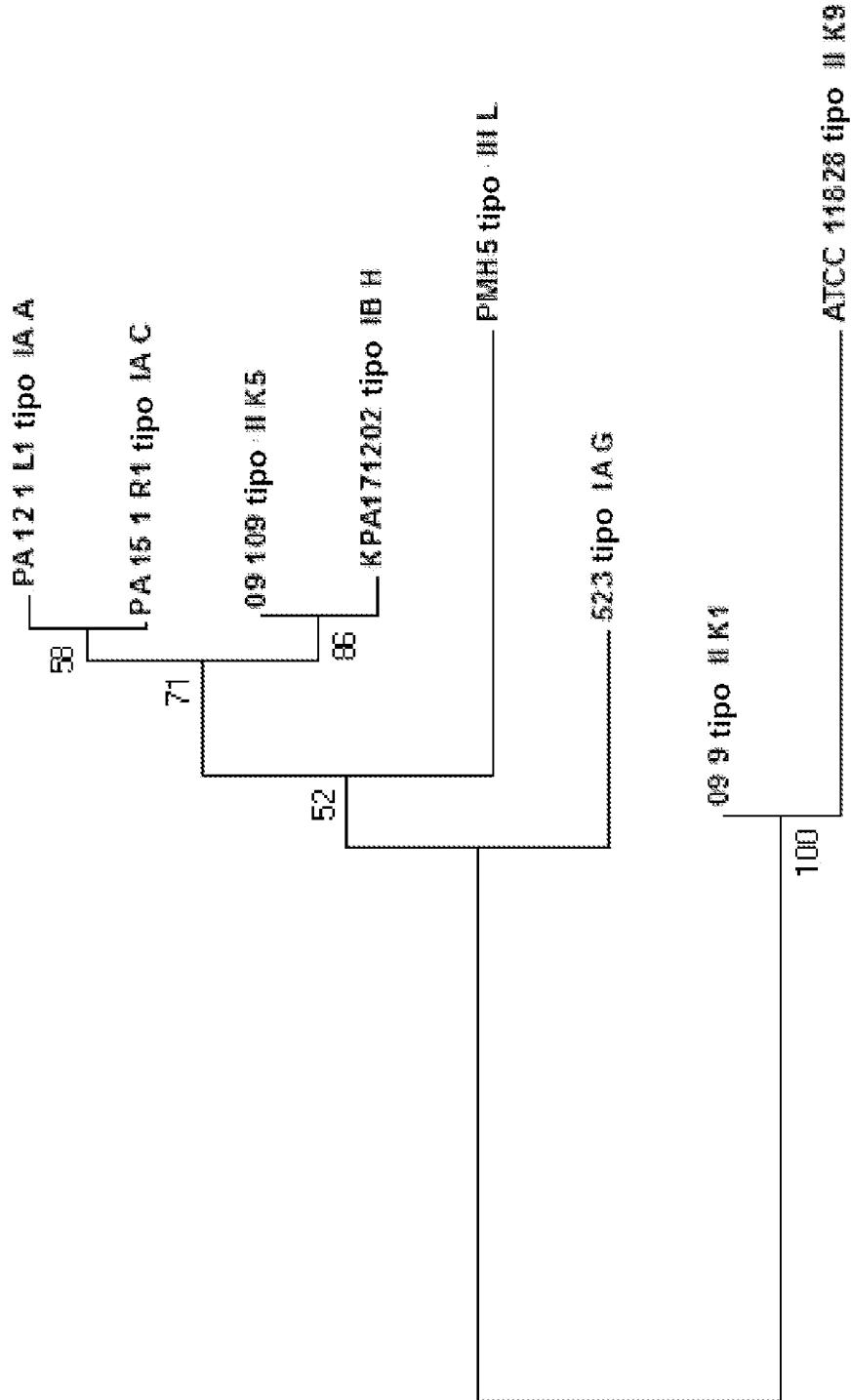


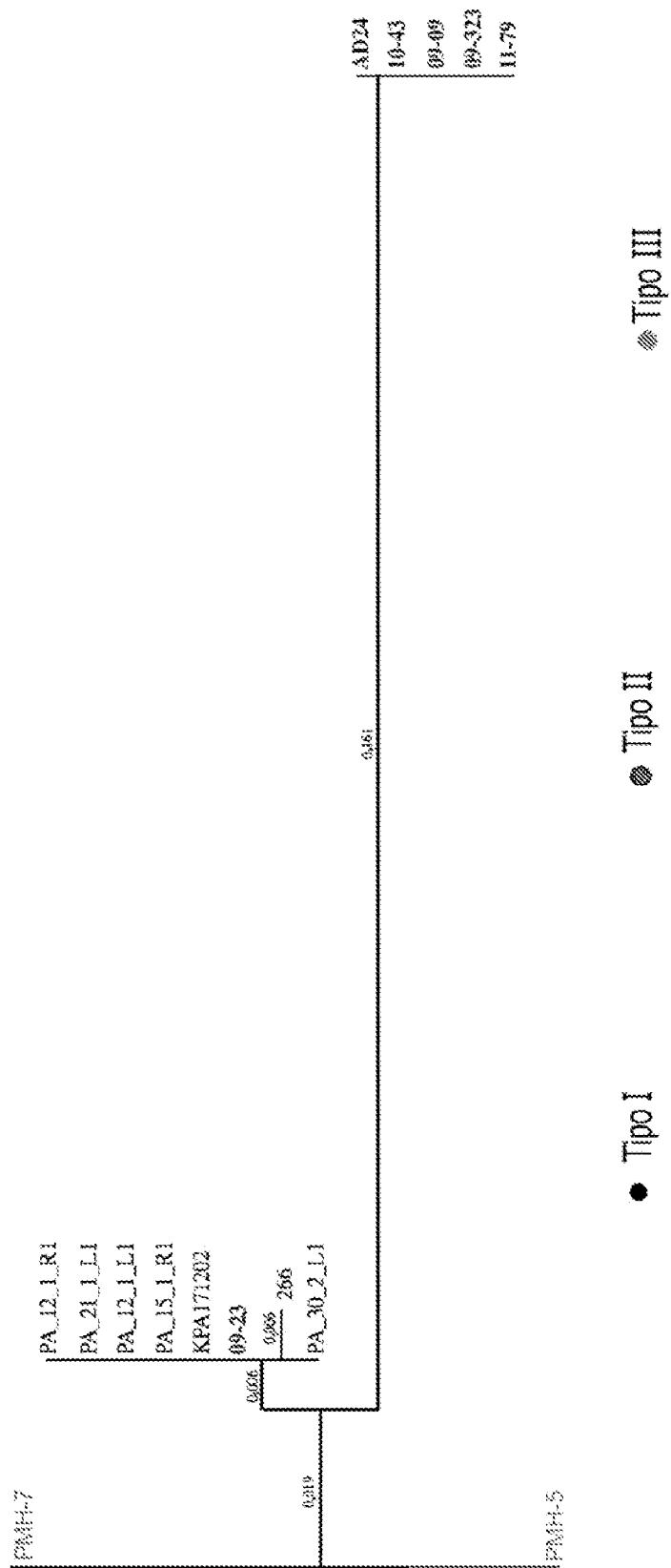
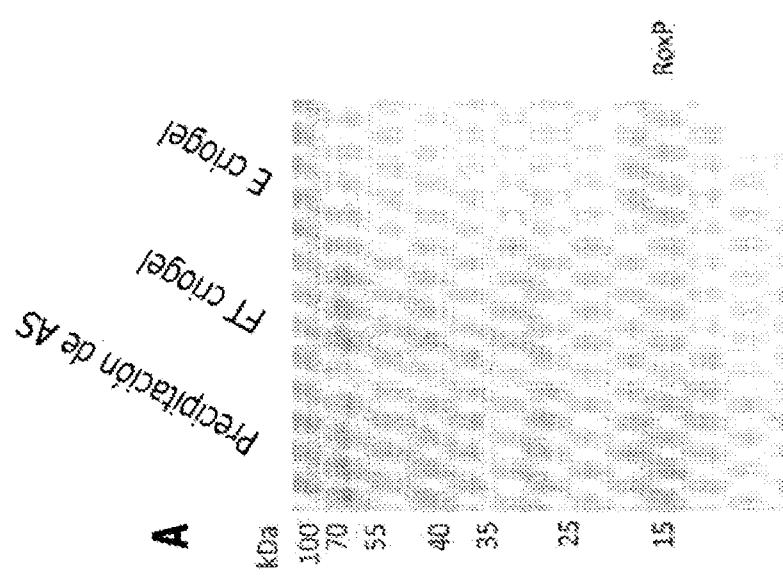
FIG. 10

