

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 028**

51 Int. Cl.:

C12R 1/01 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2021 PCT/EP2021/054083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2021 WO21165434**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2021 E 21711182 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 4107293**

54 Título: **Cepa de Cutibacterium acnes y usos médicos de la misma**

30 Prioridad:

18.02.2020 IT 20200003233

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

21.10.2024

73 Titular/es:

**AILEENS PHARMA S.R.L. (100.0%)
Via Donatori del Sangue, 1
20834 Nova Milanese (MB), IT**

72 Inventor/es:

**VERGALITO, FRANCA;
LONGO SORMANI, SONIA;
MAGNIFICO, IRENE;
PIETRANGELO, LAURA;
DI MARCO, ROBERTO, MARIA, ANTONIO;
CUTULI, MARCO, ALFIO;
VENDITTI, NOEMI y
PETRONIO PETRONIO, GIULIO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 983 028 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

Cepa de Cutibacterium acnes y usos médicos de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una cepa bacteriana seleccionada que pertenece al género Cutibacterium, especies acnes y al uso médico de la misma y a composiciones farmacéuticas y nutricionales que contienen la misma cepa.

La presente invención se origina en el campo microbiológico y encuentra aplicaciones en los campos farmacéutico, cosmético y nutricional.

10 Específicamente, la invención se refiere a una cepa seleccionada de Cutibacterium acnes y a postbióticos y fragmentos de pared celular de la cepa que a través de componentes microbianos estructurales y/o mediante la producción de sustancias promueven el crecimiento de células de fibroblastos. La cepa de la invención, fragmentos de su pared y postbióticos de la misma tienen actividades antiinflamatorias y antibacterianas. Preferiblemente, la cepa bacteriana seleccionada o fragmentos de su pared son para aplicación tópica para el tratamiento de trastornos dermatológicos, infecciones o afecciones de la piel.

ANTECEDENTES

15 La inflamación es esencialmente una respuesta biológica a un estímulo o lesión perjudicial de un tejido del organismo que puede estar provocada por causas externas tales como en el contacto con agentes irritantes o microorganismos. La inflamación se considera como una respuesta protectora del cuerpo destinada a eliminar la causa de lesión del tejido, eliminar los tejidos necróticos dañados por la agresión original y el proceso inflamatorio e iniciar la reparación del tejido. Esta respuesta del organismo implica las células inmunitarias y mediadores moleculares.

20 En la actualidad, la inflamación se trata con la administración sistémica o tópica de fármacos antiinflamatorios no esteroideos o esteroideos. A pesar de la ampliación de los agentes antiinflamatorios, siguen existiendo algunos riesgos residuales de que la inflamación puede persistir después del tratamiento con fármacos antiinflamatorios. Además, el tratamiento antiinflamatorio no está libre de efectos secundarios ni en caso de aplicación tópica ni de administración sistémica.

25 En los últimos años, la aparición de efectos secundarios en el caso de la administración tópica aumenta debido al abuso o mal uso de cremas con esteroides dirigidas al tratamiento de la inflamación de la piel.

Por lo tanto, actualmente existe la necesidad de disponer de nuevos productos provistos de actividad antiinflamatoria cuyo uso incluso durante un tiempo prolongado no se vea afectado por efectos secundarios graves.

Problemas similares surgen en el campo dermatológico y ginecológico, en caso de infecciones de piel o mucosa.

30 El abuso de productos antibióticos para uso tópico para el tratamiento de infecciones de la piel ha aumentado el número de casos de resistencia a la terapia antibiótica local, forzando al médico a prescribir antibióticos de segunda generación.

Por lo tanto, actualmente existe la necesidad de disponer de nuevos productos provistos con actividad antiinflamatoria y/o posiblemente incluso antimicrobiana, que sean alternativos a los medicamentos disponibles comercialmente.

35 Uno de los objetivos de la presente invención reside en proporcionar un producto provisto de actividad antiinflamatoria y posiblemente antimicrobiana o antifúngica cuyo uso está sustancialmente libre de efectos secundarios. También es deseable proporcionar un producto que sea activo en el control de la microbiota humana.

Otro objetivo de la invención reside en la provisión de un producto no esteroideo provisto de actividad antiinflamatoria, que está específicamente dirigido a la aplicación tópica sobre la piel o mucosas, tales como mucosas vaginales.

40 Este último se dirige, en general, contra bacterias y/u hongos patógenos, funcionando, dependiendo de la diana, bien como agente bactericida o bacteriostático o como agente fungicida u fungistático.

Por otro lado, al contrastar los patógenos, se logra una restauración más rápida de las condiciones de homeostasis a través de la normalización del microbioma residente.

Compendio de la invención

45 La presente invención procede del hallazgo de que una cepa bacteriana seleccionada del género Cutibacterium, especie acnes, promueve la proliferación de fibroblastos y tiene la capacidad de interferir con el crecimiento de la mayoría de las bacterias y hongos comunes, especialmente aquellos que afectan a la piel humana.

