

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 289**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2017 PCT/GB2017/051372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2017 WO17199022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2017 E 17790804 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 3458078**

54 Título: **Composiciones de lisados de Lactobacillus rhamnosus y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.05.2016 GB 201608762

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

30.09.2024

73 Titular/es:

**SKINBIOTHERAPEUTICS PLC (100.0%)
The Core Newcastle Helix Bath Lane
Newcastle upon Tyne NE4 5TF, GB**

72 Inventor/es:

O'NEILL, CATHERINE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 980 289 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 de lisados de *Lactobacillus rhamnosus* y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que están formadas de, o imitan, lisados de bacterias probióticas o componentes de las mismas. La presente invención es particularmente adecuada para su uso en membranas cutáneas o mucosas.

10

Antecedentes de la invención

Los probióticos se han definido como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped". Habitualmente se ha informado que los probióticos miembros de los géneros de los lactobacilos y las bifidobacterias tienen efectos beneficiosos cuando se consumen por vía oral, tales como la prevención de diarrea asociada a antibióticos y la prevención de enfermedades atópicas. Los mecanismos utilizados por las bacterias para ejercer efectos positivos varían e incluyen la inhibición de la modulación de patógenos de la respuesta inmunitaria y la potenciación de la función de barrera epitelial. No obstante, en general, la naturaleza de las moléculas bacterianas subyacentes a la probiosis está poco caracterizada y, comparativamente, hay poca información disponible con respecto a los mecanismos moleculares que median los efectos observados de probióticos.

15

20

25

30

Dado que los probióticos pueden tener efectos positivos sobre el intestino, también se han comenzado a investigar sus efectos potenciales sobre otros sistemas, tales como la boca y el aparato urogenital. Un estudio que examina el efecto de la administración oral de lactobacilos en un ensayo clínico de mujeres con vaginosis bacteriana, mostró que los lactobacilos podrían inhibir la colonización de células uroepiteliales por patógenos. Recientemente, se ha investigado la aplicación tópica de probióticos a la piel en un número limitado de estudios. La aplicación tópica de cepas de *Streptococcus salivarius* sonicadas a pacientes que padecen dermatitis atópica dieron como resultado una función de barrera mejorada aparentemente mediante el aumento del nivel de ceramidas en el estrato córneo. La aplicación tópica de *L. plantarum* para el tratamiento de heridas infectadas dio como resultado una mejor reparación tisular en un modelo de quemaduras en ratón y la prevención de la infección en úlceras crónicas de las piernas y quemaduras en seres humanos. Sin embargo, en general, los mecanismos subyacentes a estos efectos no se entienden bien.

35

Se ha demostrado previamente que el mecanismo mediante el cual *L. rhamnosus* GG (también denominado en el presente documento LGG) se adhiere a moco intestinal involucra pili que se producen en la superficie de los LGG y que parecen promover la retención de LGG en el aparato gastrointestinal. La producción de pilus en LGG está codificada por la agrupación génica SpaCBA, habiéndose demostrado que la proteína SpaC es principalmente responsable de la alta actividad de unión a moco de LGG.

40

45

50

Los inventores han demostrado previamente que las bacterias probióticas y lisados de las mismas protegen las células contra la infección por bacterias patógenas tales como *S. aureus* (véanse los documentos WO2013/153358 y WO2015/181534). El *Staphylococcus aureus* es tanto un colonizador transitorio de la piel como un patógeno oportunista importante de la piel, que provoca enfermedades que varían desde el impétigo hasta afecciones potencialmente mortales tales como sepsis. Los inventores han demostrado ahora que los LGG pueden proteger los queratinocitos epidérmicos de los efectos tóxicos de *S. aureus*. Específicamente, el LGG inhibe la adhesión de *S. aureus* a queratinocitos humanos primarios y puede tanto excluir competitivamente como desplazar *S. aureus* de los sitios de unión a queratinocitos. Esto da lugar a un aumento de la supervivencia de los queratinocitos en presencia de *S. aureus*. Es importante destacar que los inventores han demostrado que este efecto se produce por un lisado de LGG desprovisto de células, lo que muestra que no eran necesarias bacterias vivas para lograr efectos positivos de LGG en la inhibición de la adhesión de *S. aureus*, y este descubrimiento se podrían usar en diversas aplicaciones de productos terapéuticos y cosméticos.

Sumario de la invención

55

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona una composición que comprende una fracción proteica derivada de una secreción o un lisado de *Lactobacillus rhamnosus*, en la que la fracción proteica consiste en la proteína C de biosíntesis de subtilina (SpaC), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), trifosfato isomerasa (TPI) y enolasa.

60

La invención también proporciona una composición que consiste en la proteína SpaC, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), trifosfato isomerasa (TPI) y enolasa.

65

En la descripción, pero sin formar parte de la invención reivindicada, se cita una fracción proteica en la que las proteínas tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 90 kDa, o un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 90 kDa. De forma más preferida, las proteínas tienen un peso molecular en

el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 90 kDa. De la forma más preferida, las proteínas tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 27 kDa a aproximadamente 90 kDa.

La fracción proteica descrita comprenderá preferentemente la proteína C de biosíntesis de subtilina (SpaC) y proteínas que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 50 kDa, y opcionalmente uno o más exopolisacáridos. Si la fracción proteica comprende SpaC, entonces se prefiere que también comprenda proteínas que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 49 kDa, hasta aproximadamente 48 kDa, o hasta aproximadamente 47 kDa. Si la fracción proteica comprende SpaC, entonces también puede comprender proteínas que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a 50 kDa, o en el intervalo de aproximadamente 25 kDa a aproximadamente 49 kDa, o en el intervalo de aproximadamente 26 kDa a aproximadamente 48 kDa, o en el intervalo de aproximadamente 27 kDa a aproximadamente 47 kDa.

Preferentemente, las proteínas que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 50 kDa comprenden una o más de las siguientes: gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), trifosfato isomerasa (TPI) y/o enolasa.

También se describe una composición que comprende la proteína SpaC y una o más de las siguientes proteínas: gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), trifosfato isomerasa (TPI), enolasa, proteína portadora de acilo, factor de elongación de la transcripción greA, fosfopentomutasa, proteína ribosómica 50S S11, dihidroxicetona quinasa, proteína ribosómica 50s, asparaginil ARNt sintetasa, proteína UPF0342 y/o proteína ribosómica 50S L22.

Las, una o más, proteínas siguientes pueden comprender: gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), trifosfato isomerasa (TPI) y/o enolasa.

Si se desea, una o más de las proteínas pueden ser recombinantes y/o estar derivadas de una secreción o un lisado de un probiótico. Si una o más de las proteínas se derivan de una secreción o un lisado de un probiótico, se prefiere que el probiótico sea *L. rhamnosus*. Si una o más de las proteínas son recombinantes, se prefiere que estas proteínas tengan una secuencia de aminoácidos que sea idéntica o similar a la proteína presente en *L. rhamnosus*. Será evidente para el experto que la secuencia de aminoácidos puede optimizarse con respecto a la expresión y/o la actividad biológica.

Las invenciones y las composiciones descritas se refieren particularmente a bacterias probióticas de la especie *Lactobacillus rhamnosus*. Dichas bacterias se consideraron originariamente una subespecie de *Lactobacillus casei*, pero la posterior investigación genética descubrió que era una especie propia. Se conoce una serie de cepas de *L. rhamnosus*. Por ejemplo, las cepas I-1720 (Pasteur collection Nationale de Cultures de Microorganismes), AC413, GR-1 (Karlsson et al., BMC microbiology 2012, 12:15), JB-1 (Bravo et al., PNAS 2011 108(38) 16050-16055) GG y LC705 (Savijok et al., J. Proteome Research 2011 10(8) 3460-3474). Otras cepas de *L. rhamnosus* puede aislarse fácilmente.

En particular, la invención y las composiciones descritas se refieren a *L. rhamnosus* GG. El *L. rhamnosus* GG (también denominado en el presente documento LGG) está depositado en la ATCC (American Tissue Culture Collection) con el número de acceso ATCC 53103. El LGG se aisló en 1983 del aparato intestinal de un ser humano sano por Gorbach y Goldin.

Las composiciones pueden comprender además uno o más ingredientes o excipientes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables.

Las composiciones pueden comprender también un vehículo. El vehículo es generalmente una solución en la que el material secretado o lisado se disuelve, se suspende, se diluye o se mezcla.

En algunos casos, el vehículo puede comprender el medio que ha estado en contacto con la bacteria durante el cultivo. La composición del medio habrá cambiado durante el cultivo, por ejemplo, mediante la secreción de material por la bacteria. Las composiciones pueden consistir en, o comprender, medio de cultivo en el que se han cultivado las bacterias.