FIG.11



ES 2 994 459 T3

FIG. 12

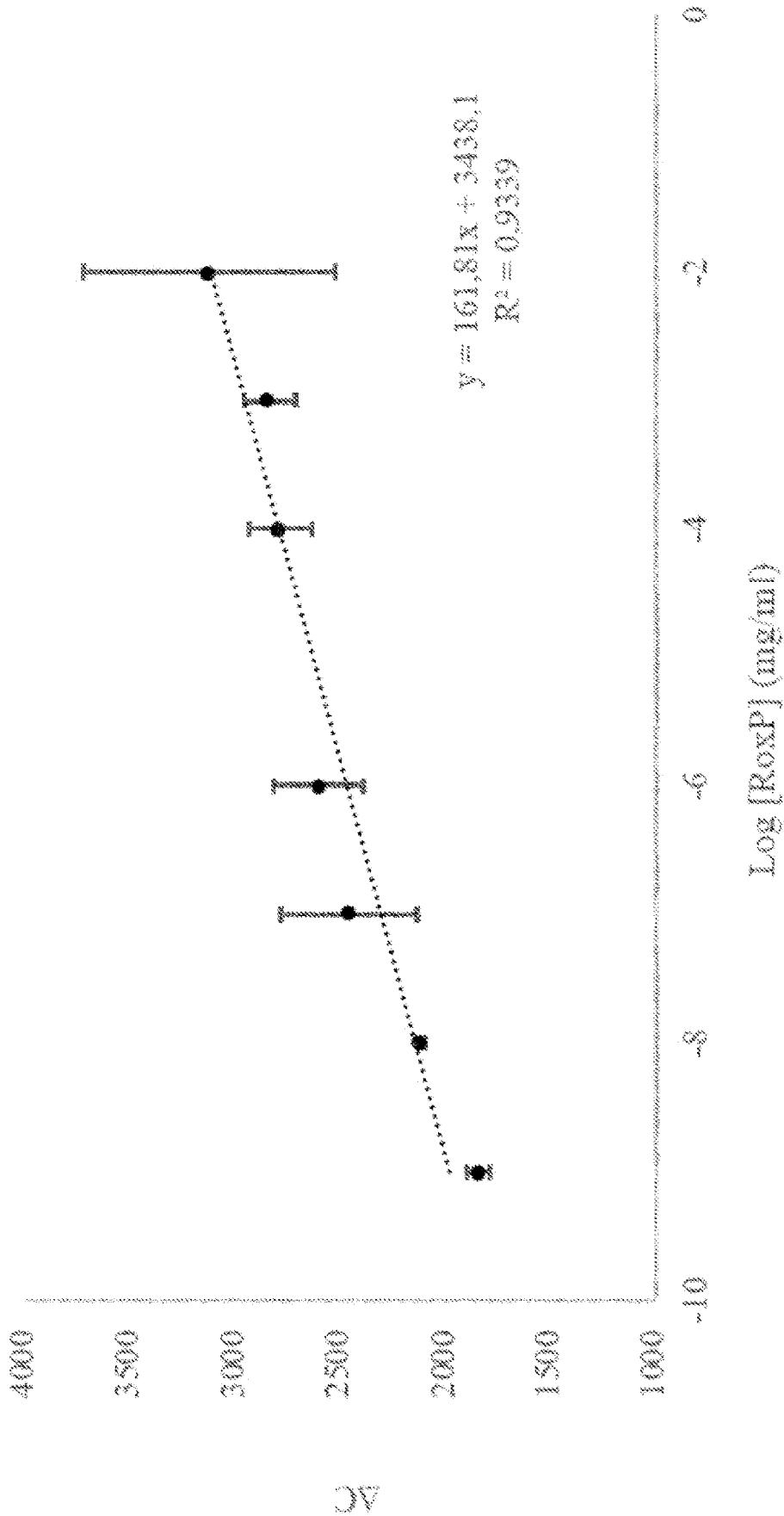


FIG. 13

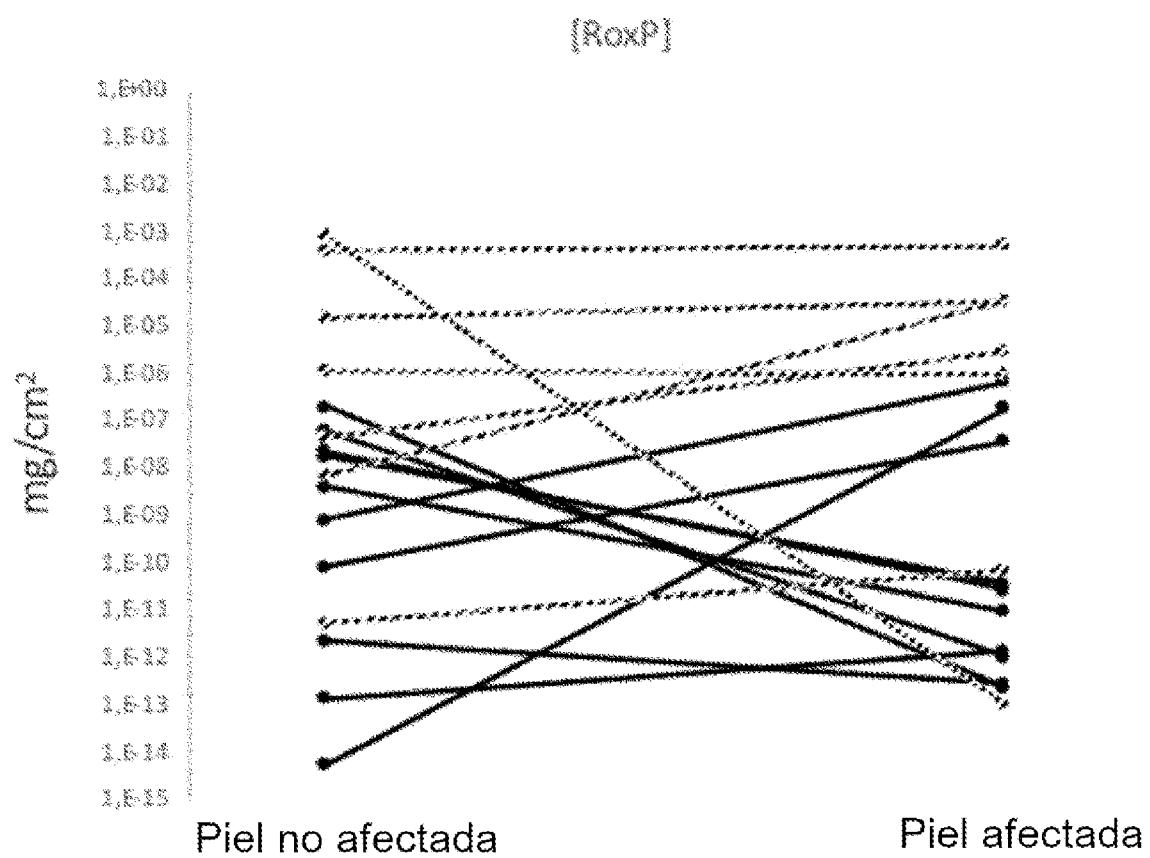


FIG. 14

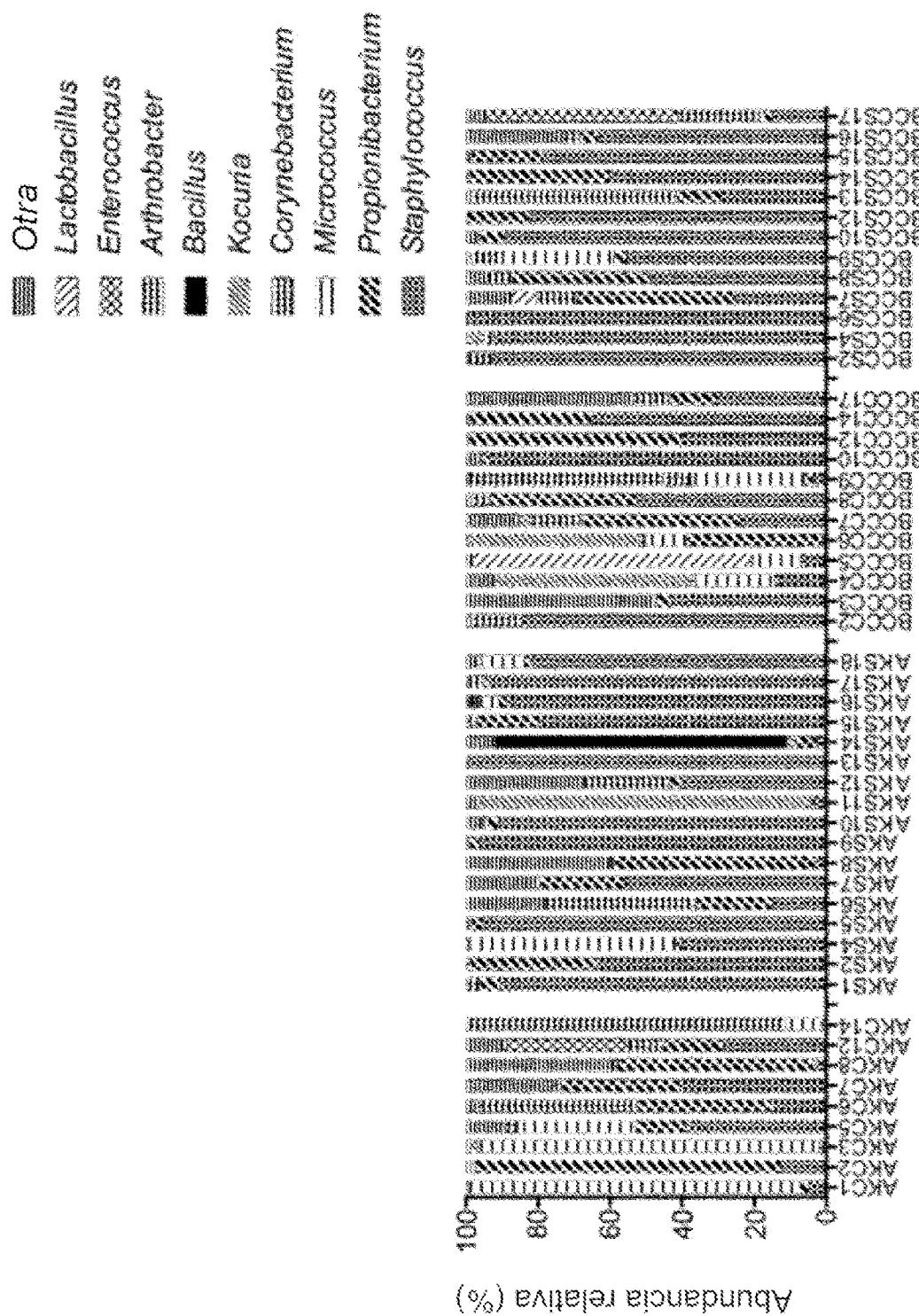
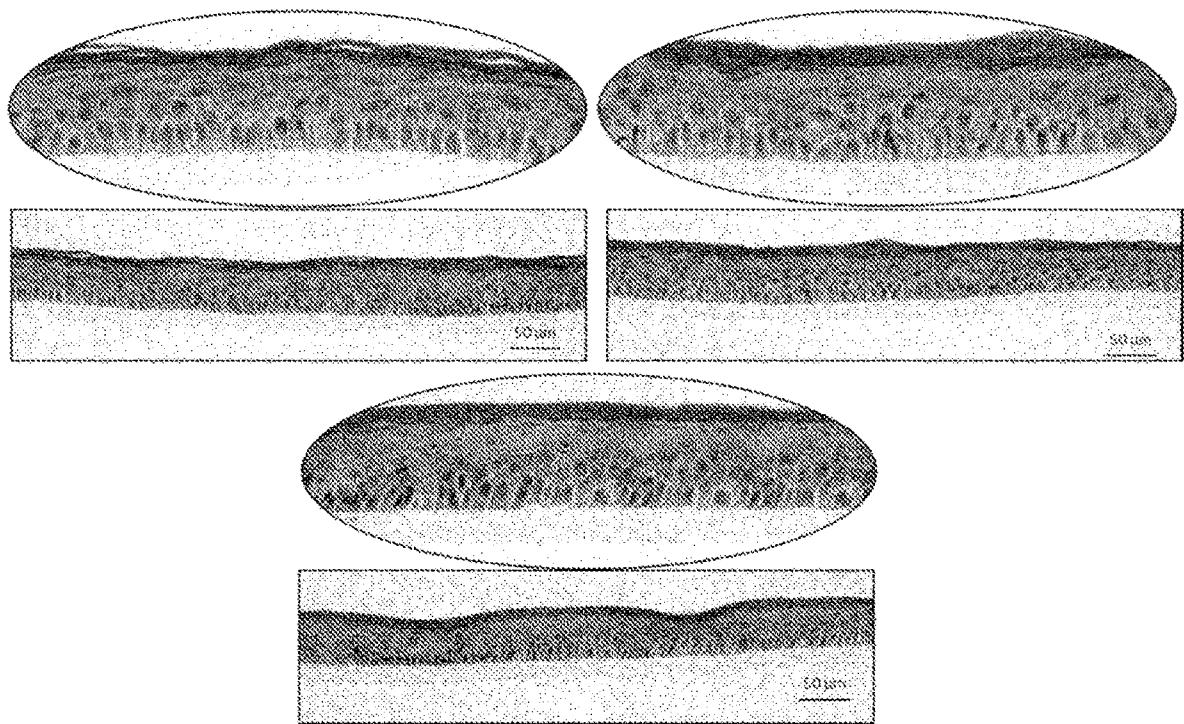


FIG. 15

A



B

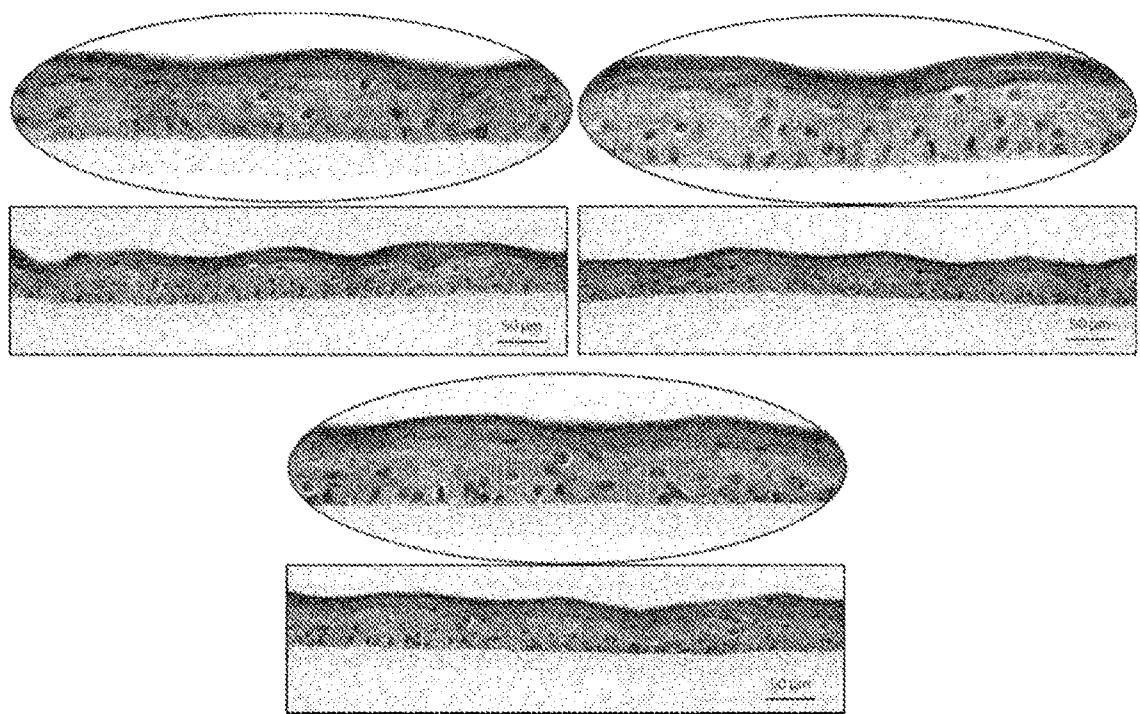
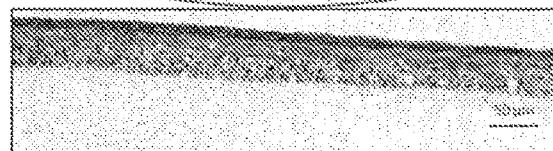
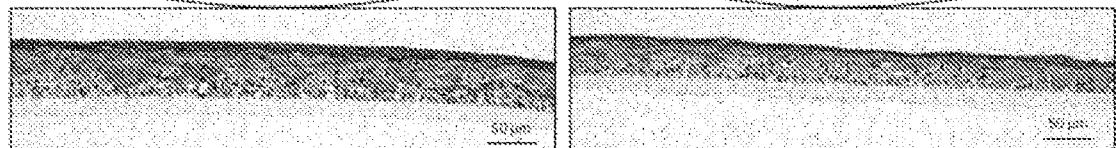
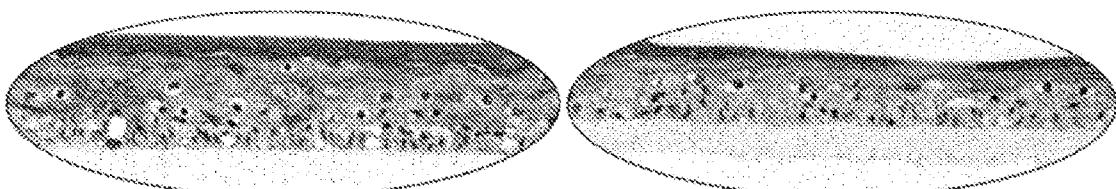


FIG. 15 (Cont.)

C



D

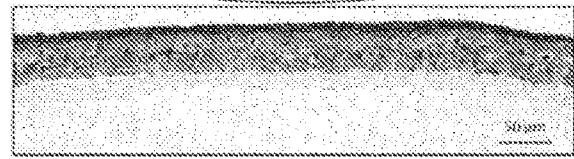
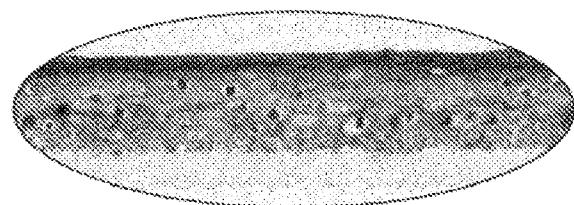
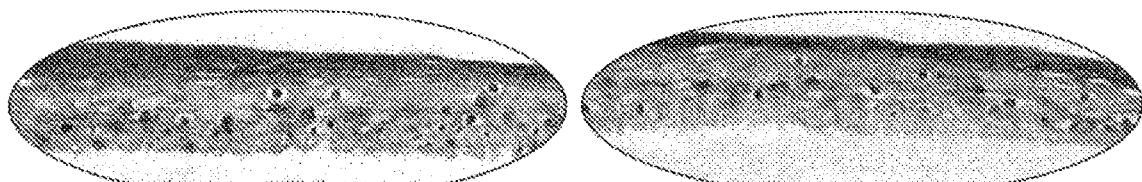


FIG. 16

A

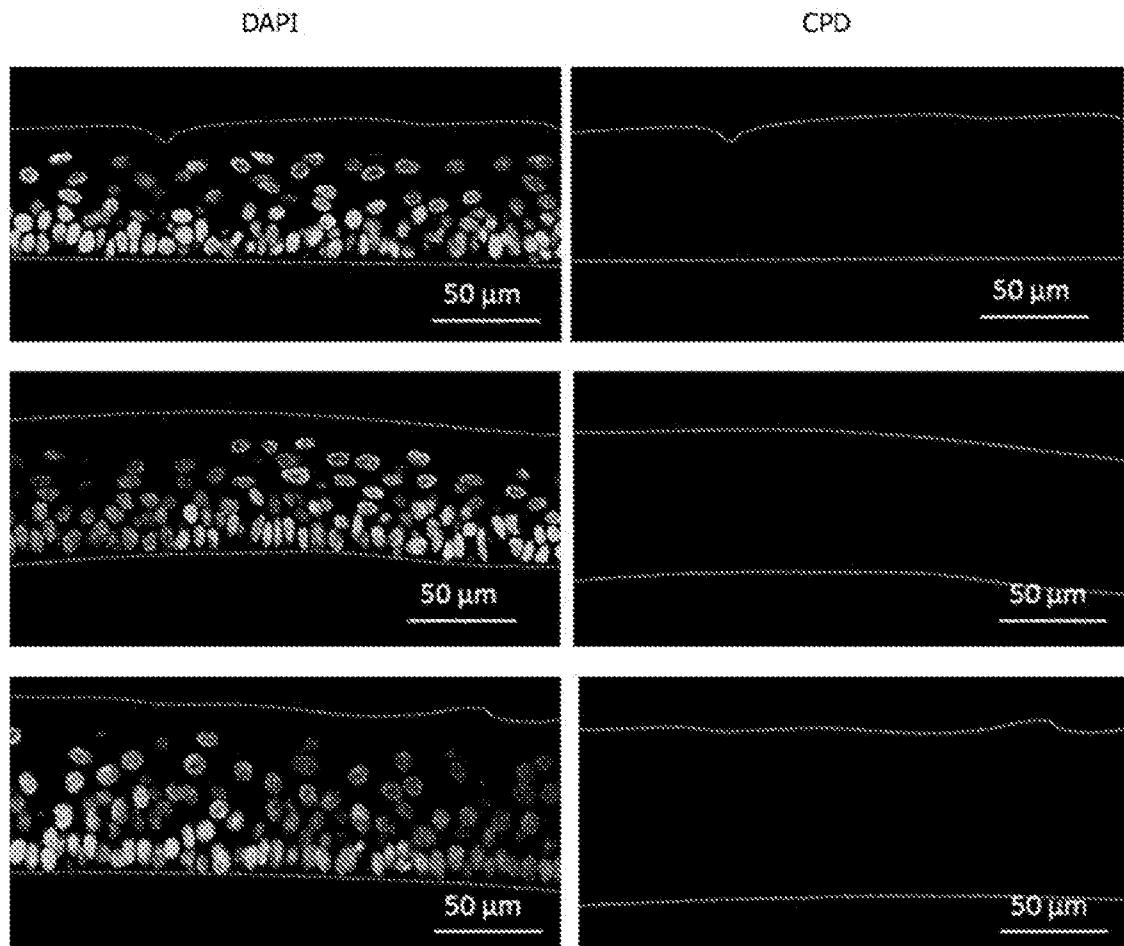


FIG. 16 (Cont.)

