

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 966**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 8/99** (2007.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)  
**C12R 1/25** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2017** **PCT/EP2017/065006**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017** **WO17220525**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017** **E 17732379 (7)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3471836**

54 Título: **Preparados dermatológicos para mantener y/o restaurar la microbiota saludable de la piel**

30 Prioridad:

**21.06.2016 BE 201605454**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2024**

73 Titular/es:

**YUN NV (50.0%)**  
**Berkenlaan 4**  
**2630 Aartselaar, BE y**  
**UNIVERSITEIT ANTWERPEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEBEER, SARAH;**  
**CLAES, INGMAR;**  
**OERLEMANS, ELINE y**  
**VAN DEN BROEK, MARIANNE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

### Observaciones:

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

ES 2 985 966 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

Preparados dermatológicos para mantener y/o restaurar la microbiota saludable de la piel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la aplicación tópica directa de bacterias beneficiosas o probióticas en la piel para el mantenimiento de una microbiota de la piel sana y para ayudar a restaurar una microbiota de la piel desequilibrada. Esta restauración de una microbiota sana se incluye en el término probioterapia, que se define como el uso de microorganismos beneficiosos o probióticos para restaurar una microbiota sana en un sitio donde se produce una disbiosis microbiana. La aplicación se basa en el uso de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas como agentes antipatógenos, en particular *L. plantarum*, *L. pentosus* y/o *L. rhamnosus*, contra patógenos de la piel comunes, por lo que los ácidos producidos, como el ácido láctico, son factores antimicrobianos importantes.

15 **Antecedentes de la invención**

Por lo tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar una solución para sujetos que padecían afecciones de la piel debidas a un equilibrio microbiano aberrante en la piel. Con ello, se descubrió que el uso tópico de las especies de *L. plantarum*, *L. pentosus* y/o *L. rhamnosus* en la piel es muy eficaz para restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana y, por lo tanto, es muy adecuado para aliviar las afecciones de la piel en sujetos que lo necesitan.

Las formulaciones orales que comprenden cepas de *Lactobacillus* se han usado anteriormente en el tratamiento de afecciones de la piel como la dermatitis atópica. Sin embargo, la administración oral frente a la administración tópica directa son vías de administración diferentes y cada una tiene un mecanismo subyacente completamente diferente. En la administración oral, se pretende, en particular, lograr un efecto beneficioso sobre la salud general mediante la inmunoestimulación, mientras que mediante la administración dermatológica directa (cutánea) se produce una competencia con los microorganismos “no deseados”.

Al igual que el tracto gastrointestinal, nuestra piel alberga un ecosistema microbiano único. El tipo de microorganismos que se encuentran en la piel depende de una combinación de factores del huésped, factores ambientales, pero también de la ubicación topográfica. El papel de esta microbiota en los trastornos de la piel aún no está completamente desentrañado. Sin embargo, parece que, al menos, algunos trastornos de la piel están relacionados con una alteración de la microbiota, ya que los tratamientos antimicrobianos pueden mejorar los síntomas clínicos (Grice y Segre 2011). Por ejemplo, en el acné vulgar se ha encontrado una correlación con la presencia de *Propionibacterium acnes* (Beylot et al. 2014). Aunque el acné vulgar es una afección multifactorial y, entre otros factores, está influenciado por factores hormonales, estas bacterias *P. acnes* parecen inducir inflamación, lo que resulta en la inflamación de las espinillas, también llamadas pápulas o pústulas. Como *P. acnes* también se encuentra en una piel sana y no causa acné, esto sugiere que intervienen otros factores, lo que inclina el equilibrio de la composición de la microbiota de la piel hacia un crecimiento excesivo de esta bacteria.

Otro ejemplo de trastorno cutáneo en el que la microbiota parece ser importante es la caspa (Wang et al. 2015; Sugita et al. 2015; Grice y Segre 2011). En las personas con caspa, el hongo *Malassezia* suele estar sobrerrepresentado. Los indicios de que este hongo es una posible causa de la afección provienen del hecho de que el tratamiento antimicótico mejora los síntomas. Por el contrario, las terapias antibacterianas no mejoran la caspa. Una vez más, se espera que otros factores estén involucrados en este trastorno de la piel, pero la correlación con *Malassezia* es digna de consideración.

De manera similar a la caspa, las infecciones fúngicas de la piel con *Candida albicans* o dermatofitos, como *Trichophyton spp.*, parecen ser trastornos de la piel relacionados con una disbiosis en la microbiota de la piel, ya que estas especies también están presentes en sujetos sanos. En el caso de la tiña pedis o “pie de atleta”, a menudo se observa un crecimiento excesivo de *Trichophyton rubrum* o *T. mentagrophytes*.