Los medios adecuados para cultivar bacterias (tales como *L. rhamnosus*) son bien conocidos por el experto en la técnica. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "medios" y "medio" abarcan cualquier líquido que contiene nutrientes en el que las bacterias pueden soportarse, mantenerse vivas, cultivarse y/o expandirse. Los medios pueden contener los nutrientes mínimos para soportar vida bacteriana, y opcionalmente otros nutrientes. Los ejemplos de nutrientes contenidos dentro del caldo incluyen azúcar, magnesio, fosfato, fósforo y azufre. Los medios pueden prepararse, o modificarse, a partir de una combinación de nutrientes que es bien conocida en la técnica, tal como caldo de Wilkins-Chalgren. Los medios pueden obtenerse premezclados a partir de una fuente comercial, o pueden producirse mediante producción propia.

Preferentemente, la composición está desprovista de células y no contiene ninguna célula bacteriana viva. Las células bacterianas completas pueden haberse eliminado del medio, por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración. Por

ejemplo, las bacterias pueden eliminarse sedimentándolas a partir del medio en una centrifugadora a 15.000 x g durante un periodo de tiempo suficiente para que sustancialmente todas las bacterias sedimenten a partir del medio. Los medios pueden filtrarse usando un filtro microporoso con poros de un tamaño adecuado para eliminar sustancialmente todas las bacterias de los medios. Estos procedimientos pueden eliminar bacterias intactas, y también pueden eliminar residuos bacterianos, si el extracto se deriva por lisis celular.

La composición puede ser estéril. Esto quiere decir que la composición se ha sometido a un proceso de esterilización, tal como mediante irradiación, calor, productos químicos, presión o filtración, o cualquier combinación de los mismos. Sin embargo, tales procedimientos de esterilización deben adaptarse para no dañar o reducir la eficacia de las proteínas relevantes. En el caso de medios que contienen un extracto, los medios pueden haberse esterilizado antes de que las bacterias probióticas se hayan introducido y cultivado, y también después de que las bacterias se hayan retirado de esos medios.

En algunos casos, el extracto de la composición no contiene sustancialmente ninguna bacteria intacta. La composición también puede estar sustancialmente desprovista de bacterias lisadas o fragmentos bacterianos. Las bacterias intactas y/o bacterias lisadas o fragmentos bacterianos pueden haberse separado del extracto. La separación puede producirse mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tal como centrifugación o filtración. Por "sustancialmente desprovista de" se entiende que el extracto no contiene contaminación de componentes bacterianos no secretados, tales como bacterias completas, bacterias lisadas o fragmentos bacterianos, o contiene una contaminación mínima. Por lo tanto, la composición puede contener el 100% de extracto, al menos el 99% de extracto, al menos el 95% de extracto, al menos el 90% de extracto, al menos el 85% de extracto, al menos el 80% de extracto, al menos el 75% de extracto o al menos el 70% de extracto. El extracto puede comprender componentes adicionales de origen no bacteriano, tales como soluciones portadoras, otros agentes activos o conservantes, tal como se describen en el presente documento.

Las composiciones tal como se describen en el presente documento pueden prepararse cultivando una bacteria en un medio, separando las bacterias del medio y preparando una composición a partir del medio. Las bacterias pueden cultivarse en condiciones anaerobias. Las bacterias pueden cultivarse a una temperatura superior a la temperatura normal del cuerpo humano. Las bacterias pueden cultivarse a 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C o 41°C. Preferentemente, las bacterias se cultivan a 37°C. Las bacterias pueden cultivarse en el medio durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días. Las bacterias o bacterias lisadas o fragmentos bacterianos pueden separarse del medio por centrifugación, tal como centrifugación a 15000 x g. El medio puede separarse de las bacterias, bacterias lisadas o fragmentos bacterianos por filtración. El medio puede separarse mediante una combinación de filtración y centrifugación. El medio puede someterse a esterilización, antes o después de que se eliminen las bacterias. Por ejemplo, después de la separación del medio de las bacterias completas, bacterias lisadas o fragmentos bacterianos, el medio puede someterse a esterilización. El medio pueden someterse a una concentración, de manera que la proporción de extracto aumente con respecto al volumen total de medio. La concentración puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como evaporación. El extracto puede separarse del medio. Puede usarse cualquier procedimiento para separar material de una solución portadora. Por ejemplo, el extracto puede separarse del medio por cromatografía, cristalización, destilación, secado, electroforesis o precipitación. Una vez aislado del medio, o concentrado en el medio, el extracto puede disolverse o diluirse en un vehículo, o formularse de otro modo en una composición tal como se divulga en el presente documento.

El extracto puede haberse sometido a uno o más procedimientos para obtener la fracción proteica relevante. La fracción proteica puede haberse obtenido usando fraccionamiento con acetonitrilo o cualquier otra técnica de fraccionamiento adecuada.

Las composiciones son útiles en el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades y afecciones. En particular, son útiles para la mejora de la salud de la piel y para el tratamiento, la gestión y la prevención de infecciones cutáneas, incluidas infecciones bacterianas. En particular, los compuestos y las composiciones son útiles en el tratamiento, la gestión o la prevención de infecciones por *S. aureus*. Los compuestos y las composiciones son particularmente útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas de tejidos blandos, tales como infecciones cutáneas. Los compuestos y las composiciones descritas son particularmente útiles en la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en la piel.

Las composiciones descritas pueden usarse para la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones. Las composiciones pueden formularse para su uso como una composición antimicrobiana. Las composiciones antimicrobianas pueden presentar un amplio espectro de actividad contra una diversidad de microorganismos (tales como bacterias, virus y levaduras). La composición puede formularse para su uso como una composición antibacteriana. En particular, la composición puede formularse para su uso en la inhibición de la colonización, o la prevención de la recolonización, por un microbio. Las composiciones probióticas descritas presentan actividad antiinfecciosa. Por ejemplo, actividad antiadhesión, incluidos la prevención de la adhesión de células *S. aureus* y el aumento de la migración y la proliferación de queratinocitos que mejoran la barrera de la piel frente a la infección. Por lo tanto, las composiciones son útiles para la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones, incluidas infecciones microbianas, tales como la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes

a múltiples fármacos, infecciones bacterianas adquiridas en hospitales, infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, infecciones por infecciones bacterianas gram negativas y/o gram positivas. Las composiciones también son útiles para su uso en la prevención, la gestión y el tratamiento de una colonización microbiana.

- 5 Las composiciones descritas son útiles en la prevención de infecciones microbianas por *Staphylococcus spp.*, tales como *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. lugdenensis*, *S. schleiferi*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) y las especies de *Streptococcus S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. mutans* y *S. pneumoniae*.
- 10 En particular, las composiciones descritas muestran actividad anti-adhesión de *Staphylococcus*, y por lo tanto son útiles en la prevención, la gestión o el tratamiento de infección por *Staphylococcus*. Por ejemplo, las composiciones descritas muestran actividad anti-*Staphylococcus aureus*, y por lo tanto son útiles en la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones por *S. aureus*.
- 15 Las infecciones se producen allí donde los microorganismos causantes de enfermedades invaden los tejidos del cuerpo. La multiplicación de esos microorganismos y las toxinas que producen reaccionan con los tejidos del cuerpo, provocando a menudo reacciones inmunitarias por el huésped infectado. Las infecciones pueden producirse a través de cualquiera de los tejidos del cuerpo. En el presente documento se describe el tratamiento, la gestión o la prevención de la infección de la superficie externa del cuerpo, y particularmente de la piel. Sin embargo, también se describe el
- 20 tratamiento, la gestión o la prevención de la infección de una membrana mucosa, y particularmente las membranas mucosas del aparato respiratorio y del aparato genital. También se describe el tratamiento, la gestión o la prevención de infecciones de membranas mucosas del aparato gastrointestinal.
- 25 Las composiciones descritas pueden usarse en la prevención, la gestión o el tratamiento de infecciones cutáneas. Las composiciones descritas también pueden usarse en la prevención, la gestión de la colonización y en particular la colonización de la piel. La infección puede deberse a una bacteria, tal como una especie de estafilococos, incluidas *S. aureus*, y MRSA. La composición puede aplicarse por separado, secuencialmente o simultáneamente con la exposición al agente infeccioso. Preferentemente, la composición se aplica antes de la exposición al agente infeccioso.
- 30 Las composiciones descritas se usan preferentemente para la prevención y la gestión de la infección bacteriana. Se administran preferentemente a un sujeto antes de que ese sujeto se exponga al agente infeccioso, tal como *S. aureus*. El sujeto puede haberse identificado como un sujeto en riesgo de infección por el agente infeccioso. Los sujetos pueden identificarse como sujetos en riesgo de infección por un agente infeccioso debido a su entorno, por ejemplo, al estar situados en un entorno en el que se sabe que existe el agente de la invención, o debido a la salud del sujeto,
- 35 tal como la existencia de una herida abierta o una salud inmunitaria deficiente. Por ejemplo, las composiciones pueden usarse en un hospital u otro entorno clínico en el que una bacteria patológica se sabe que, o se sospecha que, está presente, o existe la necesidad de prevenir la colonización por un organismo resistente a antimicrobianos tal como MRSA.
- 40 En algunos casos, el paciente está a punto de someterse, o se ha sometido recientemente, a cirugía. Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para prevenir la infección de una herida abierta tal como una incisión quirúrgica o injerto por una bacteria patógena o reducir el riesgo de infección previniendo la colonización de sitios corporales.
- 45 En algunos casos, se determina que el sujeto no tiene una infección por el agente infeccioso. Por ejemplo, se puede determinar que el sujeto no tiene una infección por *S. aureus*. Los procedimientos para determinar si un sujeto tiene una infección son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el análisis de una muestra obtenida del sujeto para determinar la presencia del agente infeccioso.
- 50 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección que se debe tratar.
- 55 La composición puede disolverse en, suspenderse en, o mezclarse con, uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables.
- 60 La composición puede proporcionarse como una suspensión en un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- También se describen composiciones antibacterianas en forma de productos de limpieza, productos de lavado, revestimientos superficiales u otras composiciones que no son para el tratamiento médico del cuerpo humano o animal.
- La composición puede ser para su uso en la disminución de la adhesión de una bacteria estafilocócica desde un sustrato.