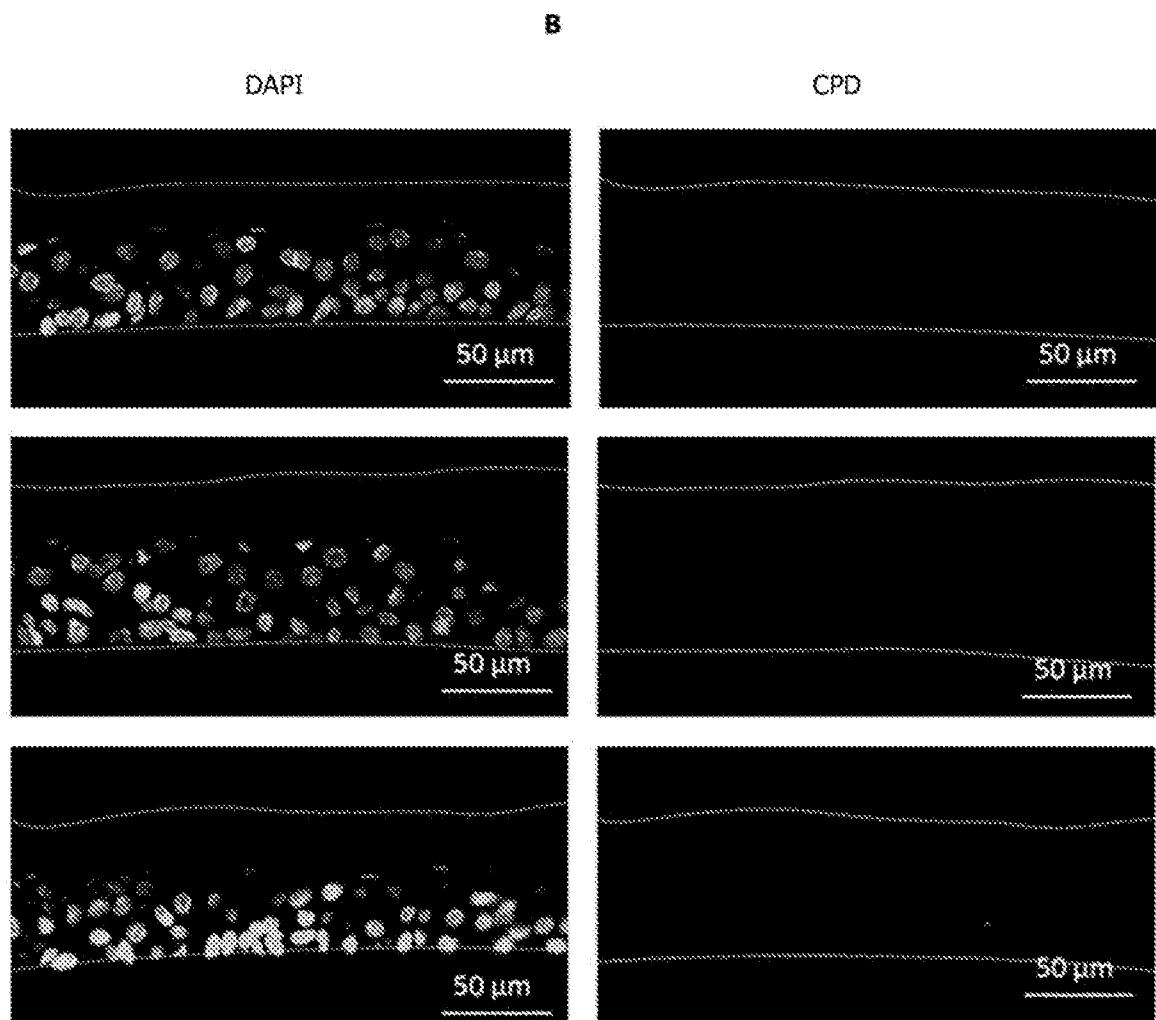


FIG. 16 (Cont.)

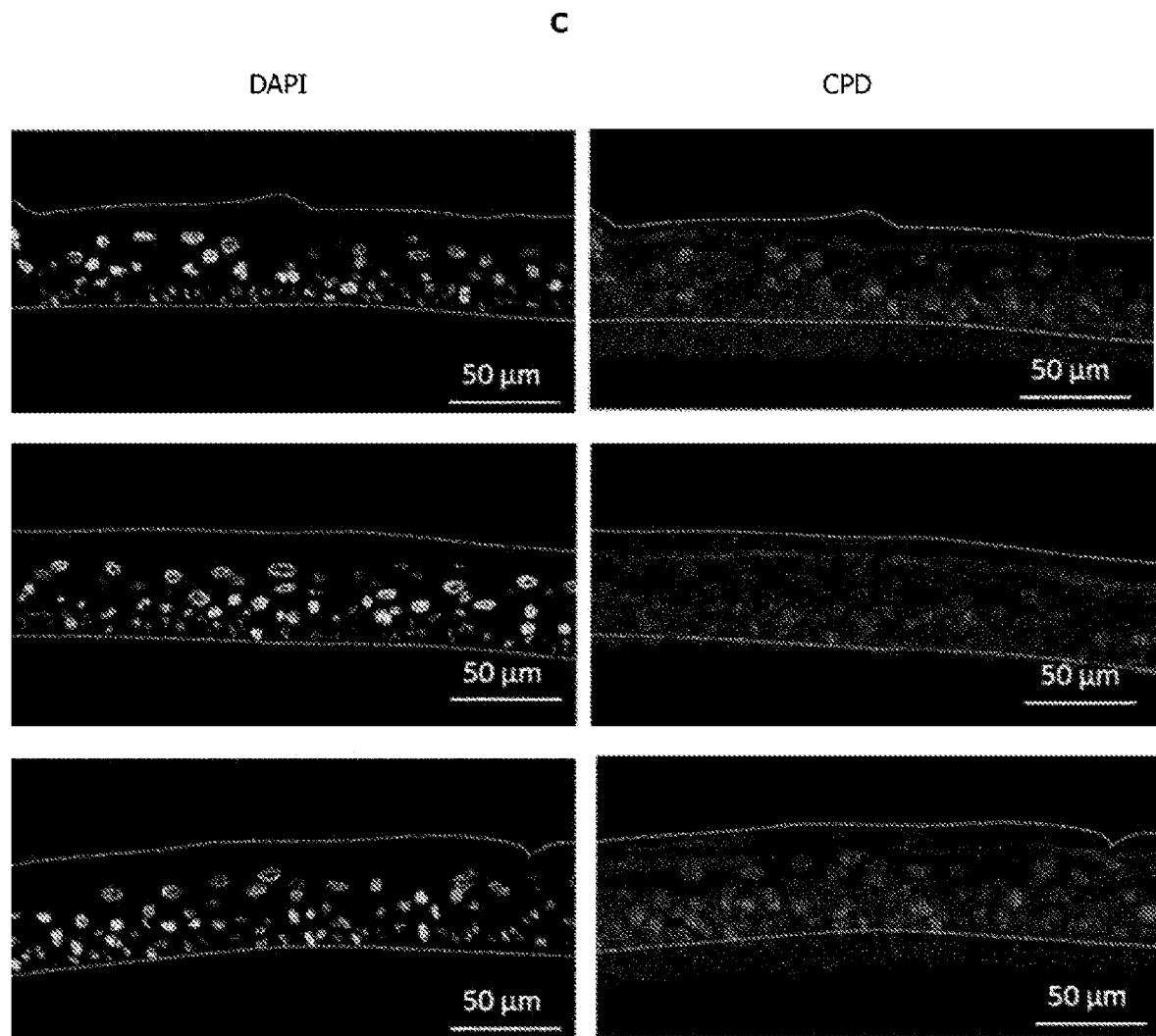


FIG. 16 (Cont.)

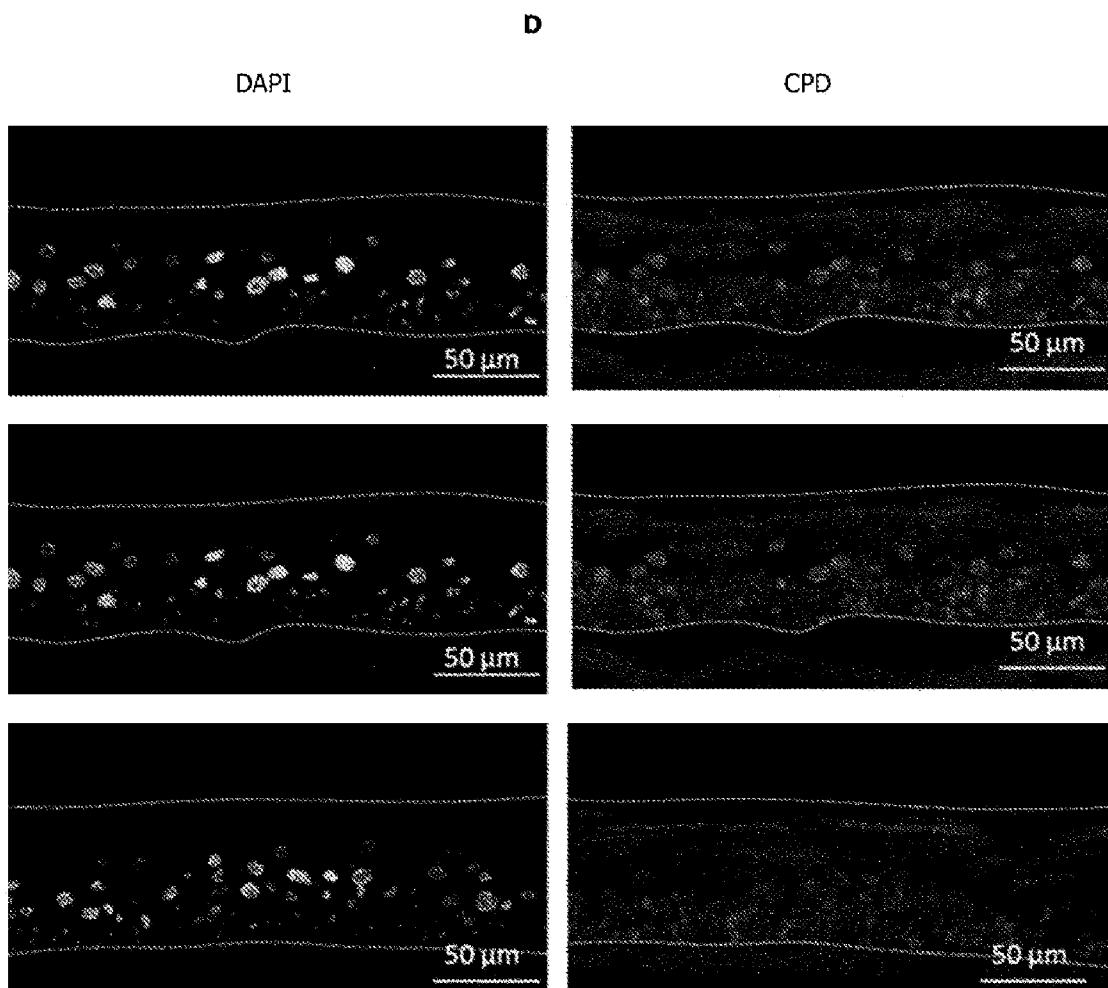


FIG. 16 (Cont.)