La producción de ácido láctico en combinación con posiblemente otros compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas parece brindar protección contra las infecciones y afecciones disbióticas antes mencionadas, y el ácido láctico parece ser activo contra los patógenos bacterianos, fúngicos e incluso virales. Es por esta razón que los lactobacilos se consideran importantes en la homeostasis del ecosistema dermatológico dinámico. Los posibles mecanismos de promoción de la salud de los lactobacilos son: i) preservar un pH saludable de la piel (+/- 5,5), principalmente mediante la producción de ácido láctico; ii) producción de compuestos antimicrobianos y exclusión competitiva de patógenos; iii) modulación de la respuesta inmune y iv) fortalecimiento de la barrera epitelial.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar una solución para sujetos que padecían afecciones dermatológicas debidas a un equilibrio microbiano aberrante de la piel. Por lo tanto, se descubrió que el uso dermatológico tópico de las especies *L. plantarum*, *L. pentosus* y/o *L. rhamnosus* es muy eficaz para restaurar y/o mantener una microbiota sana en la piel y, por lo tanto, es muy adecuado para aliviar las afecciones dermatológicas en sujetos que lo necesitan.

Las formulaciones orales que comprenden cepas de *Lactobacillus* se han usado anteriormente en el tratamiento de trastornos dermatológicos. Sin embargo, la administración oral frente a la administración tópica directa son vías de administración diferentes y cada una tiene un mecanismo subyacente completamente diferente. En la administración oral, se pretende, en particular, lograr un efecto beneficioso sobre la salud general mediante la inmunoestimulación, mientras que mediante la administración directa en la piel, se produce una competencia con microorganismos «no deseados». El documento WO0113956 describe composiciones para administración tópica. A continuación, las referencias a los métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

## Resumen de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición dermatológica tópica que comprende especies vivas de *Lactobacillus* *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. rhamnosus*; donde dicha *L. plantarum* es una cepa de *L. plantarum* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 4 en su gen de ARNr 16S, dicha *L. pentosus* es una cepa de *L. pentosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 1 en su gen ARNr 16S, y dicha *L. rhamnosus* es una cepa de *L. rhamnosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 5 en su gen ARNr 16S.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona dicha composición que es adecuada para su uso en la restauración y/o el mantenimiento de una microbiota de la piel sana, por vía tópica.

En el presente documento se describe el uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica para restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana.

También se describe en el presente documento dicho uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica o dicha composición dermatológica tópica, donde dicha composición es una composición para la piel tópica en forma de gel, crema, óvulo, formas de supositorios, espuma, loción o ungüento.

Se describe además en el presente documento dicho uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica, donde dichas especies de *Lactobacillus* son *L. plantarum* YUN-V2.0 depositada con el número de registro LMG P-29456 (depositada en BCCM el 09 de marzo de 2016), *L. pentosus* YUN-V1.0 depositada con el número de registro LMG P-29455 (depositada en BCCM el 09 de marzo de 2016); y *L. rhamnosus* YUN-S1.0 depositada con el número de registro LMG P-29611 (depositada en BCCM el 12 de mayo de 2016).

## Breve descripción de los dibujos

Con referencia específica ahora a las figuras, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las diferentes realizaciones de la presente invención solamente. Se presentan con el fin de proporcionar lo que se considera la descripción más útil y sencilla de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto no se hace ningún intento para mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo las varias formas de la invención pueden incorporarse en la práctica.

**Fig. 1:** Características de los lactobacilos en relación con el crecimiento, la producción de ácido D- y L-láctico (LA) y la disminución del pH del medio.

**Fig. 2:** Experimento de transcurso temporal para el análisis del efecto antipatógeno del sobrenadante de cultivo gastado de lactobacilos contra *Propionibacterium acnes*. El crecimiento de las bacterias (densidad óptica a 600 nm; eje Y) se mide en el tiempo (eje X). Cada gráfico muestra réplicas del crecimiento de *P. acnes*. Se puede observar claramente que sin ninguna adición de antibiótico o SCS, *P. acnes* comienza a crecer rápidamente (NC1). De modo similar a cuando se añade eritromicina a 50 µg/ml, el SCS de todos los lactobacilos previene el crecimiento de *P. acnes*, mientras que el SCS de estreptococos o estafilococos no inhibe el crecimiento. \*Eritromicina (50 µg/ml); #Eritromicina (5 µg/ml); §Minociclina (20 µg/ml) NC1=control de medio; NC2=MRS a pH 4,3; Números 1 a 22 = cepas de lactobacilos (para más detalles, véase la tabla 1); St=*Streptococcus thermophilus*; Ss=*Streptococcus salivarius*; Se=*Staphylococcus epidermidis*; T0,5=0,5 % Tween 80; T1=1 % Tween 80.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de cepas específicas de *Lactobacillus* que pueden competir con el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, *Malassezia* spp., *Trichophyton* spp. y bacterias u hongos que están relacionados con afecciones de la piel como el acné vulgar, la caspa, la tiña pedis u otras infecciones fúngicas de la piel. Estas cepas seleccionadas se denominan generalmente en el presente documento cepas “YUN” y son capaces de competir con patógenos de la piel y, por lo tanto, restaurar una microbiota de la piel sana. Esta

restauración de una microbiota sana se incluye en el término probioterapia, que se define como el uso de microorganismos beneficiosos o probióticos para restaurar una microbiota sana en un sitio donde se produce una disbiosis microbiana.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición dermatológica tópica que comprende especies vivas de *Lactobacillus L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. rhamnosus*; donde dicha *L. plantarum* es una cepa de *L. plantarum* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 4 en su gen ARNr 16S, dicha *L. pentosus* es una cepa de *L. pentosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 1 en su gen ARNr 16S, y dicha *L. rhamnosus* es una cepa de *L. rhamnosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 5 en su gen ARNr 16S.