Dichas composiciones pueden ser útiles para eliminar, destruir o prevenir la acumulación, colonización o recolonización de bacterias en una superficie, o inhibir la acción o el crecimiento de las bacterias. La composición se formula como una composición antibacteriana.

5 Las composiciones antibacterianas pueden ser útiles para tratar biomateriales, implantes y prótesis (incluidas endoprótesis vasculares, válvulas, ojos, prótesis auditivas, bandas gástricas, dentaduras postizas, reemplazos artificiales de articulaciones, etc.), instrumentos quirúrgicos u otros dispositivos médicos antes de la administración a, o el tratamiento de, o el uso con, un paciente o sujeto. Las composiciones antibacterianas pueden ser útiles para tratar superficies propensas a la colonización por, o la exposición a, bacterias, tales como pasamanos, superficies de preparación de alimentos, superficies o equipos de cocina, mesas, fregaderos, inodoros u otros accesorios de baño.

10 Las composiciones antibacterianas pueden comprender agentes además del lisado, tales como agentes de limpieza, estabilizantes, tensioactivos aniónicos, perfumes, agentes quelantes, ácidos, álcalis, tampones o detergentes. Dichos agentes pueden facilitar o potenciar las propiedades antibacterianas del agente, tales como destruir o inhibir bacterias, o prevenir la recolonización de la superficie limpiada.

15 También se describe un procedimiento para preparar una superficie que comprende aplicar la composición a la superficie. El procedimiento puede dar como resultado una reducción en la colonización de la superficie por microorganismos patógenos.

20 La composición puede formularse para su uso como modificador de queratinocitos. El modificador puede potenciar la proliferación y/o la migración de queratinocitos. El modificador se puede usar para mejorar la reparación de la piel y/o de heridas.

25 La composición puede ser para su uso en el tratamiento o la gestión de una afección que implica queratinocitos o piel dañada, trastornos de la piel o el cuidado de heridas.

También se describe una composición para su uso como una preparación cosmética para la piel.

30 También se describe el uso de la composición tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para la gestión o el tratamiento de una afección que implica queratinocitos o piel dañada.

35 También se describe el uso de la composición tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento o producto cosmético para la potenciación de la proliferación y/o la migración de queratinocitos.

40 Aunque es posible que la composición se use sola, se prefiere presentarla como una formulación que comprende el material y un vehículo. La composición puede disolverse, suspenderse o mezclarse con uno o más de otros ingredientes. En algunos casos, la composición se presenta en un liposoma u otra micropartícula. Las formulaciones divulgadas en el presente documento incluyen formulaciones para el cuidado de la piel, el cuidado de heridas, el cuidado respiratorio y el cuidado oral, incluyendo productos y tratamientos médicos, de cuidado personal y de consumo para prevenir o reducir la incidencia de infecciones adquiridas en el cuidado de la salud.

45 Las formulaciones pueden presentarse, de forma adecuada, en forma de líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, de aceite en agua, de agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, enjuagues bucales, gotas, comprimidos (incluidos, por ejemplo, comprimidos recubiertos), gránulos, polvos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas (incluidas, por ejemplo, cápsulas de gelatina duras y blandas), sellos, píldoras, ampollas, bolos, supositorios, pesarios, tinturas, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, espumas, pulverizaciones, neblinas o aerosoles.

50 Las formulaciones pueden proporcionarse de forma adecuada como un parche, emplastro adhesivo, vendaje, apósito o similares que se impregna con uno o más compuestos activos y opcionalmente uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, incluidos, por ejemplo, potenciadores de la penetración, permeación y absorción. Las formulaciones también pueden proporcionarse adecuadamente en forma de un depósito o reservorio.

55 En algunas formulaciones, la composición se formula con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. Los ingredientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

60 Determinados productos y formulaciones del presente documento son adecuados para el cuidado de la piel o el cuidado de heridas. "Cuidado de la piel" significa productos de cuidado personal y/o cuidado de la salud tópicos que incluyen productos útiles para el tratamiento de la piel de un adulto o un neonato para mantener o mejorar la salud de

- la piel o mejorar el aspecto de la piel. El cuidado de la piel también puede abarcar determinadas afecciones cutáneas, tales como dermatitis atópica, psoriasis y eczema. "Cuidado de heridas" incluye productos para el tratamiento de una herida para ayudar en el cierre o cicatrización de la herida, y/o para reducir el dolor de cicatrización asociado con la herida, mantener o mejorar la salud de tal tejido o piel, reparar tal tejido o piel, y reducir la irritación, el picor y/o el enrojecimiento de tal tejido o piel.
- Las composiciones descritas pueden formularse para administración tópica, particularmente para su uso o aplicación a, o sobre, la piel.
- Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendajes, apósitos, depósitos, cementos, colas y reservorios.
- Los ungüentos se preparan normalmente a partir de la composición y una base de ungüento parafínica o miscible en agua.
- Las cremas se preparan normalmente a partir del extracto y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30% p/p de un alcohol polihidroxílico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma deseable un compuesto que potencie la absorción o la penetración del compuesto activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.
- Las emulsiones se preparan normalmente a partir de la bacteria o el lisado probiótico y una fase oleosa, que pueden comprender opcionalmente simplemente un emulsionante (conocido también como emulgente), o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el o los emulsionantes con o sin el o los estabilizantes constituyen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y/o la grasa constituyen la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase dispersa oleosa de las formulaciones de crema.
- Los emulsionantes y estabilizantes de la emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol mirístico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio. La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto activo en la mayor parte de los aceites que probablemente se usarán en formulaciones de emulsión farmacéutica puede ser muy baja. Por lo tanto, la crema debe ser preferentemente un producto no graso, que no manche y que pueda lavarse con una consistencia adecuada para evitar fugas de tubos u otros recipientes. Se pueden usar ésteres alquílicos monobásicos o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los últimos tres ésteres preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.
- Algunos productos y formulaciones descritos en el presente documento son adecuados para el cuidado oral. "Cuidado oral" significa productos para su uso y/o usos de materiales en la cavidad oral o cualquier parte de la misma, incluidos productos para su uso en los dientes, mucosas, lengua y similares. Los productos y usos en el ámbito del cuidado bucal incluyen los destinados a la estética dental que incluye, por ejemplo, blanqueamiento dental, prevención de manchas y similares, así como actividades antiplaca, antigingivitis, antisensibilidad, anticaries, refrescamiento del aliento, alivio de la boca seca, reparación y prevención de erosión, suministro y retención activos, potenciación sensorial y alteración de la sensación en la boca, y similares.
- Las formulaciones para el cuidado oral incluyen pulverizaciones dentales, enjuagues bucales, pastas dentales, pastillas para chupar, lavados antibacterianos, bebidas (por ejemplo, leche, yogur), artículos alimenticios (tales como yogur, helado, barras de caramelo) o alimentos en polvo (tales como leche en polvo). Las formulaciones adecuadas para el cuidado oral incluyen formulaciones adecuadas para la administración oral y/o bucal.
- Las formulaciones adecuadas para administración oral (por ejemplo, por ingestión) incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, de aceite en agua, de agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, píldoras, ampollas, bolos.
- Las formulaciones adecuadas para administración bucal incluyen enjuagues bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios. Las pastillas para chupar generalmente comprenden el compuesto activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto. Las pastillas

comprenden normalmente el compuesto activo en una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica. Los enjuagues bucales comprenden normalmente el compuesto activo en un vehículo líquido adecuado.