E

**CPD en el RHE
(24 horas después del estrés)**

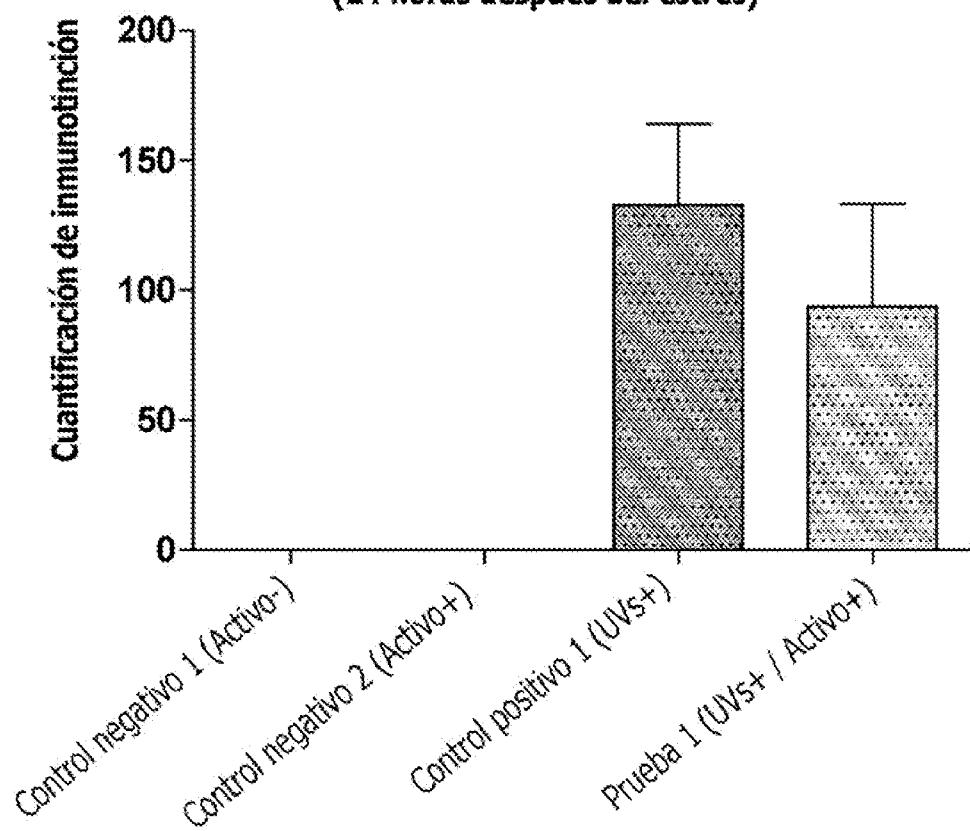


FIG. 17

A

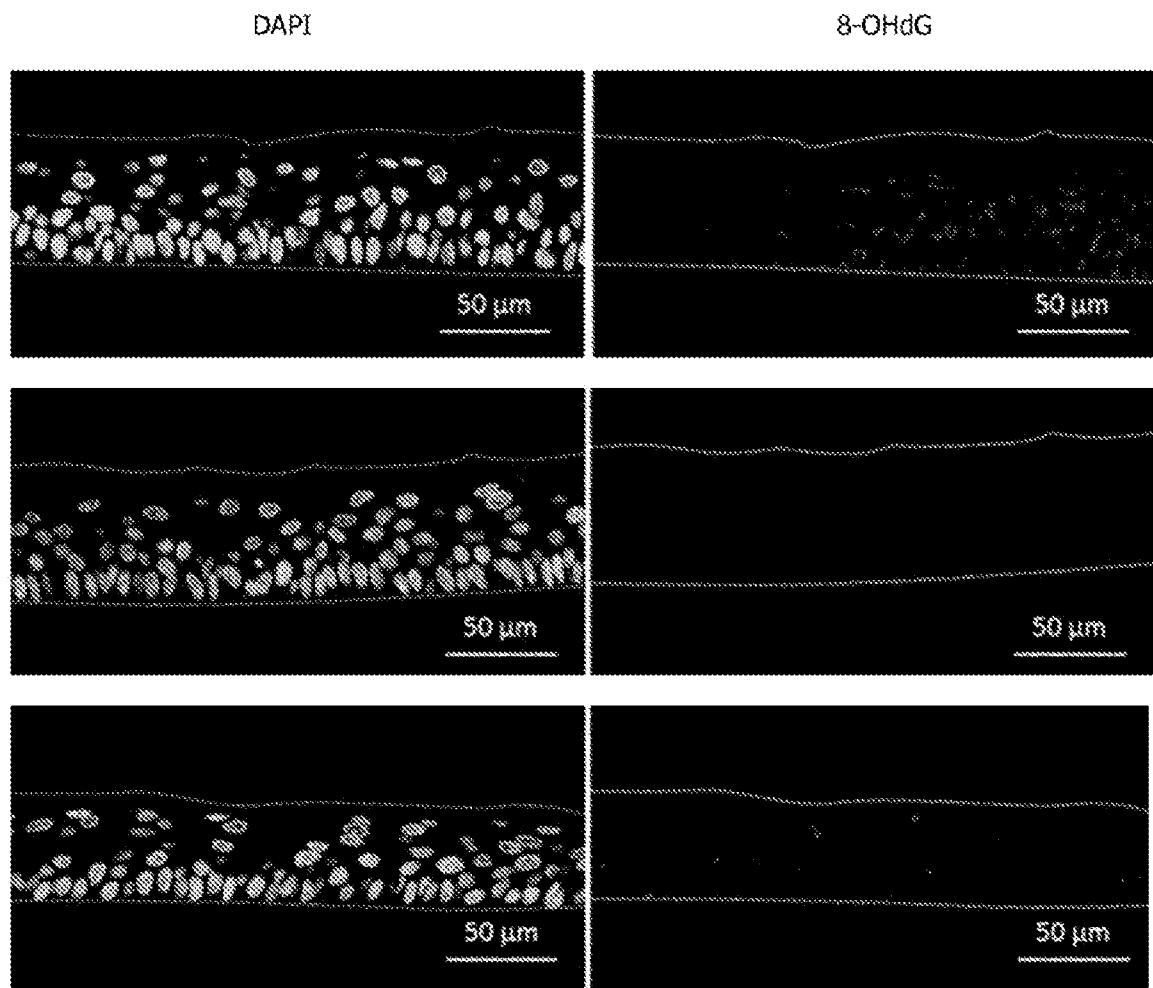


FIG. 17 (Cont.)

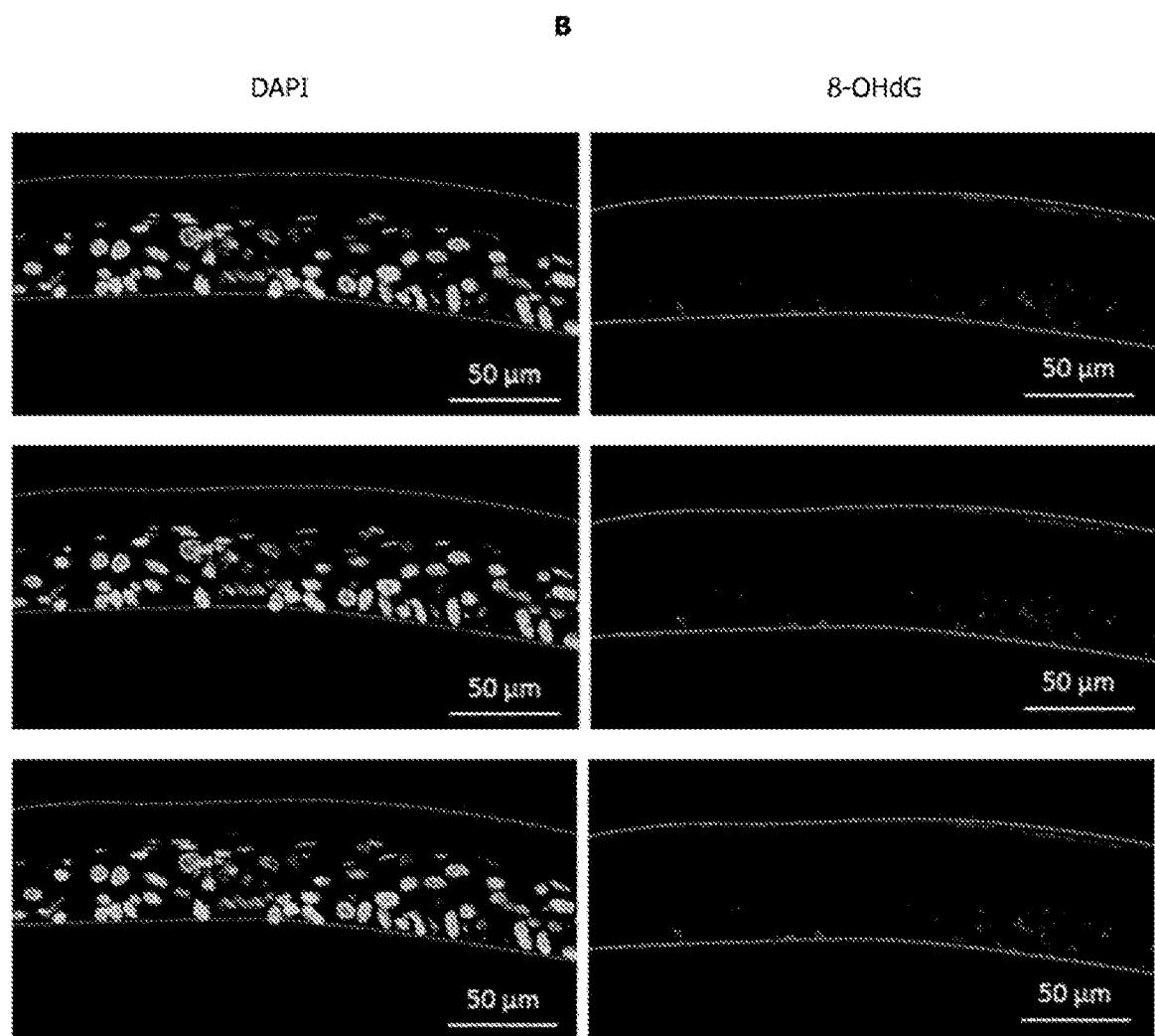


FIG. 17 (Cont.)

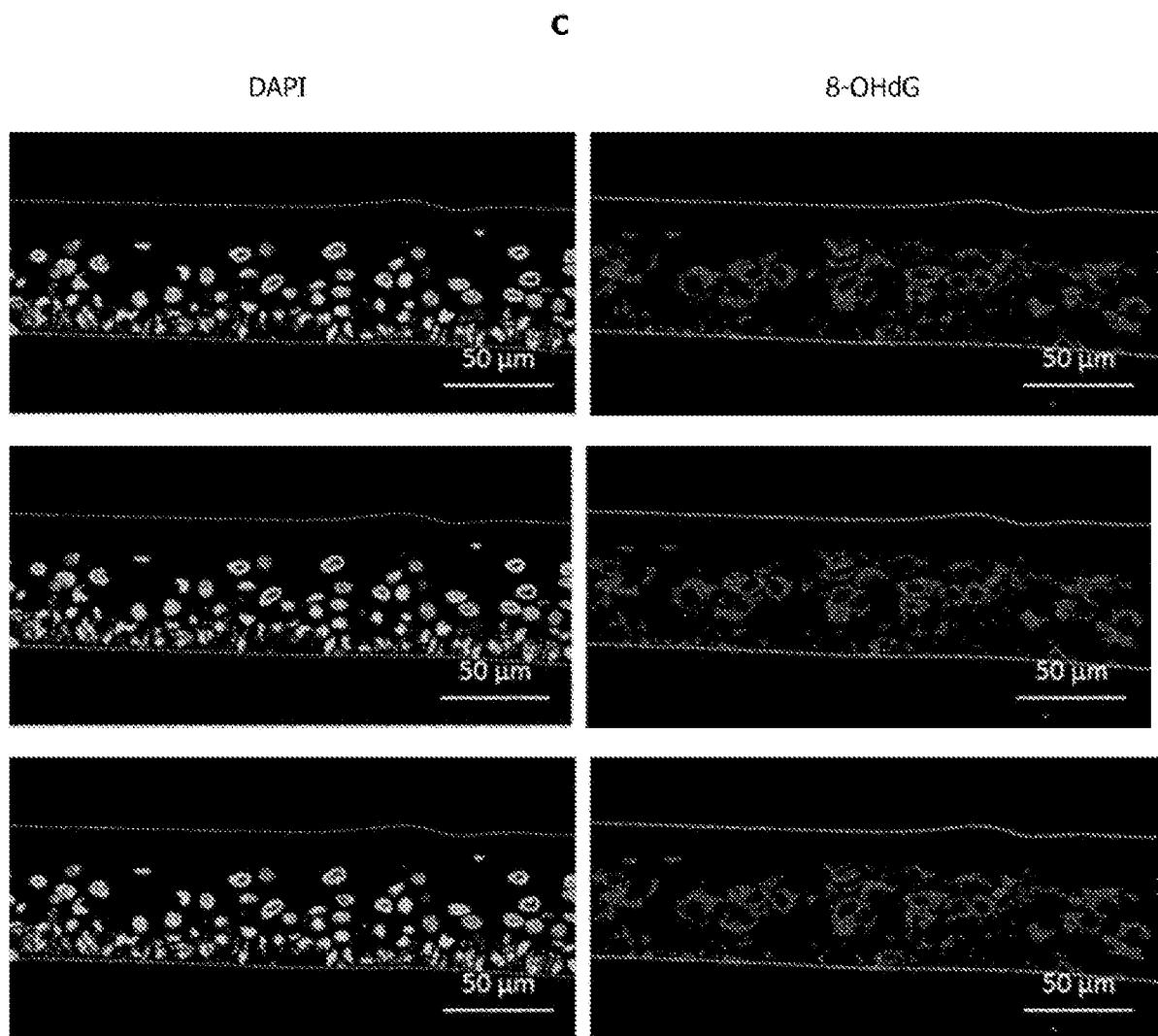


FIG. 17 (Cont.)

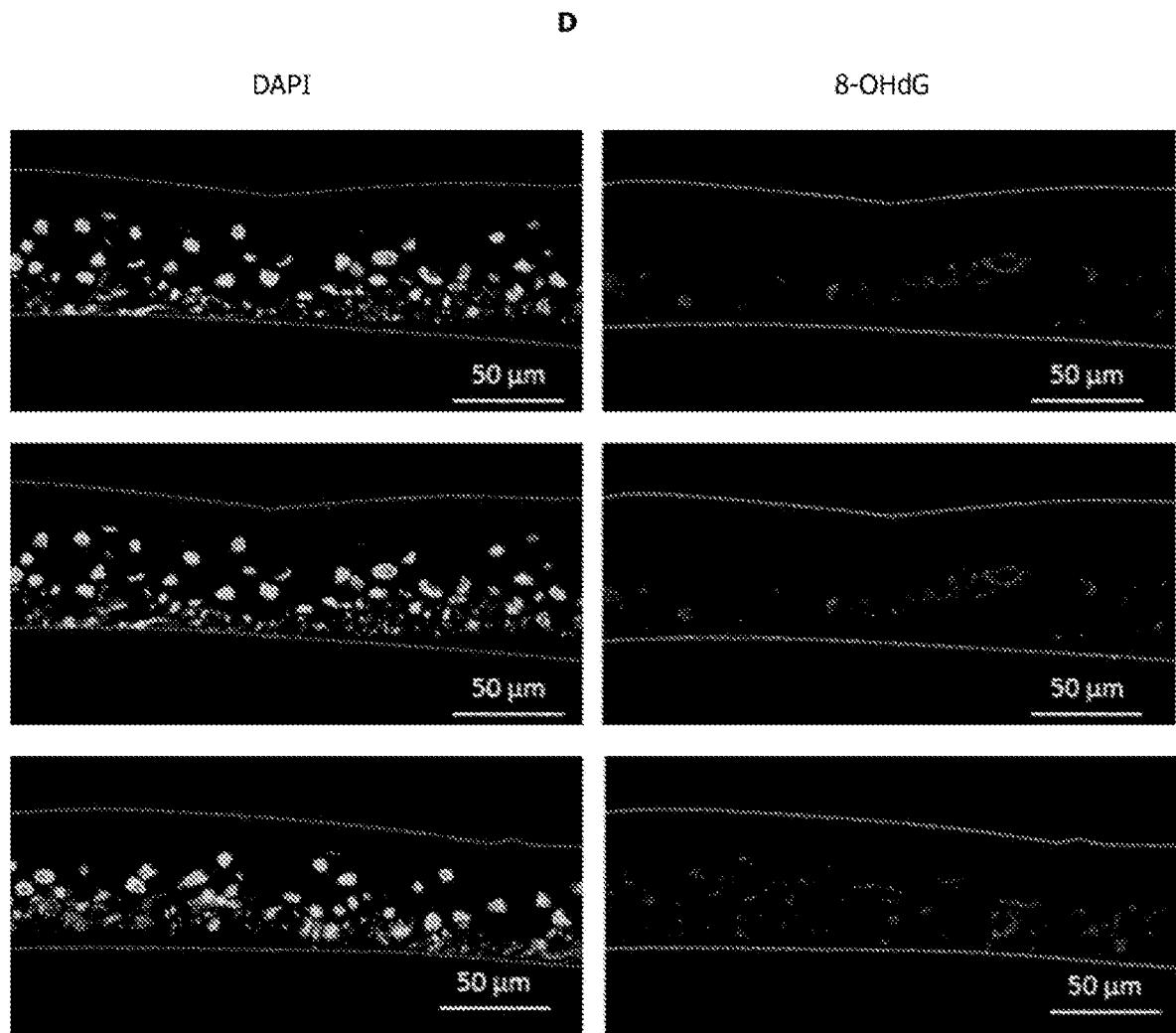


FIG. 17 (Cont.)