También se describe en el presente documento que dicha composición comprende además especies de *Lactobacillus* tales como, por ejemplo, seleccionadas de la lista no limitante que comprende *L. pentosus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*.

En el contexto de la presente invención, el término “tópico” debe interpretarse como la administración local en una ubicación específica del cuerpo, en particular la aplicación a un lugar particular del cuerpo. En particular, incluye la aplicación mediante formulaciones no sólidas tales como cremas, espumas, geles, lociones o ungüentos. El término “tópico” no debe entenderse como inclusivo de la administración en forma de preparaciones sólidas tales como cápsulas, comprimidos, ...

Por lo tanto, el término “piel tópica” pretende incluir la administración local usando formulaciones no sólidas directamente sobre la piel del cuerpo. Preferiblemente, las composiciones según la presente invención se aplican sobre una gran área de la piel para obtener su máxima eficacia.

En el contexto de la presente invención, el término “especie de *Lactobacillus* viva” debe entenderse como una especie de *Lactobacillus* viable, y no como fragmentos, sobrenadantes de cultivo o formas muertas de estos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona dicha composición dermatológica tópica para su uso en la restauración y/o el mantenimiento de una microbiota de la piel sana, por vía tópica.

También se describe en el presente documento dicha composición dermatológica tópica para su uso en la probioterapia de la piel, por vía tópica. Como ya se ha definido anteriormente en el presente documento, dicha probioterapia pretende ser la restauración y/o el mantenimiento de una microbiota de la piel sana en un sujeto que lo necesite.

Los sujetos que pueden beneficiarse de dicha probioterapia son, por ejemplo, gente/personas con afecciones de la piel relacionadas con una microbiota de la piel alterada, posiblemente debido a infecciones bacterianas o por hongos y/o toda disbiosis causada por el crecimiento excesivo de microorganismos patógenos específicos, como el acné vulgar, la tiña del pie, la caspa, las rosáceas, el impétigo,...

Por lo tanto, en el presente documento se describe el uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica para restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana.

Además, en el presente documento se describe dicho uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica en el que dicha composición es una composición para la piel tópica en forma de gel, crema, óvulo, formas de supositorios, espuma, loción o ungüento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la composición dermatológica tópica, en la que dicha composición es una composición para la piel tópica en forma de gel, crema, óvulo, formas de supositorios, espuma, loción o ungüento.

En el presente documento se describe además un método para restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana; que comprende al menos una etapa de administrar por vía tópica, a un individuo, una cantidad eficaz de una o más especies vivas de *Lactobacillus*; donde al menos una de dichas especies de *Lactobacillus* es *L. plantarum*; más en particular una cepa de *L. plantarum* que tiene al menos un 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 4 en su gen ARNr 16S.

Además, en el presente documento se describe una composición que comprende una o más especies vivas de *Lactobacillus* para su uso en la restauración y/o el mantenimiento de una microbiota de la piel sana, por vía tópica, donde dichas especies de *Lactobacillus* se seleccionan de la lista que comprende *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. rhamnosus*; más en particular una cepa de *L. plantarum* que tiene al menos un 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 4 en su gen ARNr 16S; una cepa de *L. pentosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 1 en su gen ARNr 16S y una cepa de *L. rhamnosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 5 en su gen ARNr 16S.

Además, en el presente documento se describe dicho uso no terapéutico de dicha composición dermatológica tópica, donde dichas especies de *Lactobacillus* son *L. pentosus* YUN-V1.0 depositada con el número de registro LMG P-29455 (depositada en la BCCM el 09 de marzo de 2016); *L. plantarum* YUN-V2.0 depositada con el número de registro LMG P-29456 (depositada en la BCCM el 09 de marzo de 2016); y *L. rhamnosus* YUN-S1.0 depositada con el número de registro LMG P-29611 (depositada en la BCCM el 12 de mayo de 2016).

La presente invención proporciona además la composición dermatológica tópica, donde dichas especies de *Lactobacillus* son *L. pentosus* YUN-V1.0 depositada con el número de registro LMG P-29455 (depositadas en la BCCM el 09 de marzo de 2016); *L. plantarum* YUN-V2.0 depositada con el número de registro LMG P-29456 (depositada en la BCCM el 09 de marzo de 2016); y *L. rhamnosus* YUN-S1.0 depositada con el número de registro LMG P-29611 (depositada en la BCCM el 12 de mayo de 2016).

Los depósitos microbiológicos mencionados en este documento se han realizado con la colección de bacterias BCCM/LMG ("colecciones belgas coordinadas de microorganismos") con dirección de correspondencia: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35 - 9000 Gante, Bélgica

*Lactobacillus pentosus* YUN-V1.0 es un aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores después de subcultivar una cepa, que originalmente era un aislado vaginal de una mujer sana. La secuencia del gen ARNr 16S (id. de sec. 1) para la cepa *L. pentosus* YUN-V1.0 se determinó mediante PCR utilizando los cebadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' - id. de sec. 2) y 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' - id. de sec. 3).