5 Algunas formulaciones divulgadas en el presente documento se proporcionan adecuadamente como un parche, emplastro adhesivo, vendaje, apósito o similares que se impregna con, o se recubre con, una o más composiciones tal como se describen en el presente documento y opcionalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables distintos, incluidos, por ejemplo, potenciadores de la penetración, la permeación y la absorción. La composición también puede proporcionarse en forma de revestimientos para dispositivos médicos tales como implantes, prótesis, instrumentos quirúrgicos, guantes, catéteres, válvulas, marcapasos y similares.

10 Algunas composiciones y formulaciones divulgadas en el presente documento son adecuadas para el cuidado respiratorio. "Cuidado respiratorio" significa productos para el tratamiento de afecciones que incluyen la prevención y el tratamiento de rinitis, sinusitis, alergias estacionales, congestión nasal y resfriados. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir la colonización bacteriana o la infección del aparato respiratorio, incluidas las fosas nasales, los senos nasales, las vías respiratorias, la garganta o los pulmones. En algunos casos, tales formulaciones se formulan para administración intranasal o administración pulmonar.

15 Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, en las que el vehículo es un líquido, incluyen, por ejemplo, pulverización nasal, gotas nasales, o administración en aerosol mediante un nebulizador, e incluyen soluciones acuosas u oleosas del compuesto activo.

20 Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen, por ejemplo, las presentadas como un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros que se administra de la manera en que se consume el rapé, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente para el polvo mantenido cerca de la nariz.

25 Las formulaciones adecuadas para administración pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación) incluyen las presentadas como una pulverización en aerosol desde un envase presurizado, con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados.

30 Las composiciones y las formulaciones descritas en el presente documento pueden comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes antibacterianos tales como agentes bactericidas.

35 En algunas formas de realización, una formulación tal como se describe en el presente documento puede comprender al menos aproximadamente el 0,01%, aproximadamente el 0,05%, aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,2%, aproximadamente el 0,3%, aproximadamente el 0,4%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 0,6%, aproximadamente el 0,7%, aproximadamente el 0,8%, aproximadamente el 0,9%, aproximadamente el 1,0%, aproximadamente el 1,5%, aproximadamente el 2,0%, aproximadamente el 3,0%, aproximadamente el 4,0%, aproximadamente el 5,0%, aproximadamente el 6,0%, aproximadamente el 7,0%, aproximadamente el 8,0%, aproximadamente el 9,0%, aproximadamente el 10,0%, aproximadamente el 11,0%, aproximadamente el 12,0%, aproximadamente el 13,0%, aproximadamente el 14,0%, aproximadamente el 15,0%, aproximadamente el 16,0%, aproximadamente el 17,0%, aproximadamente el 18,0%, aproximadamente el 19,0%, aproximadamente el 20,0%, aproximadamente el 25,0%, aproximadamente el 30,0%, aproximadamente el 35,0%, aproximadamente el 40,0%, aproximadamente el 45,0%, aproximadamente el 50,0% en peso de la composición.

40 En algunas formas de realización, la formulación puede comprender uno de al menos aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 30%, aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 20%, aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 30%, aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 20%, aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 15%, aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 10%, aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,4% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 5%, aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10, aproximadamente el 5%, en peso de la composición.

50 Las preparaciones probióticas descritas en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas para uso clínico y pueden comprender un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Pueden formularse para administración tópica.

60 La administración es preferentemente en una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz, siendo esta una cantidad suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el transcurso temporal de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos de medicina general y otros médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que se va a tratar o prevenir, el estado general del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de

administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins. Un experto en la técnica apreciará que las dosificaciones apropiadas de los compuestos activos y las composiciones que comprenden los compuestos activos pueden variar de paciente a paciente.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse como medicamentos, es decir, formularse como un medicamento o un dispositivo médico. El medicamento puede incluir otros ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero sin limitación, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse como cosméticos, es decir, formularse como un producto cosmético. El producto cosmético puede incluir otros ingredientes cosméticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero sin limitación, vehículos, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes de fragancia cosméticamente aceptables.

Los aspectos y formas de realización de la presente invención se ilustrarán ahora, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Serán evidentes para los expertos en la técnica aspectos y formas de realización adicionales.

Breve descripción de las figuras

A continuación se explicarán formas de realización y experimentos que ilustran los principios de la invención con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Figura 1: Proteínas median los efectos del lisado de LGG contra *S. aureus*.

A: Una combinación de *S. aureus* (S.a) y lisado de *L. rhamnosus* GG (Lis Lgg) dio como resultado un porcentaje significativamente mayor de queratinocitos viables que en monocapas infectadas con *S. aureus* solo ($p = 0,006$). Todos los datos se comparan con la viabilidad de monocapas no tratadas (Con). El tratamiento con calor (Lgg + calor) o proteasa (Lgg+trip) destruyó la capacidad del lisado para proteger a los queratinocitos de *S. aureus*.

B: Cuando el lisado se fraccionó y las proteínas se eluyeron en acetonitrilo al 10-70%, las proteínas con eficacia contra *S. aureus* estaban contenidas en fracciones del 30-60%. NS = no significativo. * indica datos significativos.

Figura 2: Fracciones específicas inhiben la adhesión de estafilococos a queratinocitos.

A: Las células pretratadas con lisado de *L. rhamnosus* GG (lis LGG) tenían significativamente menos estafilococos adherentes en comparación con las células infectadas solo con *S. aureus* (SA). La adhesión del patógeno a los queratinocitos fue significativamente inferior en los cultivos tratados con fracciones que eluyen en acetonitrilo al 30%, 40%, 50% y 60% ($P=0,01$, $P=0,016$, $P=0,012$, $P= 0,015$, respectivamente, $n = 3$).

B: Las mismas fracciones también fueron eficaces cuando se añadieron a los queratinocitos 2 horas después de la incubación con patógeno ($P=0,034$, $P=0,035$, $P=0,01$, $P= 0,033$ para 0%, 40%, 50% y 60% respectivamente, $n = 3$). No hubo diferencia entre las cantidades de estafilococos adherentes a células expuestas a fracciones de acetonitrilo al 20% en cualquier ensayo ($P= 0,06$, $n = 3$). Sin embargo, hubo una diferencia significativa en el número de estafilococos adherentes a células expuestas a una fracción de acetonitrilo al 50% en comparación con otras fracciones en ambos ensayos ($**P= 0,02$). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, $*P < 0,05$. N.S = no significativo.

Figura 3: La proteína SpaC de pilus está involucrada en la función antiadhesiva del lisado

A: La inmunotransferencia con suero anti-SpaC específico demostró la presencia de la proteína SpaC en la fracción del 50%.

B: La SpaC recombinante (rSpaC) inhibió la adhesión de estafilococos a queratinocitos de una forma dependiente de la dosis, proporcionando 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de rSpaC una protección significativa (0,03 y 0, 013 respectivamente).

C: 50 $\mu\text{g/ml}$ de BSA no inhibieron la adhesión de estafilococos.

Figura 4: La SpaC protege los queratinocitos de los efectos tóxicos de *S. aureus*.

A: La SpaC recombinante (rSpaC) a 50 ug/ml proporcionó una protección significativa a la viabilidad de la monocapa de queratinocitos en presencia de *S. aureus* (S.a) ($p=0,013$). Sin embargo, esta fue significativamente inferior que la protección proporcionada por el lisado completo (Lis Lgg, $p=0,008$).

B: Por el contrario, una cepa deficiente en SpaC de LGG (KO SpaC) todavía era capaz de proteger los queratinocitos.

Todos los datos se compararon con la viabilidad de la monocapa no tratada (Con).

Ejemplos**Ejemplo 1: Procedimientos****Cultivo de células bacterianas**

Se cultivó *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) en condiciones anaerobias en caldo Wilkins-Chalgren a 37°C, y se cultivó *Staphylococcus aureus* en condiciones aerobias en caldo nutriente (Oxoid) tal como se describe por Mohammedsaeed et. al. (2014) y Prince et. al. (2011) (Mohammedsaeed M., et al., (2014). Appl. Environ. Microbiol. 80(18):5773 y Prince T. et. al., (2011) Appl Environ. Microbiol. 78(15):5119-26). La inactivación (*knock-out*) de SpaC de LGG se produjo tal como se describe por Lebeer et. al. (2012) (Lebeer S., et al., (2012). Appl Environ. Microbiol. 78: 185-193). El lisado de LGG se produjo según el protocolo publicado por Mohammedsaeed et al., (2014). En algunos experimentos que investigan la implicación de las proteínas, el lisado se dispuso en un baño de agua en ebullición durante 5 min, o se trató con tripsina (0,2% p/v) en solución salina tamponada con fosfato durante 1 h a 37°C para desnaturalizar las proteínas.