E

**8-OHdG en el RHE
(24 horas después del estrés)**

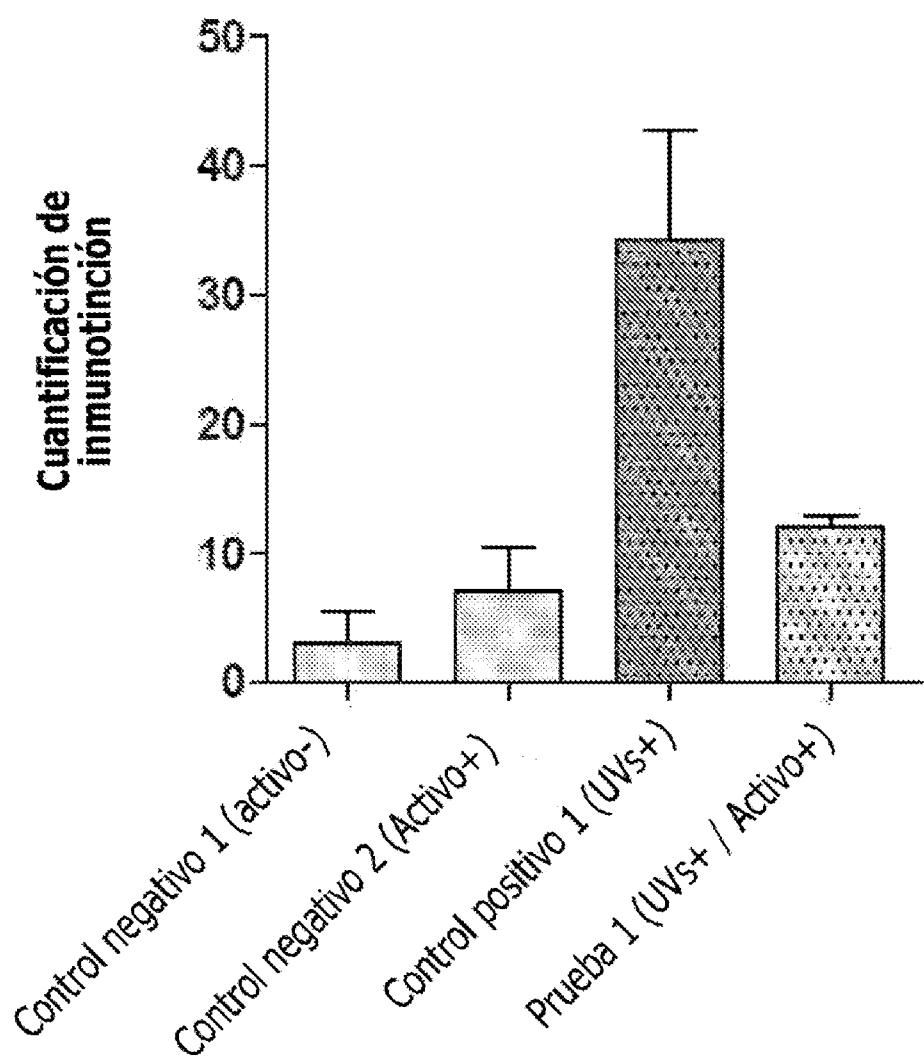


FIG. 18

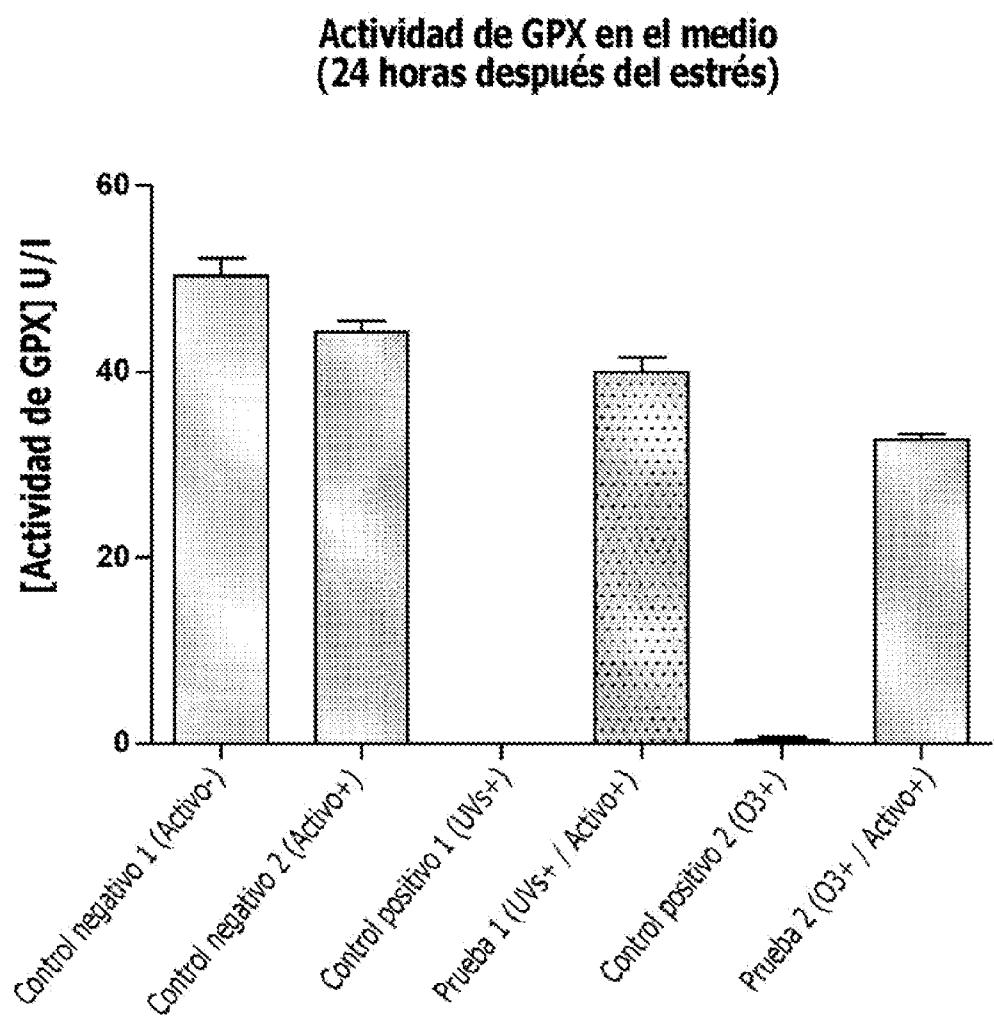


FIG. 19

A

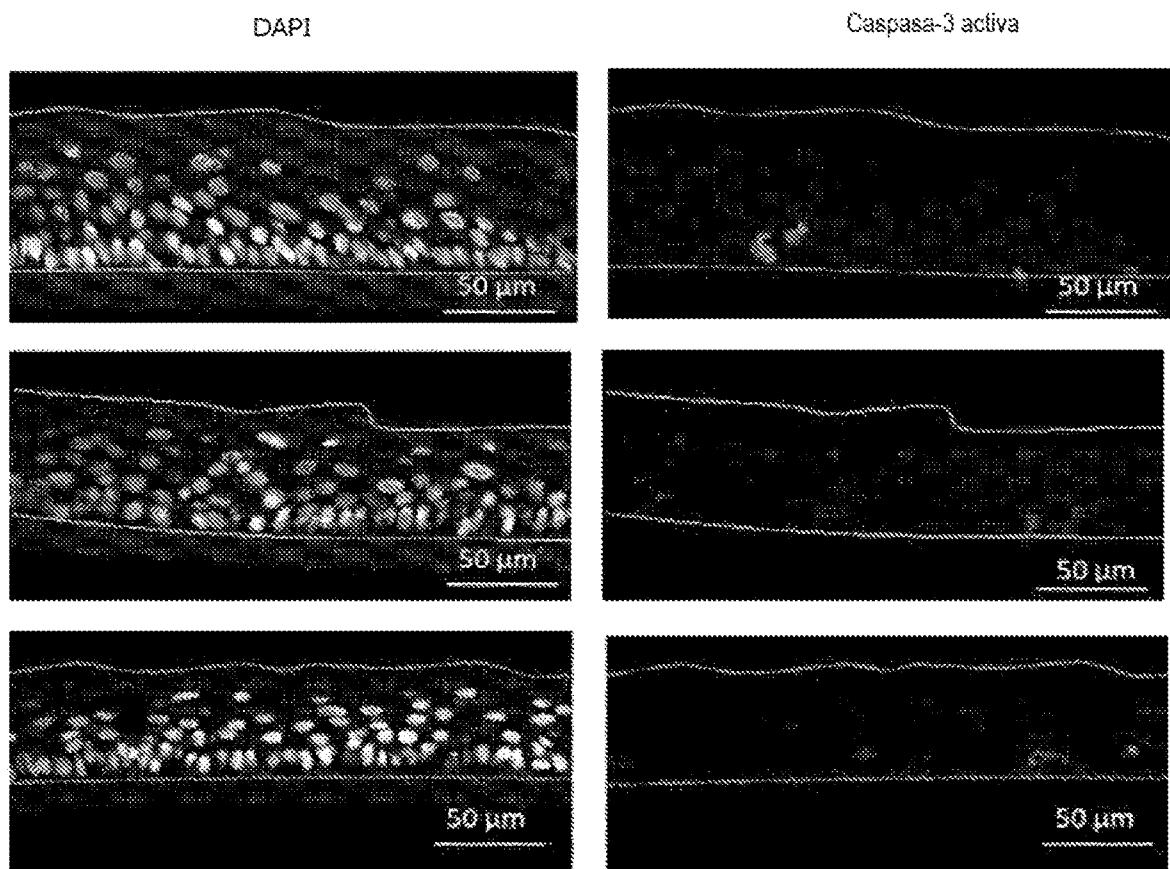


FIG. 19 (Cont.)

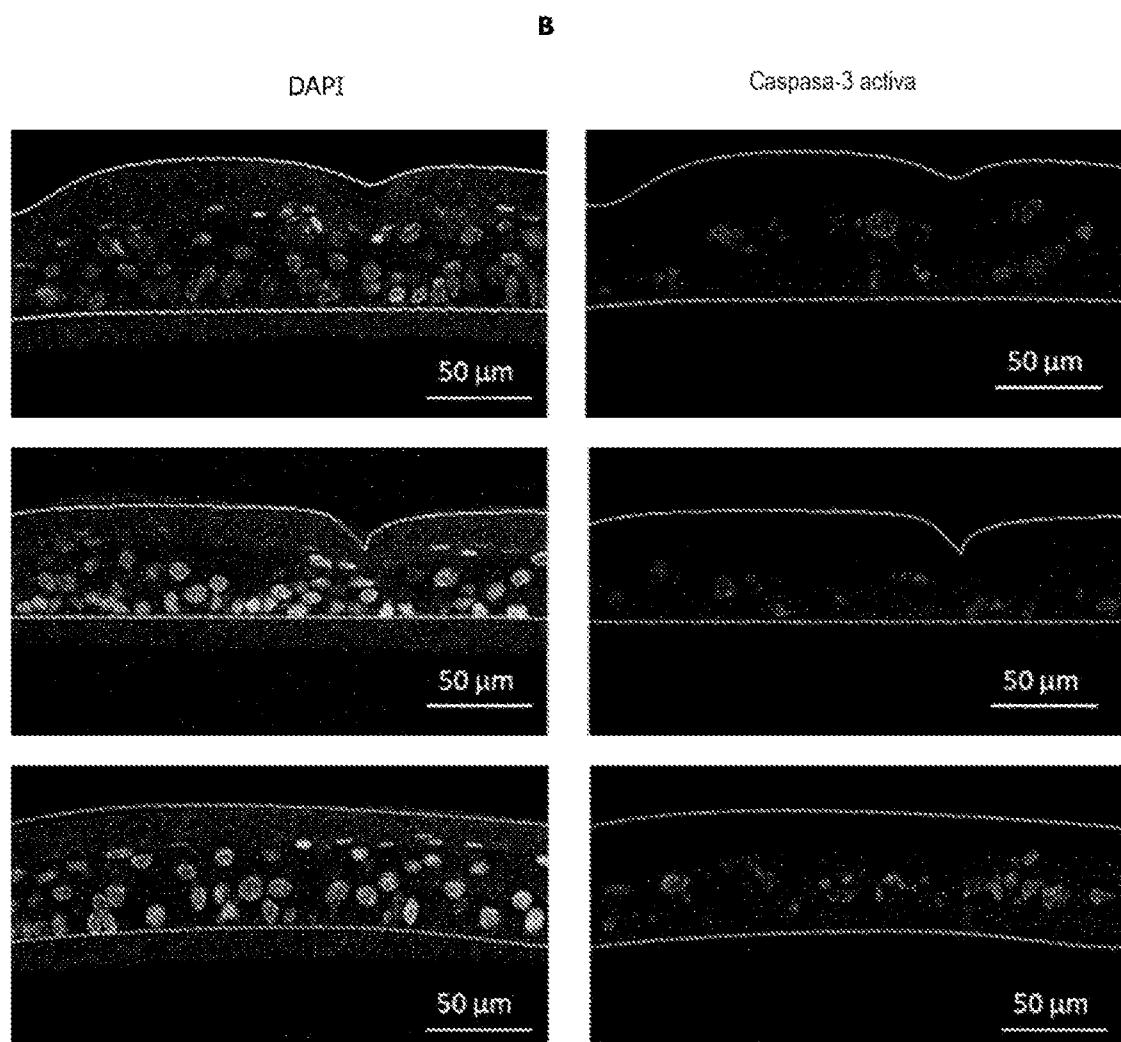


FIG. 19 (Cont.)