YUN-V2.0 y YUN-V3.0 son aislados de una sola colonia obtenidos en el laboratorio de los investigadores después del subcultivo de cepas de *Lactobacillus plantarum* que se aislaron originalmente de saliva humana y un producto de ensilaje de maíz, respectivamente. La secuencia del gen ARNr 16S (id. de sec. 4) para la cepa *L. plantarum* YUN-V2.0 se determinó mediante PCR utilizando los cebadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' - id. de sec. 2) y 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' - id. de sec. 3).

YUN-S1.0 es un aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores después del subcultivo de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que se aisló originalmente de una persona sana. La secuencia del gen del ARNr 16S (id. de sec. 5) para la cepa YUN-S1.0 de *L. rhamnosus* se determinó mediante PCR usando los cebadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' - id. de sec. 2) y 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' - id. de sec. 3).

Estas cepas "YUN" en concreto se pueden usar como tales, o se formulan preferiblemente en una composición que comprende tales cepas. Dichas composiciones son composiciones tópicas para la piel, más en particular en forma de formulaciones no sólidas tales como cremas, espumas, geles, lociones o ungüentos.

En particular, también se describen en el presente documento las cepas "YUN" definidas anteriormente para su uso en la probióterapia de la piel, es decir, para restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana.

Además, en el presente documento se describe un uso tópico de una o más especies vivas de *Lactobacillus* en la probióterapia de la piel; donde dichas especies de *Lactobacillus* se seleccionan de la lista que comprende *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. rhamnosus*; más en particular, dicha probióterapia consiste en restaurar y/o mantener una microbiota de la piel sana en un sujeto que lo necesite.

En una realización específica, la especie de *Lactobacillus* en los usos tópicos, métodos y composiciones como se describe en el presente documento, es una cepa de *Lactobacillus* seleccionada de la lista que comprende *L. plantarum* YUN-V2.0 depositada con el número de registro LMG P-29456 (depositada en la BCCM el 09 de marzo de 2016); *L. pentosus* YUN-V1.0 depositada con el número de registro LMG P-29455 (depositada en la BCCM el 9 de marzo de 2016); y *L. rhamnosus* YUN-S1.0 depositada con el número de registro LMG P-29611 (depositada en la BCCM el 12 de mayo de 2016).

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *Lactobacillus* (Tabla 1) se cultivaron a 37 °C en medio de De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Carl Roth). Todas las bacterias se cultivaron en condiciones sin agitación y se inocularon a partir de reservas de glicerol (-80 °C). Los medios sólidos contenían agar al 1,5 % (p/v).

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en esta investigación

Especie	N.º	Cepa	Genotipo o descripción relevante	Referencia y/o fuente
<b>LACTOBACILOS</b>				
<i>Lactobacillus casei</i>	1	ATCC334	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de un cultivo madre de ATCC334	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i>	2	DN-114001	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de una bebida fermentada disponible comercialmente (Actimel®) que contiene <i>L. casei</i> DN-114001, confirmado por secuenciación	Producto probiótico comercial
<i>Lactobacillus casei</i>	3	Shirota	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de una bebida fermentada disponible comercialmente que contiene <i>L. casei</i> Shirota (Yakult®), confirmado por secuenciación	Producto probiótico comercial
<i>Lactobacillus pentosus</i>	4	YUN-V1.0	Aislado de una sola colonia	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	LMG1284	Aislado de una sola colonia de <i>L. plantarum</i> ATCC8014 o LMG1284	ATCC
<i>Lactobacillus reuteri</i>	6	RC-14	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de un suplemento probiótico disponible comercialmente que contiene <i>L. reuteri</i> RC-14, confirmado mediante secuenciación	Producto probiótico comercial
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7	YUN-S1.0	Aislado clínico	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12	GR-1	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de un suplemento probiótico disponible comercialmente que contiene <i>L. rhamnosus</i> GR-1	(Chan et al. 1984; 1985; Reid 1999; Reid y Bruce 2001), ATCC
<i>Lactobacillus helveticus</i>	14	AM B-2	aislado de una sola colonia	Producto probiótico comercial
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	YUN-V2.0	Aislado de una sola colonia	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	16	5057	Aislado de una sola colonia	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	LMG12586	Aislado de una sola colonia obtenido en el laboratorio de los investigadores a partir de un cultivo madre de LMG12586	BCCM/LMG
<i>Lactobacillus plantarum</i>	22	/	Aislado de una sola colonia	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	25	LMG8041	Aislado de una sola colonia	BCCM/LMG
<b>PATÓGENOS</b>				
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	/	Aislado clínico	BCCM/LMG
<i>Malassezia furfur</i>	/	/	Aislado clínico	BCCM/LMG
<i>Candida albicans</i>	/	/	Aislado clínico	

Preparación del sobrenadante de cultivo gastado (SCS) de cepas seleccionadas

Para obtener el sobrenadante de cultivo gastado (SCS) que contiene los productos antimicrobianos activos secretados, se inoculó medio de crecimiento específico para cada especie a partir de un precultivo y se incubó durante 24 h. El SCS se obtuvo por centrifugación durante 30 minutos a 6797 g (8000 rpm) a 4 °C. Posteriormente, el SCS se esterilizó por filtración (acetato de celulosa de 0,20 µm, VWR).

Ensayos de actividad antimicrobiana para cocultivos de lactobacilos vivos contra *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum*, *Propionibacterium acnes* y *Candida albican*.