Fraccionamiento del lisado de *L. rhamnosus* GG

Una preparación de 30 ml de lisado de LGG se ajustó a pH 5,8 usando ácido trifluoroacético al 0,1% y se aplicó a una columna Strata XL (tamaño de poro 100 μm , Phenomenex Ltd, Cheshire, Reino Unido). Las proteínas unidas se eluyeron desde la columna en 60 ml de metanol al 90% a pH 2. La muestra se centrifugó en un sistema de evaporación centrífuga durante 3 h (Biotek, Bedfordshire, Reino Unido) y la muestra resultante (5 ml) se aplicó a un cartucho Sep-Pak C18 de 5 ml (tamaño de poro 37-55 μm , Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido). Las proteínas se eluyeron usando partes alícuotas de 5 ml de concentraciones crecientes de acetonitrilo al 10-70% (v/v) que contenían el 0,1% (v/v) de solución de TFA. Cada fracción de 5 ml se recogió en un tubo aparte y las fracciones eluidas se evaporaron para eliminar el acetonitrilo durante 3 h en un sistema de evaporación centrífuga (Biotek, Bedfordshire, Reino Unido). El 1 ml resultante de cada fracción se sometió a análisis de SDS-page y se tiñó con Instant Blue (Harston, Cambridgeshire, Reino Unido) para visualizar las bandas de proteína. Las fracciones se mantuvieron a 4°C para un análisis posterior en ensayos de adhesión y viabilidad. Para aumentar la concentración y la purificación, las fracciones más eficaces se separaron posteriormente mediante HPLC usando una columna Jupiter 90A (Phenomenex, Cheshire, Reino Unido) con un gradiente de acetonitrilo al 10-99% aplicado a lo largo de 50 min.

Análisis espectrofotométrico de masas en tándem de fracciones proteicas

La identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem (EM/EM) se realizó usando el procedimiento "*gel top*". Las proteínas se separaron electroforéticamente durante 10 minutos a 150 V mediante SDS-PAGE y después se tiñeron usando Instant Blue. Las bandas de interés se escindieron del gel y se deshidrataron usando acetonitrilo seguido de centrifugación al vacío. Los trozos de gel secados se redujeron con ditiotreitól 10 mM y se alquilaron con yodoacetamida 55 mM. Después, los trozos de gel se lavaron alternativamente con bicarbonato de amonio 25 mM seguido de acetonitrilo. Esto se repitió, y los trozos de gel se secaron por centrifugación al vacío. Las muestras se digirieron con tripsina durante la noche a 37°C. Las muestras digeridas se analizaron por CL-EM/EM usando un CL de separación rápida UltiMate® 3000 (RSLC, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las mezclas de péptidos se separaron usando un gradiente del 92% de A (0,1% de FA en agua) y el 8% de B (0,1% de FA en acetonitrilo) al 33% de B, en 44 min a 300 nl min⁻¹ usando una columna analítica 75 mm x 250 μm i.d. 1,7 μm BEH C18 (Waters). Los péptidos se seleccionaron para fragmentación automáticamente mediante análisis dependiente de datos. Los datos producidos se buscaron usando el motor de búsqueda de base de datos Mascot (Matrix Science UK). Los datos se validaron usando Scaffold (Proteome Software, Portland, OR).

Crecimiento de queratinocitos humanos primarios, ensayos de viabilidad y adhesión

Los queratinocitos humanos primarios y los ensayos de adhesión y viabilidad asociados se realizaron exactamente tal como se describe por Mohammedsaeed et. al. (2014).

Producción de SpaC recombinante

Un constructo de plásmido de expresión (pKTH5319) que consiste en el gen SpaC de *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) que codifica la cadena principal (residuos 31-302) pero que carece de las regiones del péptido señal N-terminal y del motivo de clasificación C-terminal se produjo según el protocolo mencionado por Kankainen et. al. (2009) (Kankainen M., et. al, (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106(40): 17193-8). La pilina de SpaC recombinante se marcó con hexahistidina en el extremo C-terminal. La expresión de proteína recombinante en células de *Escherichia coli* BL21 se indujo después mediante la adición de isopropil-d-1-tiogalactopiranosido 1 mM después de lo cual el cultivo se cultivó durante la noche a 18°C. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en un tampón de lisis que consistía en NaH₂PO₄ 40 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa desprovisto de EDTA (Roche Ltd, Sussex, Reino Unido). El lisado celular se centrifugó después a 48.400 x g durante 20 min y el lisado desprovisto de células se cargó en una columna HiTrap HP quelante cargada con 5 ml de NiCl₂ (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido) que se había equilibrado previamente con un tampón que contenía NaH₂PO₄ 40 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. La proteína SpaA unida a resina se eluyó después con tampón que contenía NaH₂PO₄ 40 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM usando un gradiente lineal equivalente a diez volúmenes de columna. Las fracciones que contenían SpaC se determinaron mediante SDS-PAGE, se reunieron y se dializaron frente a HEPES 20 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM. La solución de proteína dializada se concentró después usando un dispositivo de ultrafiltración Amicon equipado con un corte de peso molecular de 10 kDa (Amicon technologies Ltd, Kent, Reino Unido) y posteriormente se purificó adicionalmente mediante una columna de filtración en gel Sephacryl S-200 26/60 (GE Healthcare) equilibrada con tampón de diálisis.

SDS-PAGE e inmunotinción

Se realizó SDS-PAGE e inmunotinción tal como se describe por Sultanna et. al. (2013) (Sultanna R. et. al., (2013) Appl. Environ. Microbiol. 79(16) 4887-4894) usando antisuero SpaC tal como se describe por Kankainen et. al. (2009) (Kankainen M., et al., (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106(40): 17193-8).

Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como la media ± SEM de tres experimentos independientes con muestras por triplicado dentro de cada experimento independiente. Los datos generados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey *post hoc* usando el programa SPSS (IBM SPSS Statistics, versión 16.0). Los datos se consideraron significativos si el valor de P era <0,05.

Ejemplo 2: Resultados

El lisado tratado con calor o proteasa no protege a los queratinocitos de los efectos de *S. aureus*

En primer lugar se detectó la naturaleza de las moléculas eficaces dentro del lisado de LGG que median sus efectos antiadhesivos sobre *S. aureus*. Para ello, el lisado se trató con calor o proteasa y después se investigó su capacidad para proteger la viabilidad de las monocapas de queratinocitos en presencia de *S. aureus*. Solo aproximadamente el 30% de la monocapa de queratinocitos fue viable después de 24 h de incubación con *S. aureus*. Sin embargo, en presencia de lisado de LGG, la viabilidad de la monocapa aumentó a aproximadamente el 65%. El lisado tratado con calor o proteasa no protegió la viabilidad de la monocapa (véase la figura 1a), lo que sugiere que las proteínas dentro del lisado son las moléculas eficaces.

El lisado de LGG se sometió a fraccionamiento parcial usando una columna de interacción hidrófoba y las proteínas se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo al 10-70%. Se investigó la capacidad de las proteínas que eluyen en cada fracción para proteger la viabilidad de los queratinocitos. Las proteínas que eluyen en acetonitrilo al 30-60% fueron capaces de proteger los queratinocitos de los efectos de *S. aureus*, sin embargo, las proteínas que eluyen en otras fracciones no lo hicieron (véase la figura 1b).

La fracción de acetonitrilo al 50% excluye y desplaza *S. aureus* de queratinocitos

Se investigó la capacidad de las fracciones del 30-60% del lisado para excluir o desplazar *S. aureus* de sitios de unión de queratinocitos. Los datos de la figura 2 muestran que la fracción del 50% es la más eficaz tanto en la exclusión como en el desplazamiento de *S. aureus*. Es importante destacar que, cuando se evalúa en un ensayo de "spot on the lawn", esta fracción tenía una actividad mínima contra el crecimiento de *S. aureus* con respecto a otras fracciones que conferían protección a los queratinocitos tal como se muestra en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Tratamiento	Diámetro de la zona de inhibición (mm, n=3)
Lisado de LGG completo	14 +/- 1.6
Fracción del 20%	0

Tratamiento	Diámetro de la zona de inhibición (mm, n=3)
Fracción del 30%	5+/- 0,8
Fracción del 40%	0
Fracción del 50%	0
Fracción del 60%	10+/-1,7
Acetonitrilo al 99%	0

La fracción de acetonitrilo al 50% contiene la proteína SpaC de pilus

5 Para entender la implicación de SpaC en los procesos antiadhesivos, la fracción del 50% se sometió a inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-SpaC. Esto produjo una única banda, al peso molecular correcto para SpaC, lo que sugiere que la fracción del 50% del lisado contiene esta proteína (véase la figura 3a). Para confirmar la implicación de SpaC como mecanismo anti-adhesión de *S. aureus*, se produjo SpaC recombinante y se comparó su actividad antiadhesiva con la del lisado bruto. La SpaC recombinante inhibió la adhesión de *S. aureus* a queratinocitos de una forma dependiente de la dosis, siendo 50 µg/ml la más eficaz (figura 3b). Por el contrario, 50 µg/ml de una proteína de control, albúmina de suero bovino, no inhibió la adhesión de estafilococos a queratinocitos (véase la figura 3c). Sin embargo, la SpaC solo fue capaz de inhibir al adhesión de *S. aureus* a los queratinocitos cuando se añade a los queratinocitos antes, pero no después del patógeno.