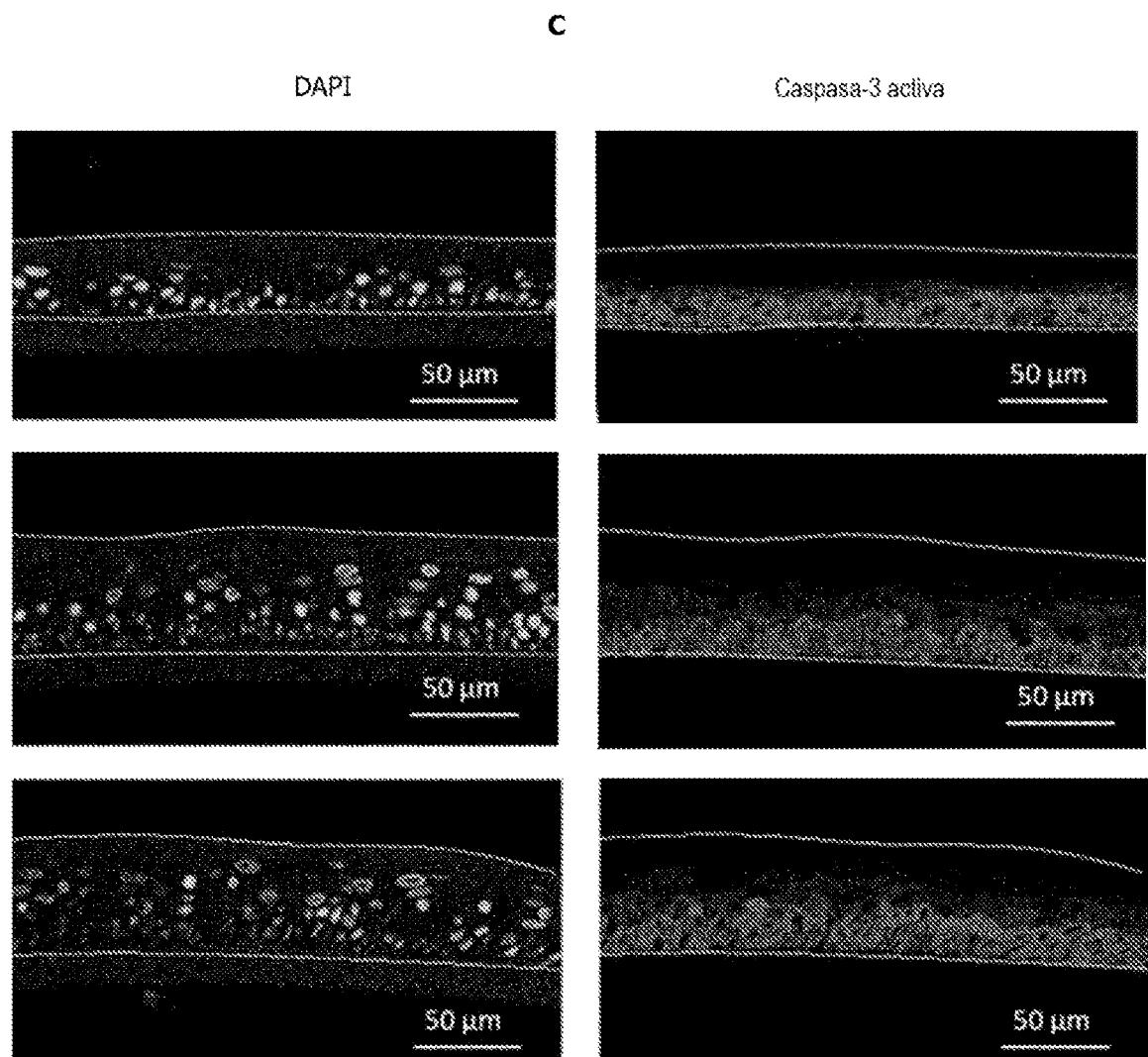


FIG. 19 (Cont.)

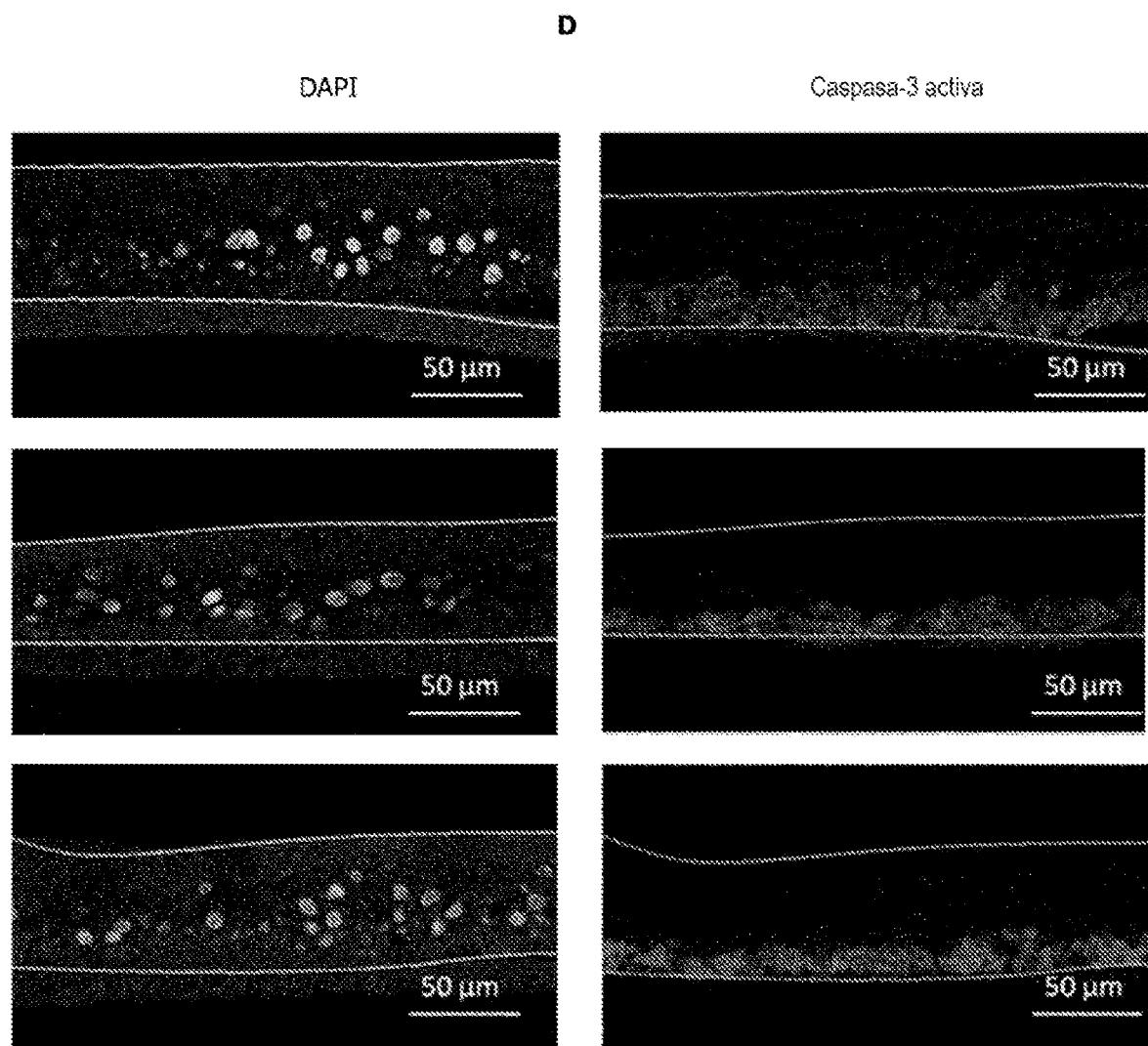


FIG. 19 (Cont.)

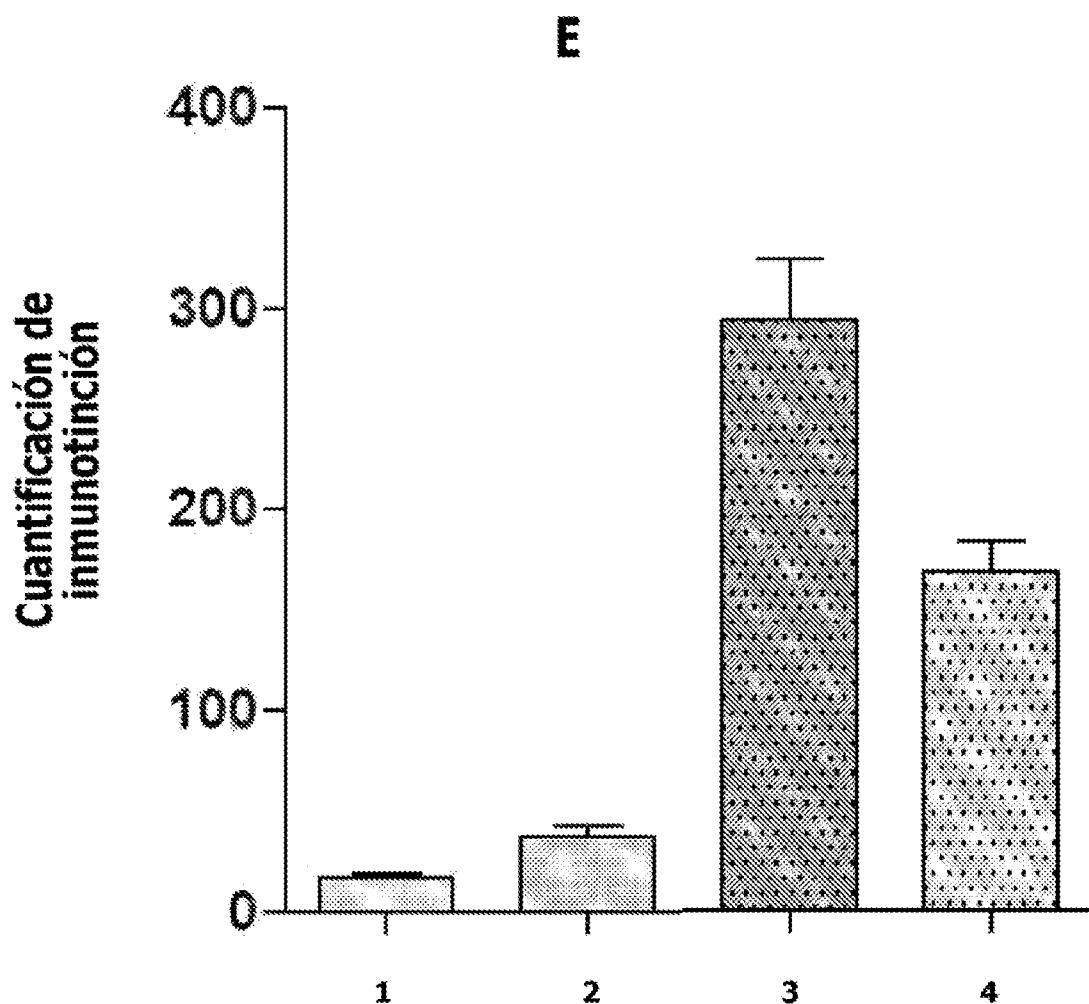


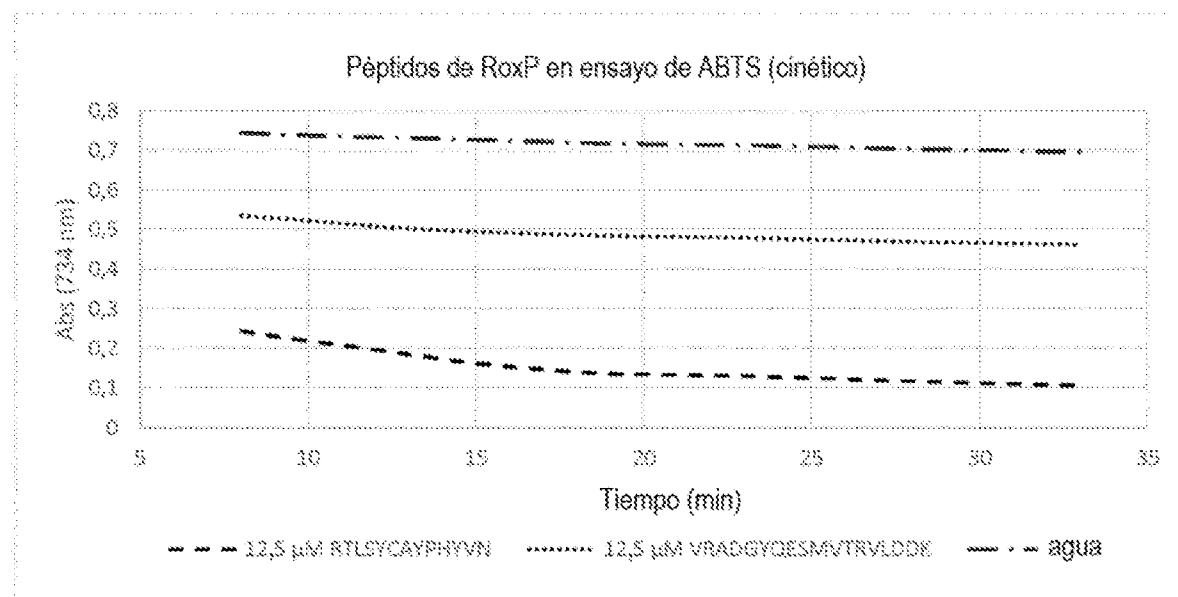
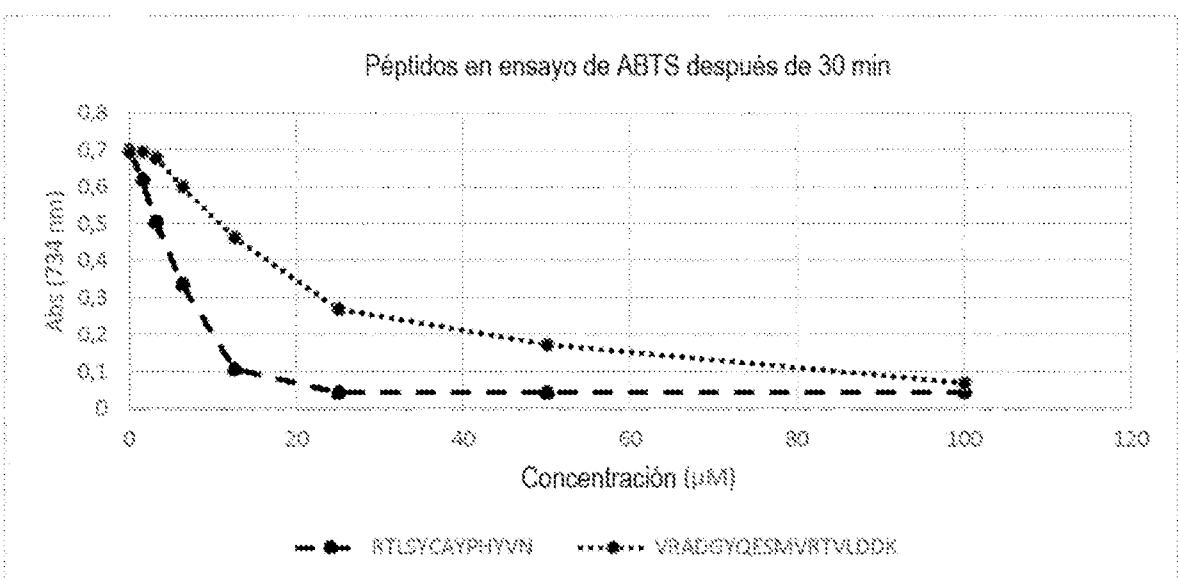
FIG. 20**A****B**