La actividad antimicrobiana de las bacterias seleccionadas se exploró mediante pruebas antimicrobianas estándar con algunas modificaciones menores. La actividad antimicrobiana de las bacterias seleccionadas se exploró mediante un ensayo de puntos (Schillinger y Lücke 1989). En resumen, se colocaron puntos de 1-3 µL de cada cultivo en una placa de agar. Estas placas se incubaron durante 24 h hasta 72 h dependiendo de la cepa. A continuación, se diluyó un cultivo nocturno del patógeno en 7 mL de agar blando del medio del patógeno y se vertió sobre las placas con los puntos de las cepas seleccionadas. Las placas se incubaron durante la noche a 30-37 °C, después de lo cual se midieron las zonas de inhibición. Se añadió un punto de miconazol (para los hongos) y/o hexetidina al 0,1 % y/o tetraciclina (para *Propionibacterium acnes*) a la placa de puntos como control positivo antes de verter el agar blando.

Prueba de difusión radial del SCS de lactobacilos

Además, se investigó la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo gastado (SCS) con un protocolo como el descrito anteriormente para los ensayos de competencia entre lactobacilos y patógenos gastrointestinales (Coconnier et al. 1997). Se usaron miconazol (para hongos) y tetraciclina (para *Propionibacterium acnes*) como control positivo. Se usó un medio de crecimiento estéril como control negativo.

Análisis de trascurso temporal de la actividad antimicrobiana de SCS de las cepas seleccionadas contra *Candida*, *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur* y *Trichophyton* spp (también denominados "patógenos").

El análisis de trascurso temporal se realizó de manera similar a como se describió anteriormente (De Keersmaecker et al. 2006) con modificaciones menores. En resumen, se añadió un cultivo nocturno del patógeno a los pocillos de una microplaca llena con un 50-80 % del medio apropiado complementado con un 50-5 % de SCS de lactobacilos. El MRS a pH 4,3 y los antibióticos o antimicóticos a la concentración adecuada se utilizaron como control negativo y positivo, respectivamente. Se cultivaron bacterias u hongos y se midió la densidad óptica (DO) a 590 nm cada 30 minutos durante 3 días usando un lector multimodo Synergy HTX (Biotek). Cada prueba se midió al menos por triplicado y se calculó la DO promedio. La actividad antimicrobiana se expresó como la densidad óptica relativa alcanzada después de 24 h (fase estacionaria) en comparación con los controles negativos.

Susceptibilidad a los antibióticos

La sensibilidad a los antibióticos se evaluó mediante la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer. En resumen, se aplicaron puntos de los antibióticos en discos de papel y la zona de inhibición bacteriana se midió en placas de agar. Los antibióticos probados fueron eritromicina, normocina, tetraciclina, ampicilina y clindamicina en concentraciones relevantes.

Ensayo clínico de prueba de concepto en humanos en pacientes con acné vulgar

Se realizó un ensayo clínico de prueba de concepto en 20 pacientes con acné vulgar. Los pacientes eran hombres de entre 1-25 años con acné inflamatorio leve. El objetivo de este ensayo de prueba de concepto fue evaluar el impacto de una crema probiótica tópica (que contiene +10-8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. pentosus* YUN-V1.0, +10-8 UFC de *L. plantarum* YUN-V2.0 y +10-8 UFC de *L. rhamnosus* YUN-S1.0 por aplicación de 1 g de la crema tópica ACN) en la microbiota de la piel y en la gravedad del acné. Se pidió a los pacientes que se aplicaran la crema dos veces al día durante 56 días (8 semanas). Los pacientes fueron atendidos por un dermatólogo al inicio (antes de la terapia), semana 4, semana 8 y semana 10. Se tomó una muestra de piel en cada visita. El ADN bacteriano se aisló de estas muestras mediante el kit comercial MoBio Powersoil (cfr. Human Microbiome Project). El ADN aislado se analizó mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S con MiSeq Illumina y se realizó un análisis bioinformático. Además, se realizó una puntuación clínica y se tomó una fotografía en cada visita.

Ensayo clínico de prueba de concepto en humanos en pacientes con tiña pedis (pie de atleta)

Se realizó un ensayo clínico de prueba de concepto en 20 pacientes con tiña del pie. Los pacientes eran de entre 18-65 años y tenían tiña del pie. El objetivo de este ensayo de prueba de concepto fue evaluar el impacto de una crema probiótica tópica (que contiene +10-8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. pentosus* YUN-V1.0, +10-8 UFC de *L. plantarum* YUN-V2.0 y +10-8 UFC de *L. rhamnosus* YUN-S1.0 por aplicación de 1 g de la crema tópica FNG) en la microbiota de la piel y en la infección por *Trichophyton*. Se pidió a los pacientes que se aplicaran la crema dos veces al día durante 56 días (8 semanas). Los pacientes fueron atendidos por un dermatólogo al inicio (antes de la terapia), semana 4, semana 8 y semana 10. Se tomó una muestra de piel en cada visita. El ADN bacteriano se aisló de estas muestras mediante el kit comercial MoBio Powersoil (cfr. Human Microbiome Project). El ADN aislado se analizó mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S con MiSeq Illumina y se realizó un análisis bioinformático. Para analizar la presencia de los hongos, también se colocaron muestras en un medio específico para *Trichophyton* (medio sugerido por BCCM). Se realizó PCR de colonias utilizando los cebadores universales ITS ('región transcrita interna') ITS1 (id. de sec.6) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (id. de sec. 7) (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') seguido de secuenciación para identificar los hongos. Además, se realizó una puntuación clínica y se tomó una fotografía en cada visita.