La SpaC conserva parcialmente la viabilidad de la monocapa de queratinocitos en presencia de *S. aureus*

15 Se sometió a ensayo la SpaC recombinante para establecer si podía proteger monocapas de queratinocitos de los efectos tóxicos de *S. aureus*. Se comparó el efecto de 50 µg/ml de lisado bruto frente a 50 µg/ml de SpaC recombinante. Aunque la SpaC recombinante podría proteger los queratinocitos, fue significativamente menos eficaz que el lisado bruto (véase la figura 4a). Además, una cepa de LGG deficiente en producción de SpaC todavía pudo proteger la viabilidad de los queratinocitos (véase la figura 4b) y no mostró una capacidad de inhibición significativamente reducida de la adhesión a *S. aureus*.

La fracción de acetonitrilo al 50% contiene proteínas antiadhesivas potenciales adicionales

25 Dado que la eliminación de SpaC en una cepa mutante de LGG no anuló los efectos del lisado sobre la viabilidad de los queratinocitos en respuesta a *S. aureus*, se evaluó la posibilidad de que otras proteínas en el lisado de LGG pudieran también afectar a la adhesión de estafilococos a queratinocitos. Se produjo un análisis de espectrometría de masas en tándem (EM/EM) de las proteínas contenidas dentro de la fracción del 50% del lisado de LGG. Los datos se resumen a continuación en la tabla 2.

30 Tabla 2 Proteínas identificadas por espectrometría de masas en tándem en la fracción de acetonitrilo al 50% del lisado de LGG. Nota: Estas proteínas se encontraron de forma consistente en n=3 fraccionamientos de columna. El texto en **negrita** destaca las proteínas con pesos moleculares correspondientes a proteínas abundantes en la muestra según se determina por SDS-PAGE.

Proteína	Peso molecular (kDa)
UDP-glucosa 4 epimerasa	90
Cadena D de β-galactosidasa	33
Proteína ribosómica 30S S7	95
Proteína portadora de acilo	9
Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa	36
Factor de elongación TU	44
Triosafosfato isomerasa	27
Proteína ribosómica 50S S11	15
Deshidroxiacetona quinasa	21
Proteína ribosómica 50S L22	13
Asparaginil ARNt sintetasa	50
Enolasa	47

Proteína	Peso molecular (kDa)
GMP sintasa	58
Proteína LRH UPFO342	13
Proteína ribosómica 30S S5	32
Glucosa 1 fosfato timidiltransferasa	75
Cadena D de β -galactosidasa	33
Subunidad alfa de ARN polimerasa dirigida por ADN	38
Fosforibosilpirofosfato sintetasa	25
Fosfoglicerato mutasa	46
Aspartil ARNt sintetasa	64
Amonopeptidasa de la familia M29	21
Sistema de escisión de glicina H	11
Proteína ribosómica 50S	13
Proteína UPF0342	13

Para concentrar e identificar adicionalmente proteínas de interés, se eluyó una ronda adicional de purificación de la fracción del 50% usando HPLC de fase inversa y proteínas de una columna de fase inversa C18 usando un gradiente de acetonitrilo al 0-100%. Las fracciones concentradas se recogieron basándose en absorción ultravioleta a 215 nm y se recogieron 4 picos específicos que contenían proteínas entre 21-32 minutos de elución. Estos picos, denominados F1-4, (para diferenciar sus tiempos de retención en la columna) se usaron tanto en ensayos de adhesión estafilocócica como en ensayos de viabilidad de queratinocitos. Las proteínas contenidas dentro de F4 fueron las más eficaces en ambos ensayos (datos no mostrados). Por lo tanto, F4 se sometió a análisis tanto por electroforesis en gel como por análisis de EM/EM. Las proteínas contenidas dentro de F4 se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3 Proteínas identificadas por espectrometría de masas en tándem en la fracción F4 del lisado Nota al pie de página. El texto en **negrita** indica las proteínas con pesos moleculares correspondientes a proteínas abundantes en la fracción según se determina por SDS-PAGE.

Proteína	Peso molecular (kDa)
Proteína portadora de acilo	9
Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa	36
Factor de elongación TU	43
Factor de elongación de transcripción greA	23
Fosfopentomutasa	43
Triosafosfato isomerasa	27
Proteína ribosómica 50S S11	15
Dihidroxicetona quinasa	21
Proteína ribosómica 50s	15
Asparaginil ARNt sintetasa	50
Enolasa	47
Proteína UPF0342	13
Proteína ribosómica 50S L22	13

Las proteínas destacadas en **negrita** en la tabla 2, factor de elongación Tu, (EF-Tu) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enolasa y triosafosfato isomerasa (TPI), son comunes tanto a la fracción de acetonitrilo al 50% como a la fracción F4. Estas proteínas son probablemente constituyentes principales de F4 porque las proteínas más abundantes en la fracción F4 (según se determina por electroforesis) corresponden a los pesos moleculares conocidos de estas proteínas. Es importante destacar que EF-Tu, GAPDH, enolasa y TPI son moléculas de adhesión conocidas en otros lactobacilos.

Análisis

5 Los inventores han estado investigando el potencial de lisados desprovistos de células LGG como una terapia tópica dirigida a la prevención/tratamiento de la infección por *S. aureus*. Para aplicaciones tópicas, un lisado desprovisto de células tiene muchas ventajas sobre el uso de bacterias viables. Es importante destacar que las preocupaciones de seguridad que rodean el uso de bacterias vivas en la piel desaparecen, al igual que los problemas potenciales asociados con la formulación de bacterias vivas. Sin embargo, si probióticos tales como LGG pueden cumplir su potencial como agentes terapéuticos tópicos, una comprensión de las moléculas bacterianas que median sus efectos es un requisito previo.

15 En los experimentos actuales, los inventores investigaron las moléculas que median en los efectos antiadhesivos de LGG frente a *S. aureus*. Las moléculas eficaces parecen ser proteínas porque la desnaturalización por calor o el tratamiento con proteasa destruyeron completamente la actividad del lisado contra *S. aureus*. Sin embargo, la posibilidad de que otras moléculas tales como azúcares presentes en la superficie de LGG también puedan ser importantes para su acción adhesiva no puede excluirse completamente. De hecho, se ha demostrado que los exopolisacáridos son importantes para la unión de LGG al huésped en el intestino. Aunque los exopolisacáridos y otras moléculas pueden estar implicados en la actividad del lisado de LGG, ya que el tratamiento con glicosidasa del lisado de LGG no dio como resultado una pérdida significativa de eficacia frente a *S. aureus*, se concluye que, en principio, la acción inhibitoria del lisado contra la adhesión de *S. aureus* está mediada por proteínas.

25 Se han identificado previamente varias adhesinas proteicas en lactobacilos. De estas, la implicación de la proteína SpaC de pilus como una proteína de unión a moco se ha demostrado en varios estudios. La SpaC también puede estar implicada en el mecanismo mediante el cual LGG inhibe la adhesión de *S. aureus*. Esto se sugiere mediante una serie de observaciones: en primer lugar, el fraccionamiento del lisado y el análisis de las fracciones muestran que la fracción más eficaz contiene SpaC. En segundo lugar, la SpaC recombinante inhibe la adhesión de *S. aureus* de forma dependiente de la dosis y finalmente, los efectos tóxicos de *S. aureus* sobre la viabilidad de los queratinocitos se anulan por SpaC, pero no por una proteína de control, BSA.

30 En general, estos datos son coherentes con la conclusión de que la SpaC está implicada en el mecanismo mediante el cual LGG inhibe la adhesión de *S. aureus* a queratinocitos pero casi con total seguridad no actúa sola y otras proteínas están implicadas. Cabe destacar que el silenciamiento (*knock-down*) de SpaC todavía retuvo la capacidad de proteger la viabilidad de los queratinocitos en presencia de *S. aureus*. Esto podría explicarse por una observación previa realizada por los inventores de que la inhibición de la adhesión no es el único mecanismo usado por LGG para proteger los queratinocitos de los efectos tóxicos de *S. aureus*. Estudios previos mostraron que el lisado de LGG también inhibe el crecimiento de *S. aureus*. Esto es probablemente parte de la explicación de por qué la cepa LGG con inactivación de SpaC todavía conserva la capacidad de proteger la viabilidad de los queratinocitos, es decir, la cepa con inactivación todavía conservaría las moléculas que inhiben el crecimiento de estafilococos. La inhibición del crecimiento de *S. aureus* está mediado casi con total seguridad por moléculas completamente diferentes a las adhesinas porque en experimentos separados no pudimos mostrar una inhibición del crecimiento de *S. aureus* por la fracción de acetonitrilo al 50%. De hecho, se encontró que la inhibición del crecimiento de patógenos estaba contenida en otras fracciones discretas del lisado.