FIG. 21

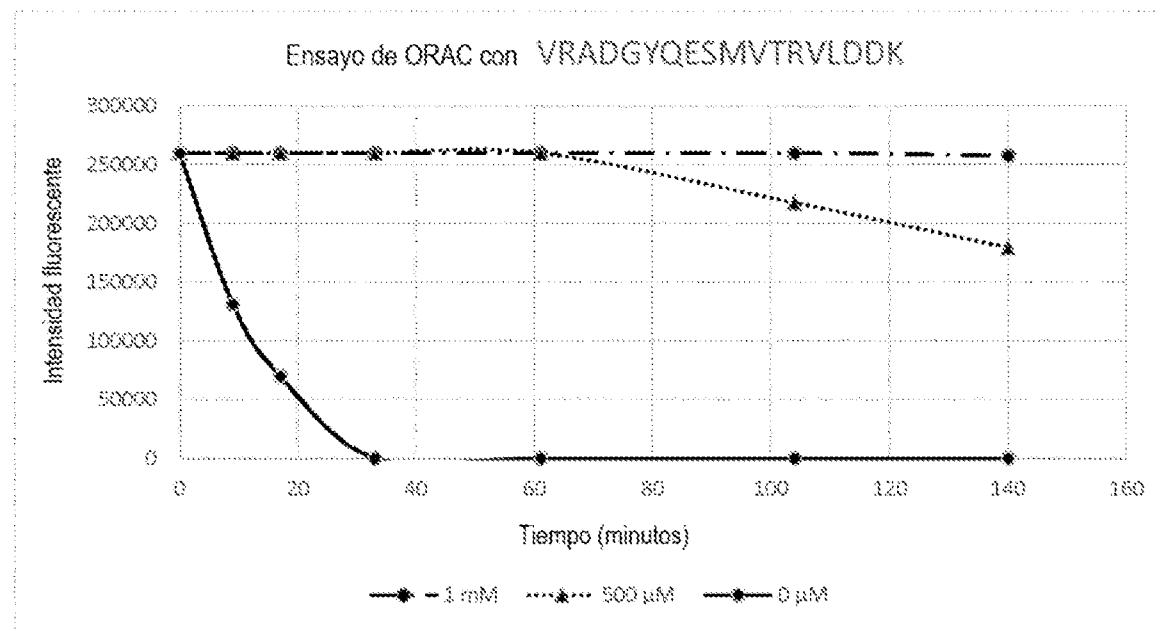
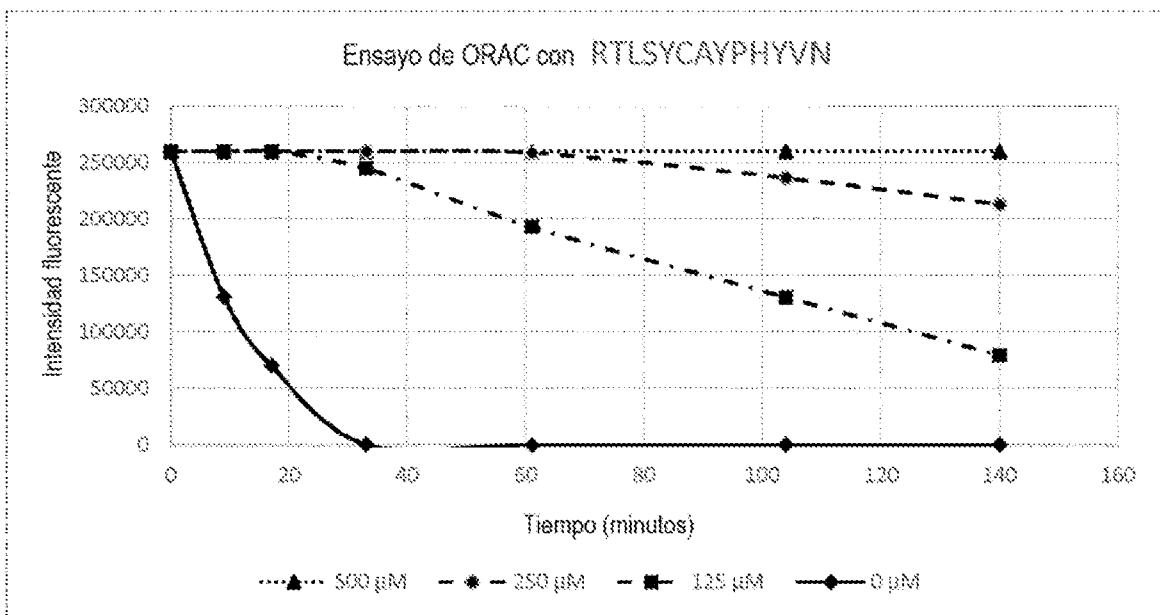
A**B**