50 En particular, la cepa bacteriana seleccionada de Cutibacterium acnes tal y como se define en la reivindicación 1, fragmentos de su pared celular o postbióticos o composición que contienen la misma tal y como se define en la presente memoria, muestran una regulación en el sistema inmunitario combinada con un efecto inhibidor mejorado

sobre microorganismos patógenos de la piel. Estos efectos están relacionados en parte con una interferencia por la cepa con la unión del patógeno a las células huésped.

5 Además, los inventores han descubierto que cepas bacterianas vivas o muertas o parte de ellas, tales como fragmentos de su pared de la invención, producen sustancias o subproductos que promueven el crecimiento y la migración de las células de fibroblastos. Esta propiedad apoya además el uso de la cepa seleccionada o de sustancias producidas por la misma como agentes inmunomoduladores y la convierte en un candidato adecuado para aplicaciones en el campo dermatológico o ginecológico, especialmente en el tratamiento de infecciones de la piel bacterianas o fúngicas, especialmente de *Candida Albicans* o infecciones bacterianas.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, una cepa bacteriana del género *Cutibacterium* especie *acnes* depositada con el número de acceso (o número de registro) DSM 28251 en the International Deposit Authority Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, o una variante que se deriva esencialmente de dicha cepa.

15 En un aspecto, la invención proporciona usos médicos de la cepa bacteriana de *Cutibacterium acnes* mencionada anteriormente depositada con el número de acceso DSM 28251. Según este aspecto, la cepa de la invención es para administración tópica o sistémica.

Administración sistémica significa una vía de administración de un medicamento, nutrición que incluye la cepa de la invención en el sistema circulatorio de manera que todo el cuerpo se ve afectado. La administración puede tener lugar mediante administración enteral, oral o administración parenteral, por ejemplo, por inyección, infusión o implantación.

20 La administración o aplicación tópica es la vía de administración preferida de la *Cutibacterium acnes* DSM 28251 según la presente invención. La *Cutibacterium acnes* DSM 28251, postbióticos, fragmentos de pared celular y composiciones que contienen los mismos fragmentos de la misma se pueden aplicar sobre la piel en cualquier forma adecuada para aplicación tópica.

25 Según otro aspecto, la invención proporciona cepas o variantes de la cepa bacteriana DSM 28251 como se ha identificado anteriormente, que se derivan esencialmente por mutación espontánea, mutación inducida y selección, hibridación y selección u otros métodos de manipulación genética, y pueden rastrearse hasta ella. En otro aspecto, la invención se refiere a postbióticos de la cepa anterior y a usos médicos o nutricionales de la misma.

La cepa bacteriana, según la presente invención, puede aislarse y seleccionarse de piel sana, entre la multitud de cepas que componen el microbioma de la piel.

30 Según otro aspecto más, la invención se refiere a la cepa bacteriana de *Cutibacterium acnes*, depositada con el número de acceso DSM 28251 en the International Deposit Authority Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, o una variante esencialmente derivada de dicha cepa, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o infección inflamatoria, especialmente de la piel o mucosas.

35 Preferiblemente, la cepa bacteriana de la invención encuentra aplicaciones en el campo dermatológico y ginecológico, por ejemplo en el tratamiento de la inflamación de la piel o mucosas o infecciones de bacterias, hongos o protozoos. En particular, la cepa anterior es eficaz en la prevención y o tratamiento de infecciones, especialmente de la piel.

40 La cepa seleccionada de la invención es eficaz en el tratamiento de hongos, especialmente levaduras del género *Candida* spp, especialmente *Candida Albicans*, o dermatofitos tales como *Malassezia* spp, ambos están entre los agentes causantes más comunes de infecciones oportunistas del cuerpo humano. Además, la cepa seleccionada de la invención se utiliza en el tratamiento de infecciones fúngicas que son resistentes a los productos antifúngicos disponibles en el mercado.

La invención también proporciona el uso proctológico de *Cutibacterium acnes* DSM 28251, especialmente inactivada térmicamente, postbiótico o fragmento de pared de esta cepa, o una composición tópica de la misma, especialmente en el tratamiento de hemorroides o fisuras anales o cicatrices de la piel.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de ácido hialurónico con un fragmento de la pared bacteriana de *C. acnes* DSM 28251, en particular para su uso en el tratamiento de heridas, abrasión, ulceraciones de la piel, por ejemplo úlceras por presión. Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso cosmético de la cepa bacteriana identificada anteriormente para mejorar un aspecto estético de la piel tal como enrojecimiento o cuperosis.

Según otro aspecto, la invención se refiere a usos nutricionales de la cepa identificada anteriormente o de un postbiótico obtenido de ese modo.

50 **Breve descripción de las Figuras**

La invención se describirá ahora en detalle y con referencia a las Figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra gráficos de barras que reportan los valores del septo del Ejemplo 1, calculados con el software imagenJ;

La Figura 2 muestra gráficos de barras con el área del septo del Ejemplo 1, calculado con el software imagenJ;

La Figura 3 muestra gráficos de barras que muestran los efectos in vitro sobre la curva de crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* al añadir en los medios de cultivo diferentes concentraciones de *C. acnes* DSM 28251 inactivada térmicamente.