45 Una segunda evidencia que sugiere que la SpaC no es la explicación completa para los efectos antiadhesivos del lisado de LGG procede de la observación de que SpaC recombinante no puede replicar la actividad de desplazamiento del lisado y la fracción del 50% contra la misma *S. aureus*. Esto sugiere que otras proteínas pueden estar implicadas en las actividades antiadhesivas completas del lisado. De hecho, se encontraron otras varias proteínas en la fracción del 50% y se concentraron adicionalmente mediante HPLC en una fracción (F4) que mostró la mayor eficacia tanto en ensayos de adhesión como de viabilidad. Es probable que las proteínas más abundantes en esta fracción F4 sean el factor de elongación Tu, (EFTU), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enolasa y trifosfato isomerasa (TPI), porque los componentes principales de la fracción (según se determina por electroforesis en gel) eran proteínas de los mismos pesos moleculares que estas. Es interesante indicar que la SpaC debe ser una proteína de baja abundancia tanto en las fracciones del 50% como en las F4 porque la identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas no la detectó. De hecho, se sabe que esta técnica es fiable solo para la identificación de proteínas abundantes. Sin embargo, se demostró que la SpaC estaba presente por inmunotransferencia Western, lo que sugiere que está presente en la fracción y por lo tanto puede ser parte del mecanismo antiadhesivo.

60 Las proteínas EFTU, GAPDH, enolasa y TPI se han descrito previamente como importantes para la función adhesiva en varias especies de lactobacilos. Todas estas proteínas se han descrito previamente como las denominadas "proteínas pluriempleadas (*moonlighting proteins*)", es decir, proteínas con una capacidad para realizar funciones no relacionadas con la función canónica atribuida a la proteína. Por ejemplo, GAPDH es una enzima intracelular central de la glicólisis. Sin embargo, se encuentra como una proteína de adhesión a la superficie celular en varios procariontes, incluyendo *L. plantarum* y *L. crispatus*. Se ha demostrado que la TPI, otra enzima glicolítica, está implicada en la exclusión competitiva y el desplazamiento de *Clostridium sporogenes* y *Enterococcus faecalis* de células Caco-2 por *L. plantarum*. El EF-Tu está implicado en la traducción de proteínas pero se encuentra en la superficie celular como una adhesión que media la unión de lactobacilos a mucinas. Se ha demostrado que muchas de estas proteínas

- 5 pluriempleadas median la adhesión bacteriana a células eucariotas uniéndose a proteínas eucariotas específicas tales como fibronectina. Aunque no se ha demostrado que EFTU, GAPDH, enolasa y TPI sean adhesinas específicamente en LGG, pruebas muy recientes han demostrado que tres de las mismas, (enolasa, EFTU, GPDH) son proteínas de la superficie celular de LGG, y que tienen una ubicación normalmente citoplásmica. Tal localización dual sugiere habitualmente una función de proteína pluriempleada. Desafortunadamente, dado que todas estas proteínas tienen funciones canónicas importantes para el metabolismo bacteriano central, el silenciamiento generalmente da como resultado mortalidad, lo que hace que sus contribuciones exactas a la función anti-adhesión de estafilococos de LGG sean difíciles de demostrar.
- 10 En resumen, se cree que la función antiadhesiva general de LGG frente a *S. aureus* puede facilitarse mediante varias proteínas que incluyen SpaC, y varias proteínas pluriempleadas expresadas en la superficie celular. Estas pueden incluir TPI, enolasa, GAPDH y EFTU, aunque también pueden estar involucradas otras. Las observaciones mostraron que muchas fracciones eran eficaces en nuestros ensayos y analizamos solo las fracciones que mostraban la mayor
- 15 eficacia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una fracción proteica derivada de una secreción o un lisado de *Lactobacillus rhamnosus*, en la que la fracción proteica consiste en la proteína C de biosíntesis de subtilina (SpaC), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), triosafosfato isomerasa (TPI) y enolasa.
2. Una composición que consiste en la proteína SpaC, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación TU (EF-Tu), triosafosfato isomerasa (TPI) y enolasa.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que una o más de las proteínas son recombinantes.
4. La composición según la reivindicación 2, en la que las, una o más, proteínas se derivan de una secreción o un lisado de un probiótico, opcionalmente en la que el probiótico es un lactobacilo.
- 15 5. La composición según la reivindicación 4, en la que el lactobacilo es *L. rhamnosus*.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5, en la que *L. rhamnosus* es *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103).
- 20 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la prevención, la gestión o el tratamiento de una infección cutánea por estafilococos.
8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que la infección cutánea por estafilococos es una infección por *S. aureus*.
- 25 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se formula para su uso como modificador de queratinocitos, opcionalmente en la que el modificador potencia la proliferación y/o la migración de queratinocitos.
- 30 10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento o la gestión del cuidado de heridas.
11. Uso no terapéutico de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para potenciar cosméticamente la proliferación y/o la migración de queratinocitos.
- 35 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la disminución de la adhesión de una bacteria estafilocócica a la piel o a una membrana mucosa.
- 40 13. Un procedimiento para inhibir o reducir la unión de una bacteria estafilocócica a un sustrato en el que el sustrato se selecciona de: biomateriales, implantes y prótesis, instrumentos quirúrgicos, un dispositivo médico, pasamanos, superficies de preparación de alimentos, superficies o equipos de cocina, mesas, fregaderos, inodoros u otro accesorio de baño, comprendiendo el procedimiento aplicar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 al sustrato y en el que cuando el sustrato comprende biomateriales, implantes y prótesis, instrumentos quirúrgicos o un dispositivo médico, la composición se aplica al sustrato antes de la administración a, o el tratamiento de, o el uso con, un paciente o sujeto.

Figura 1

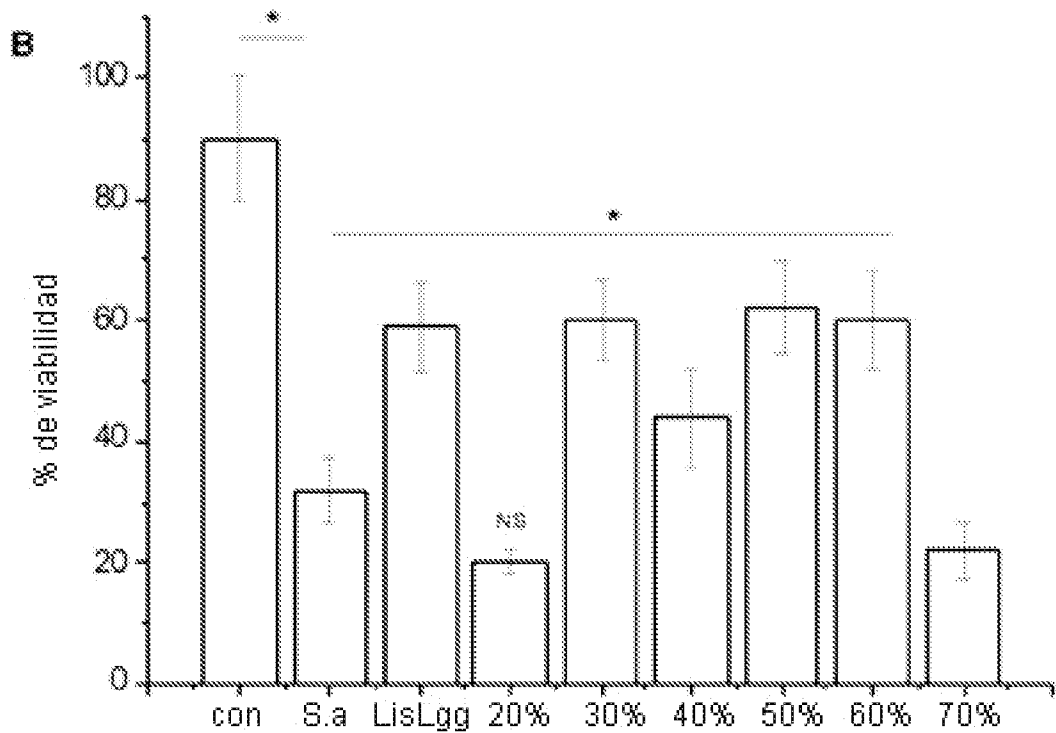
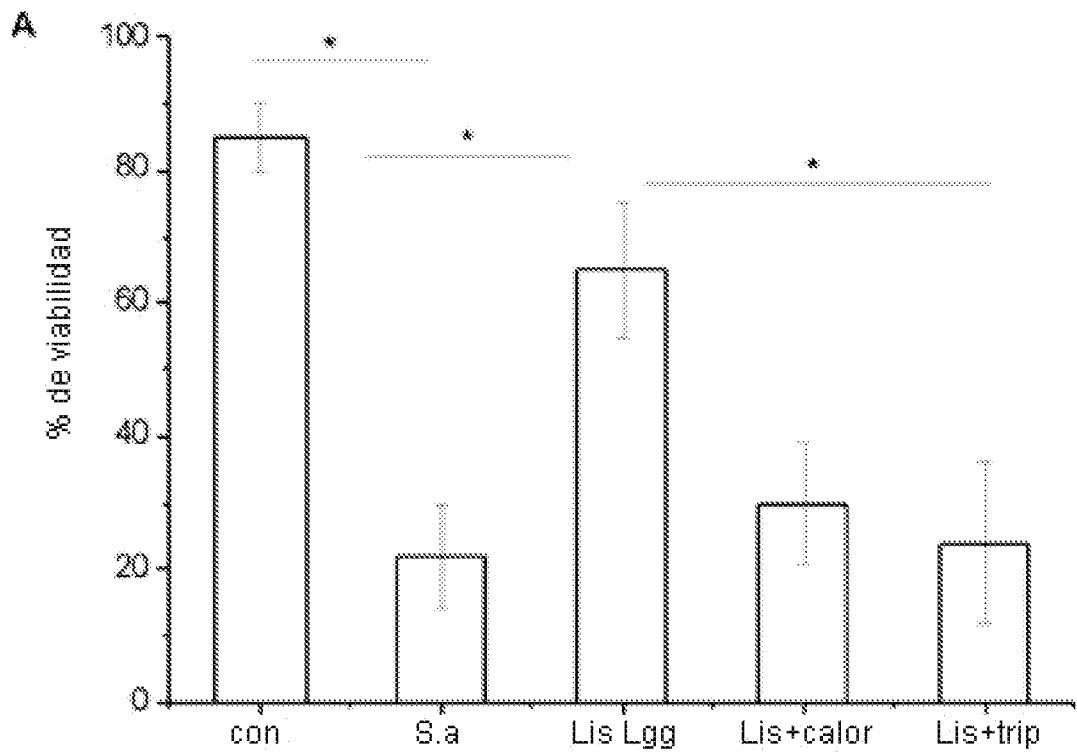