FIG. 22

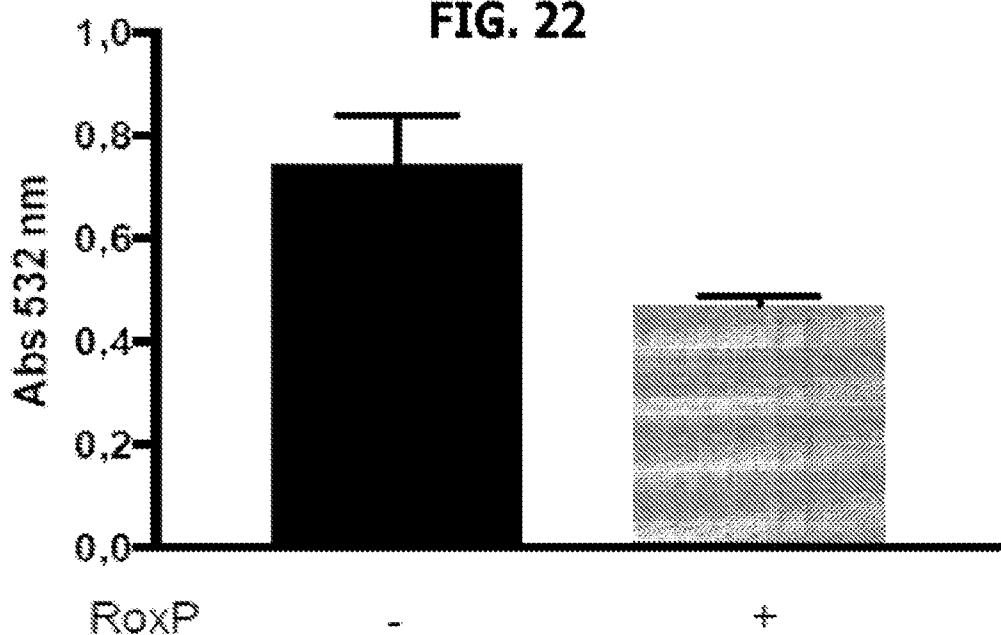


FIG. 23

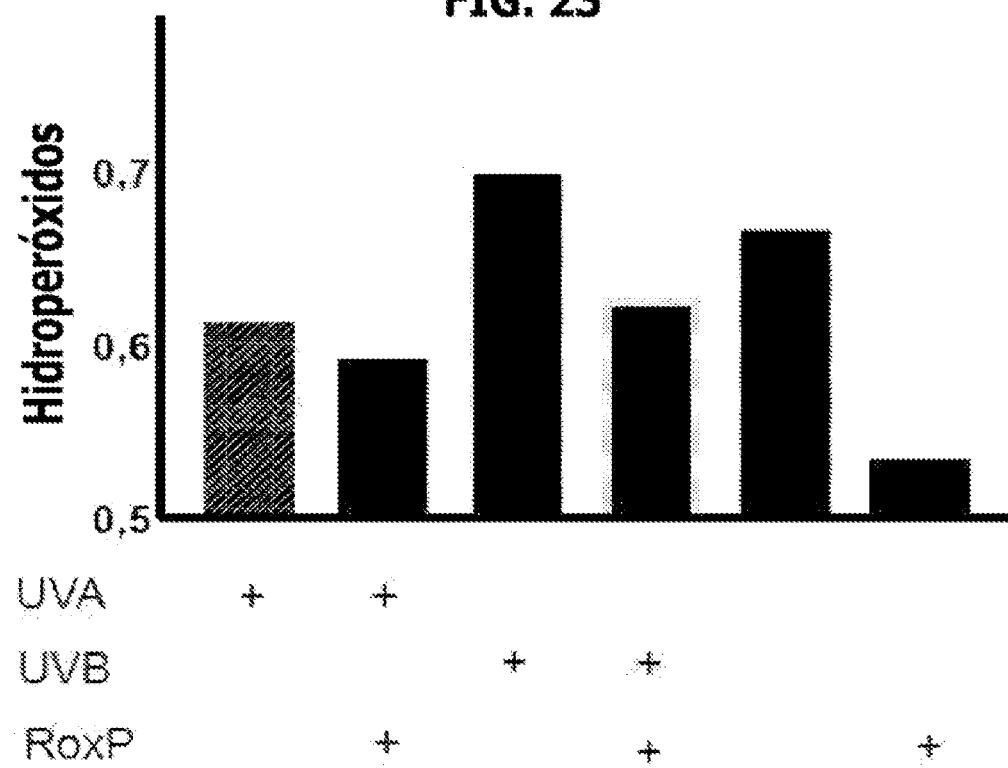


FIG. 24

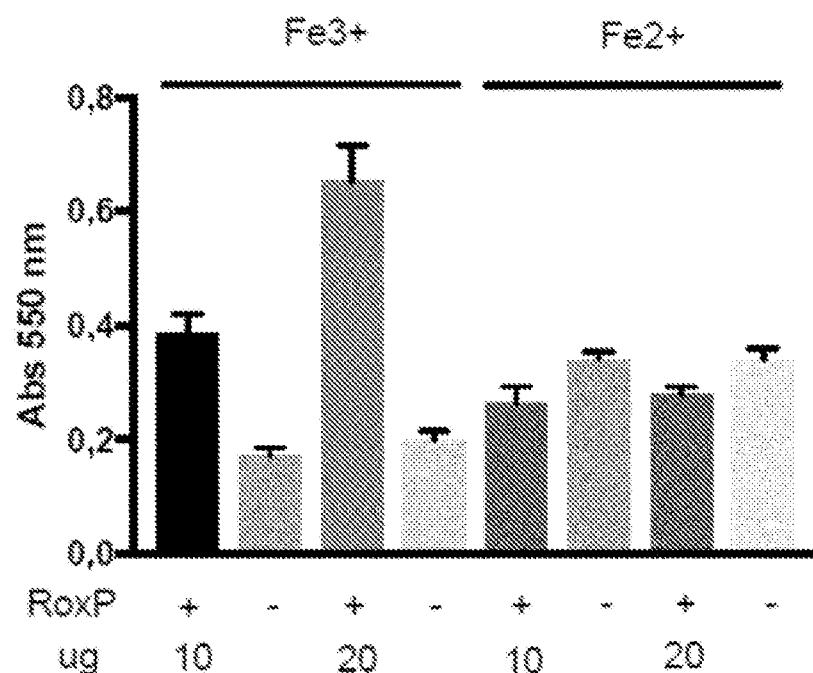


FIG. 25

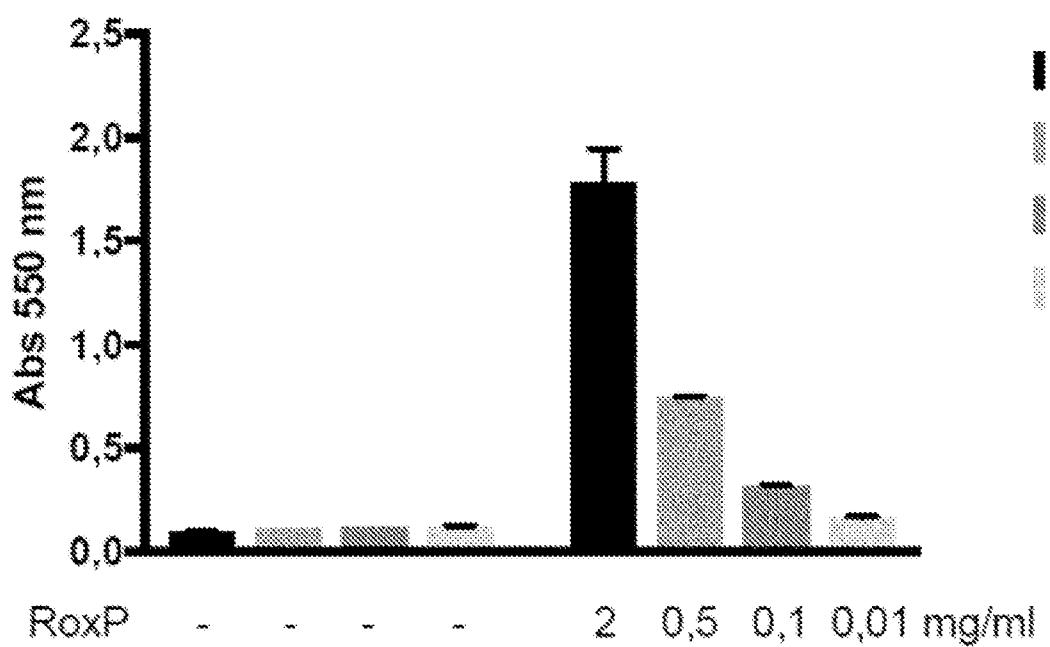


FIG. 26

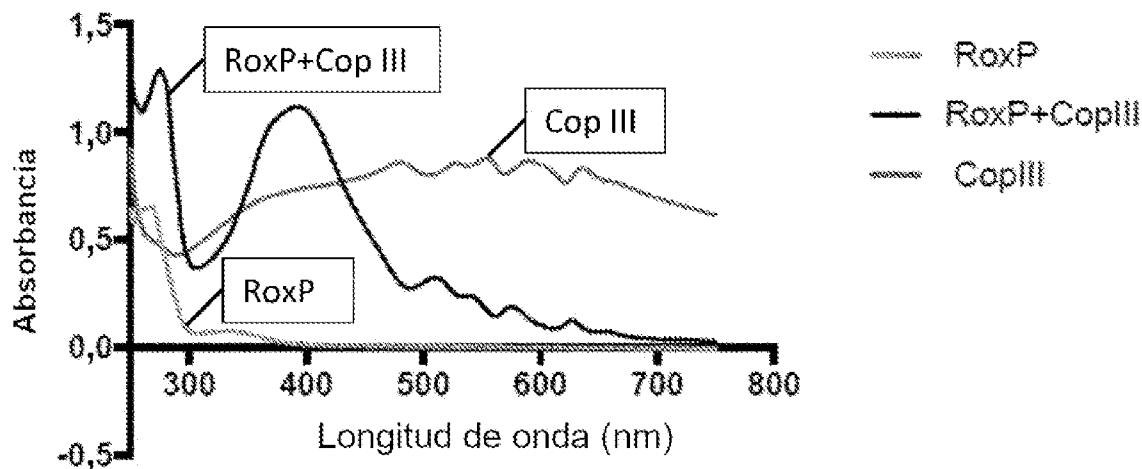


FIG. 27

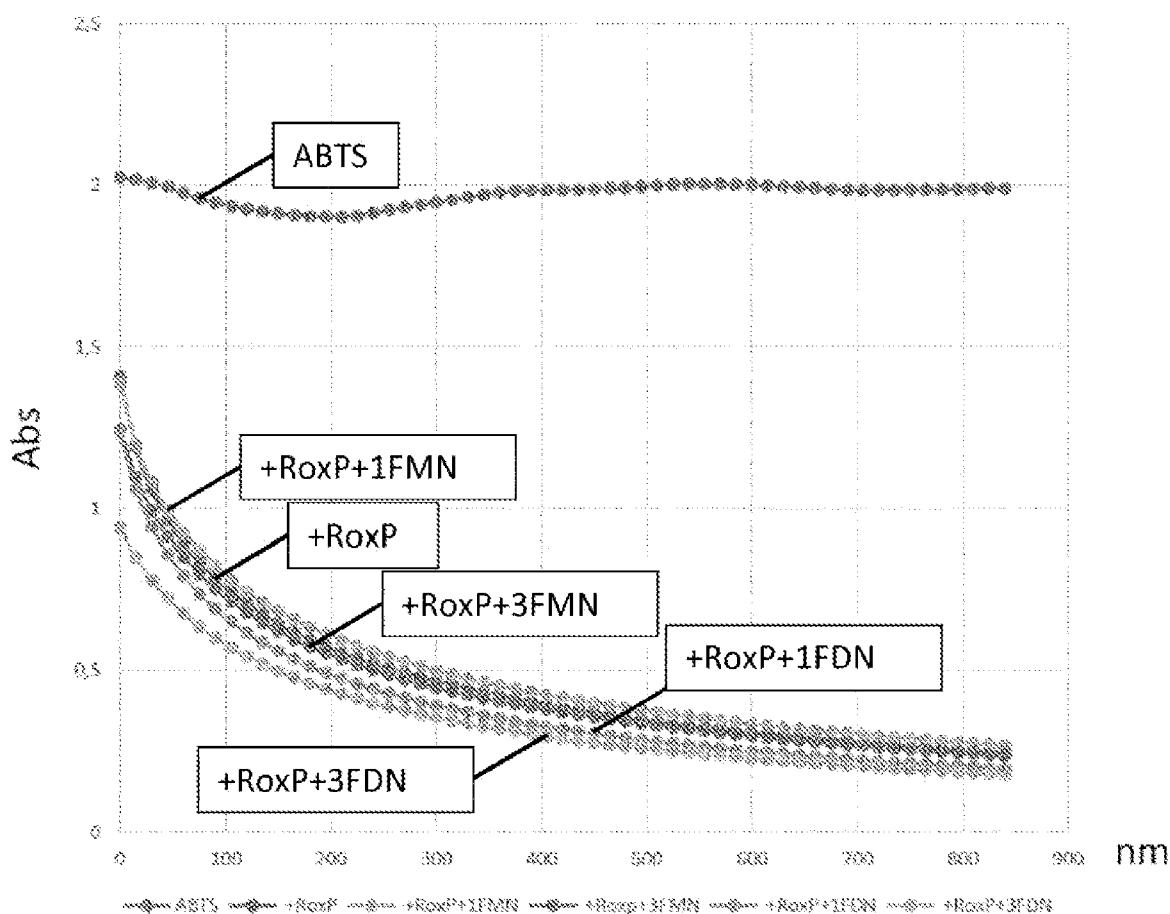


FIG. 28

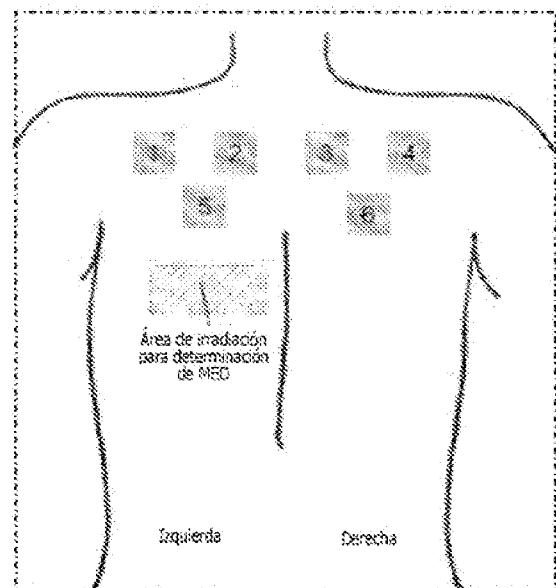


FIG. 29

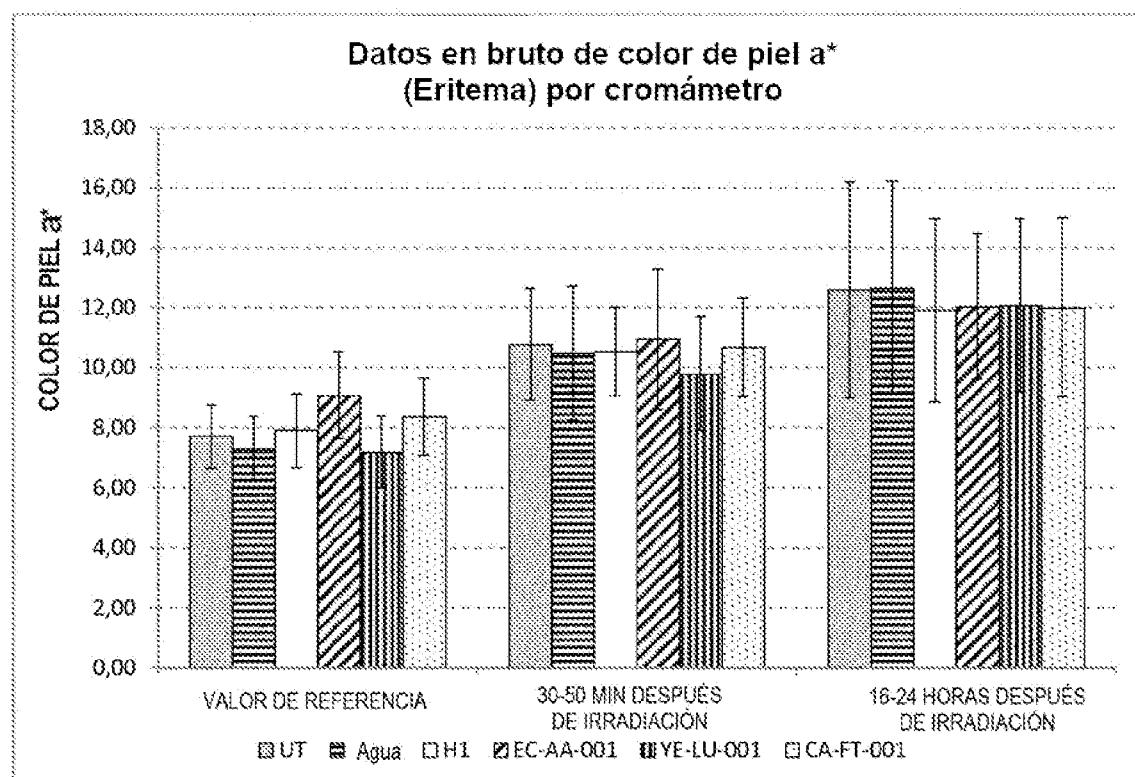


FIG. 30

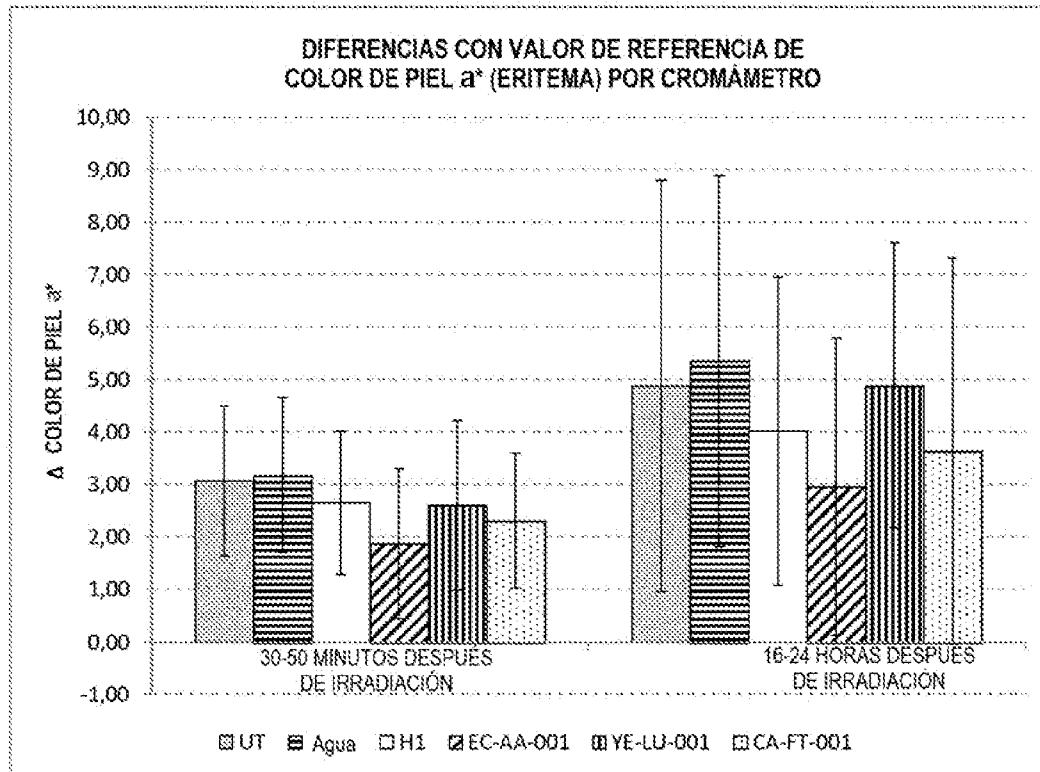


FIG. 31

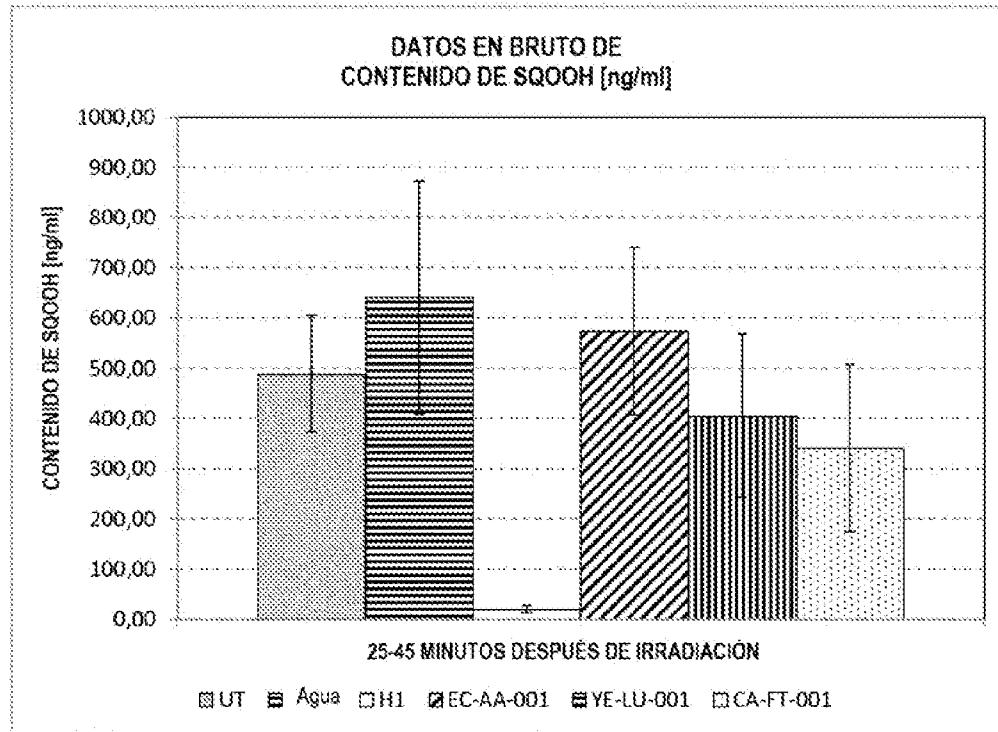


FIG. 32