## Resultados

### Características de crecimiento y producción de lactato

Las posibles cepas beneficiosas o probióticas se caracterizaron en términos de características de crecimiento, producción de lactato y capacidad de reducir el pH del medio. Se espera que estas características sean importantes para la actividad antipatógena. Estos datos muestran que *Lactobacillus pentosus* YUN-V1.0 y *L. plantarum* YUN-V2.0 y *L. rhamnosus* YUN-S1.0 producen la mayor cantidad de ácido láctico (Fig 1).

### Actividad antipatógena contra *Propionibacterium acnes*

Los experimentos de transcurso temporal se realizaron analizando la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo gastado (SCS) de las cepas seleccionadas contra *Propionibacterium acnes*. El SCS de todas las cepas analizadas inhibió el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, mientras que el SCS de otras especies bacterianas como *Streptococcus thermophilus* y *S. salivarius*, ambas también bacterias del ácido láctico, y *Staphylococcus epidermidis* no inhibieron el crecimiento de *P. acnes*. Esto sugiere que las especies y quizás las propiedades específicas de cepa de los lactobacilos seleccionados son importantes para la actividad antipatógena contra *P. acnes* (Fig. 2).

### Actividad antipatógena contra *Malassezia*, *Trichophyton* y *Candida*

En una fase siguiente, se examinaron las bacterias beneficiosas o probióticas para determinar su efecto antipatógeno contra patógenos cutáneos específicos. Los resultados de los ensayos de puntos contra *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans* se muestran en la tabla 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 1: Ensayo puntual de lactobacilos seleccionados contra *Malassezia furfur*.

Cepa	<i>Malassezia furfur</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	++	-	+
2	++	-	+
3	+	+	-
4	++	+++	+++
5	+++	++	++
6	+	++	++
7	++	-	-
12	+	-	-
13	+	-	+
14	-	+	-
15	+++	+++	+++
16	++	++	++
17	-	+	-
22	+++	++	++
25	++	++	+

\*se muestran tres repeticiones independientes

Tabla 2: Ensayo puntual de lactobacilos seleccionados contra *Trichophyton rubrum*.



Cepa	<i>Trichophyton rubrum</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	+	++	+++
2	+	++	++
3	+	++	++
4	++	++	+++
5	++	++	+++
6	-	-	+++
7	++	+++	+
12	++	+++	+++
13	++	-	-
14	+	++	++
15	+++	+++	+++
16	++	+++	+++
17	+	+++	++
22	++	+++	+++
25	++	+++	+++

\*se muestran tres repeticiones independientes

Tabla 3: Ensayo de difusión radial de lactobacilos seleccionados contra *Candida albicans*.

Cepa	<i>Candida albicans</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	-	-	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	++	++	++
5	+	+	+
6	-	-	-
7	+	+	++
12	+	+	+
13	/	/	/
14	+	-	-
15	+	+	++
16	+	+	+
17	-	-	-
22	/	/	/
25	/	/	/

\*se muestran tres repeticiones independientes

El sobrenadante de cultivo gastado de *L. pentosus* YUN-V1.0 y *L. plantarum* YUN-V2.0 también se probó en ensayos de difusión radial y demostró ser eficiente para inhibir el crecimiento de *Malassezia*, *Trichophyton* y *Candida*. *L. rhamnosus* YUN-S1.0 no fue tan eficiente en la inhibición del crecimiento de *Malassezia*, pero fue capaz de inhibir el crecimiento de *Trichophyton* y *Candida*.

#### Susceptibilidad a los antibióticos

Las bacterias seleccionadas también se probaron para determinar su susceptibilidad a los antibióticos a fin de prevenir la propagación de genes de resistencia a los antibióticos. Todos los lactobacilos eran susceptibles a la eritromicina,

normocina, tetraciclina, ampicilina y clindamicina, excepto *L. plantarum* 5057, que era susceptible a la tetraciclina. Por esta razón, se encontró que la cepa *L. plantarum* 5057 no era adecuada para su uso como cepa para probioterapia.

#### Referencias

Beylot, C. et al., 2014. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*: JEADV, 28(3), pp.271-8.

Chan, R.C. et al., 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infection and immunity*, 47(1), pp.84-9.

Chan, R.C., Bruce, A.W. y Reid, G., 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *The Journal of urology*, 131(3), pp.596-601.

Grice, E.A. y Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), pp.244-53.

Reid, G., 1999. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65(9), pp.3763-3766.

Reid, G. y Bruce, A.W., 2001. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *The Journal of infectious diseases*, 183 Suppl, pp.S77-80.

Sugita, T. et al., 2015. Temporal changes in the skin *Malassezia* microbiota of members of the Japanese Antarctic Research Expedition (JARE): A case study in Antarctica as a pseudo-space environment. *Medical mycology*, 53(7), pp.717-24.