Figura 2

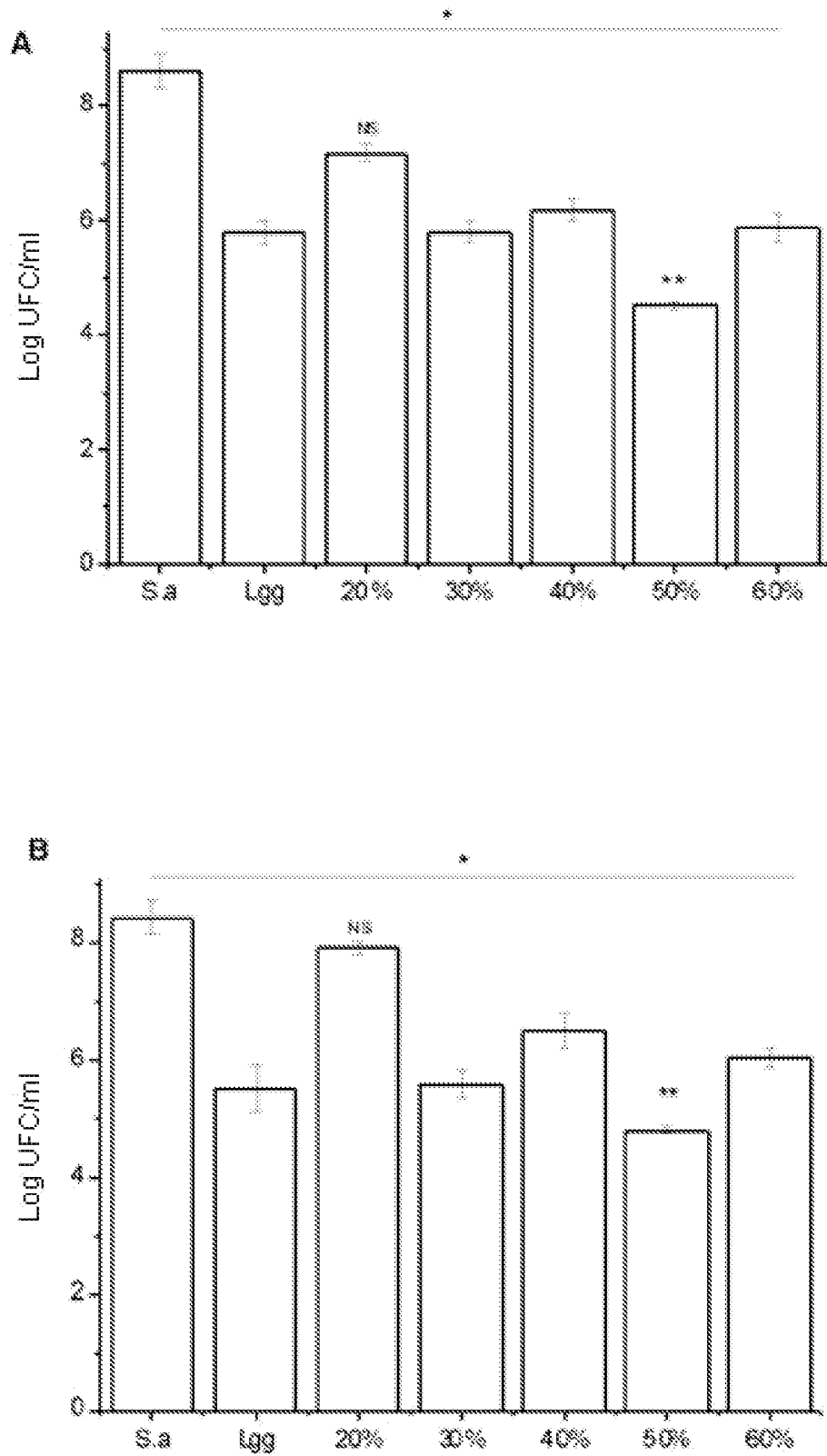


Figura 3

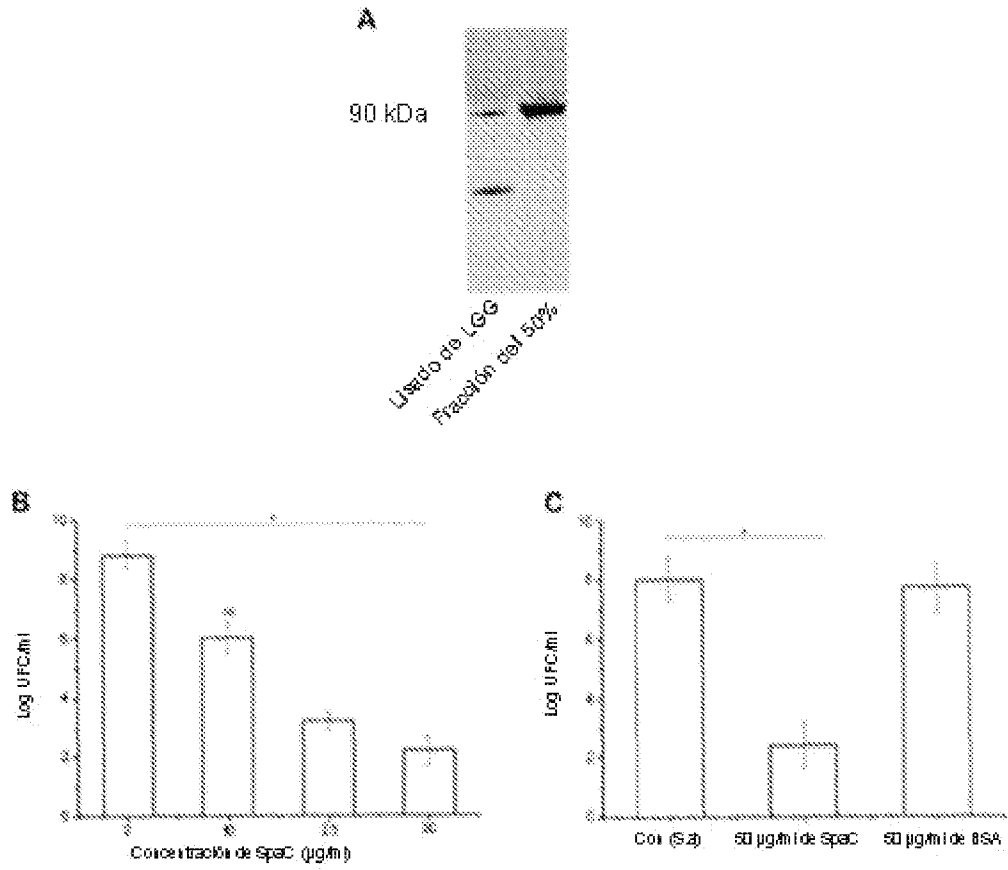


Figura 4