Wang, L. et al., 2015. Characterization of the major bacterial-fungal populations colonizing dandruff scalps in Shanghai, China, shows microbial disequilibrium. *Experimental dermatology*, 24(5), pp.398-400.

#### Listado de secuencias

<110> YUN NV

<120> PREPARACIONES DERMATOLÓGICAS PARA MANTENER Y/O RESTAURAR LA MICROBIOTA SANA DE LA PIEL

<130> YUN-002

<150> BE2016/5454

<151> 21-06-2016

<170> BISSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1406

<212> ARN

<213> *Lactobacillus pentosus*

<223> secuencia ARNr 16S

<400> 1

## ES 2 985 966 T3

	cttagggcgc tggttcctaa aaggttaccc caccgacttt ggggtgttaca aactctcatg	60
	gtgtgacggg cgggtgtgtac aaggcccggg aacgtattca ccgcggcatg ctgatccgcg	120
	attactagcg attccgactt catgtaggcg agttgcagcc tacaatccga actgagaatg	180
5	gctttaagag attagcttac tctcgcgagt tcgcaactcg ttgtaccatc cattgtagca	240
	cgtgtgtagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg tcatcccccac ctctcctcgg	300
	tttgtcaccg gcagttctac cagagtgcgc aacttaatgc tggcaactga taataagggt	360
	tgcgctcgtt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac aaccatgcac	420
10	caactgtatc catgtcccg aagggaacgt ctaatctctt agatttgcat agtatgtcaa	480
	gacctggtaa ggttcttcgc gtactctcga attaaaccac atgctccacc gcttgtgcgg	540
	gcccccgta attcctttga gtttcagcct tgcggccgta cccccaggc ggaatgctta	600
	atgcgttagc tgcagcactg aaggggcgaa accctccaac acttagcatt catcgtttac	660
15	ggtatggact accagggtat ctaatcctgt ttgctacca tactttcgag cctcagcgtc	720
	agttacagac cagacagccg ccttcgccac tgggtttctt ccataatatc acgcatttca	780
	ccgctacaca tggagttcca ctgtcctctt ctgcactcaa gtttcccagt ttccgatgca	840
	cttcttcggt tgagccgaag gctttcacat cagacttaaa aaaccgcctg cgtcgcgttt	900
20	acgcccataa aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta	960
	gttagccgtg gctttctggt taaataaccg caatacctga acagttaact tcagatatgt	1020
	tcttctttaa caacagagtt ttacgagccg aaacccttct tcaactcacgc ggcgttgctc	1080
	catcagactt tcgtccattg tggaagattc cctactgctg cctcccgtag gagtttgggc	1140
25	cgtgtctcag tcccaatgtg gccgattacc ctctcaggtc ggctacgtat cattgccatg	1200
	gtgagccgtt accccaccat ctactaata cgcgcgggga ccaccagaa gtgatagccg	1260
	aagccatctt tcaaaactcg accatgcggt ccaagttgtt atgcggtatt agcatctgtt	1320
	tccaggtgtt atccccgcct tctgggcagg tttccacgt gttactcac agttcgcac	1380
	tcactcaaat gtaaatcatg atgcaa	1406
30	<210> 2	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador 8F	
40	<400> 2	
	agagtttgat cctggctcag 20	
45	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador 1525R	
55	<400> 3	
	aaggagggtga tccagccgca 20	
	<210> 4	
60	<211> 1425	
	<212> ARN	
65	<213> Lactobacillus plantarum	

# ES 2 985 966 T3

<223> ARNr 16S

<400> 4

5	ggttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacgggc	60
	ggtgtgtaca aqgcccqgga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga ttactaqcga	120
	ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg ctttaagaga	180
	ttagcttact ctccgcagtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac gtgtgtagcc	240
10	caagtcataa qgggcacgat gatttgacgt catccccacc ttctcccggt ttgtcaccgg	300
	cagtcctacc agagtgcaca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt gcgctcggtt	360
	cgggacttaa cccaaacatct caagacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtatcc	420
	atgtccccga agggaaacgtc taatctctta gatttgacata gtatgtcaag acctggtaag	480
15	gttctctcgg tagcttcgaa ttaaacacaa tgctccaccg cttgtgcggg ccccgctcaa	540
	ttcttttgag tttaagcctt gcgcccgtac tccccagcgc gaatgcttaa tgcgttagct	600
	gcagcactga agggcgga aa cctccaaca cttagcattc atcgtttaac gtatggacta	660
	ccagggtatc taatcctggt tgctaccatc actttcgagc ctcagcgtca gttacagacc	720
20	agacagccgc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac cgtacacat	780
	ggagttccac tgtcctcttc tgcactcaag ttccccagtt tccgatgcac ttcttcgggt	840
	gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgttcta cgcaccaataa	900
	atccggacaa cgtctgcac ctaactatta ccgcggctgc tggcacgtag ttgacggtgg	960
25	ctttctgggt aaataccgtc aatacctgaa cagttactct cagatatgtt cttctttaac	1020
	aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt	1080
	cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggac gtgtctcagt	1140
	cccaatgtgq ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgq tgaacggtta	1200
30	ccccaccatc tagctaatac gcgcggggac catccaaaag tgatagccga agccatottt	1260
	caagctcggg ccacgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcactctgtt ccaggtgtta	1320
	tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactacca gttcgcact caotcaaatg	1380
	taaatcatga tgcaagcacc aatcaataac agagttcgtt cgact	1425

35 <210> 5

<211> 1403

<212> ARN

40

<213> Lactobacillus rhamnosus

<223> ARNr 16S

45 <400> 5

# ES 2 985 966 T3

	gtcgcacgagt tctgattatt gaaaggtgct tgcattcttga ttttaattttg aacgagtggc	60
	ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc cottaagtgg gggataacat ttggaaacag	120
	atgctaatac cgcataaatc caagaaccgc atggttcttg gctgaaagat ggcgttaagct	180
5	atcgcttttg gatggaccg cggcgtatta gctagtgtgt gaggtaacgg ctacccaagg	240
	caatgatacg tagcogaact gagaggttga toggccacat tgggactgag acacggccca	300
	aactcctacg ggagggcagca gttagggaatc ttccacaatg gacgcaagt c gatggagca	360
	acgcgcgctg agtgaagaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttggttga gaagaatggt	420
10	cggcagagta actgttgtcg gcgtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
	gccagcagcc gcggtataac gttaggtggca agcgttatcc ggatttattg ggcgttaagc	540
	gagcgcaggg ggttttttaa gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgcac	600
	cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcgttgaaa	660
15	tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggtctg taactgacgc	720
	tgaggctcga aagcatgggt agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa	780
	cgatgaatgc taggtgttgg agggtttcgg ccttcagtg ccgcagctaa cgcatttaagc	840
	attccgcctg gggagtaaca ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgc	900
20	caagcgggtg agcatgttgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
	atcttttgat caactgagag atcaggtttc ccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca	1020
	tgttggtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct	1080
	tatgactagt tgccagcatt tagttgggca ctctagtaag actgccggtg acaaaccgga	1140
25	ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
	caatggatgg taacaacgag tgcgagaccg cgaggtcaag ctaatctctt aaagccattc	1260
	tcagttcggg ctgtaggctg caactcgct acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg	1320
	atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccg gccttgta caaccgccgt cacaccatga	1380
	gagtttgtaa caccogaagc cgg	1403
30	<210> 6	
	<211> 19	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Secuencia cebador	
40	<400> 6	
	tccgtaggtg aacctgcgg 19	
45	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<223> Secuencia cebador	
55	<400> 7	
	tctccgctt attgatatgc 20	

REIVINDICACIONES

1. Una composición dermatológica tópica que comprende las especies de *Lactobacillus* vivas *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. rhamnosus*; donde dicha *L. plantarum* es una cepa de *L. plantarum* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 4 en su gen de ARNr 16S, dicha *L. pentosus* es una cepa de *L. pentosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 1 en su gen de ARNr 16S, y dicha *L. rhamnosus* es una cepa de *L. rhamnosus* que tiene al menos 97 % de similitud de secuencia con la id. de sec. 5 en su gen de ARNr 16S.  
5
2. Composición según la reivindicación 1 para su uso en la restauración y/o el mantenimiento de una microbiota de la piel sana, por vía tópica.  
10
3. La composición según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, donde dicha composición es una composición para la piel tópica en forma de gel, crema, óvulo, formas de supositorios, espuma, loción o ungüento.  
15
4. La composición según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, donde dichas especies de *Lactobacillus* son las cepas de *Lactobacillus L. plantarum* YUN-V2.0 depositada con el número de registro LMG P-29456 en combinación con *L. pentosus* YUN-V1 .0 depositada con el número de registro LMG P-29455 y/o *L. rhamnosus* YUN-S1 .0 depositada con el número de registro LMG P-29611.

Fig. 1

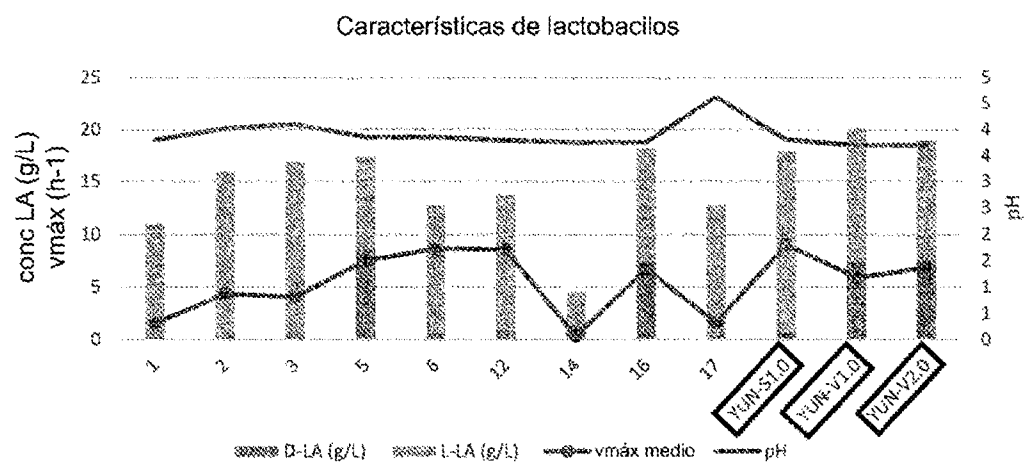


Fig. 2