5 La Figura 4 muestra la preparación del sobrenadante y de *Staphylococcus aureus* utilizados en el ensayo del Ejemplo 3.

Las Figuras 5A y 5B muestran gráficos que muestran la tasa de supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* después de la inyección con sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* ATCC BAA1680 (A) y *S. aureus* ATCC 29213 (B) pre-incubados con formulaciones ensayadas durante 1 h según el Ejemplo 4. "Sobrenadantes+formaA" representa el sobrenadante incubado con LimpiAD A, "Sobrenadantes+formaD" el sobrenadante incubado con la formulación LimpiAD D, "Sobrenadantes+pared" sobrenadante incubado con los componentes activos LimpiAD, "Sobrenadantes" pos control, "Medio" para el medio de cultivo solo (sin cultivo bacteriano), "disolución salina" para el tratamiento simulado.

10 Las Figuras 6A y 6B muestran gráficos que muestran la tasa de supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* después de la inyección con sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* ATCC BAA1680 (A) y *S. aureus* ATCC 29213 (B) pre-incubados con formulaciones ensayadas durante 4 h, según el Ejemplo 4. "Sobrenadantes+formaA" representa el sobrenadante incubado con la formulación de LimpiAD A (como se define en el Ejemplo 4), "Sobrenadantes+formaD" el sobrenadante incubado con LimpiAD D, "Sobrenadante+pared" sobrenadante incubado con los componentes activos de LimpiAD, "Sobrenadantes" pos control, "Medio" para el medio de cultivo solo (sin cultivo bacteriano), "Solución salina" para el tratamiento simulado.

15 La Figura 7 muestra la expresión de genes diana "normalizados" en el control, expresados como veces que aumenta o disminuye tal y como se reporta en el Ejemplo 4.

20 La Figura 8 muestra cinco gráficos que ilustran cada uno curvas de crecimiento comparativas de cepas de *Staphylococcus aureus* (tres cepas diferentes), *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans* inoculadas con sobrenadantes (más Control sin cepas) de siete cepas conocidas de *Cutibacterium acnes* y de la cepa (comparativa) de *Cutibacterium acnes* DSM 28251;

25 La Figura 9 muestra cinco gráficos que muestran cada uno curvas de crecimiento comparativas de tres cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa de *Staphylococcus epidermidis* y una cepa de *Candida albicans* cada una en un medio inoculado con siete cepas conocidas diferentes inactivadas térmicamente de *Cutibacterium acnes* y con la cepa de *Cutibacterium acnes* DSM 28251 (cepa comparativa inactivada térmicamente);

30 La Figura 10 muestra cinco gráficos que muestran cada uno curvas de crecimiento comparativas de tres cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa de *Staphylococcus epidermidis* y una cepa de *Candida albicans* cada una en un medio inoculado con fragmentos de pared bacteriana obtenidos por homogeneización y después separación en gradiente de siete cepas conocidas diferentes de *Cutibacterium acnes* y por la cepa de *Cutibacterium acnes* DSM 28251 (fragmento comparativo de pared bacteriana).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una cepa perteneciente al género *Cutibacterium* especie *acnes*, presentada con el número de acceso DSM 28251 (ID 19-401) en the International Deposit Authority Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, o una variante esencialmente derivada de dicha cepa.

La invención también se refiere a un postbiótico como se define en las reivindicaciones 2, 3 y una pared celular como se define en las reivindicaciones 4, 5.

La cepa bacteriana anterior se proporciona tanto con una actividad antiinflamatoria in vivo como al menos una actividad antimicrobiana in vitro. También se proporciona una pared celular o un postbiótico de la cepa anterior con estas actividades.

Las actividades anteriores se demuestran mediante los ensayos experimentales llevados a cabo por los inventores y reportados en los siguientes ejemplos. Estos ensayos proporcionan una base científica para el uso de la cepa bacteriana identificada anteriormente como agentes antiinflamatorios, inmunomoduladores y antimicrobianos, especialmente para aplicaciones tópicas.

50 En ciertos aspectos de la invención, se proporciona en la presente memoria una composición, especialmente una composición farmacéutica o nutricional, que contiene una cepa/pared o postbiótico como se define en la presente memoria.

Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa/pared/postbiótico identificados anteriormente como un medicamento y a usos médicos de los mismos especialmente como se define en las reivindicaciones 9-13.

Las propiedades intrínsecas de la cepa bacteriana seleccionada proporcionan una acción antiinflamatoria que permite al médico tratar una amplia gama de enfermedades, especialmente aquellas localizadas en la piel o mucosa del cuerpo humano.

5 Además, las propiedades antibacterianas y/o bacteriostáticas de la cepa seleccionada la hacen útil en el tratamiento de infecciones, especialmente infecciones de la piel y mucosas. La cepa seleccionada ha demostrado ser eficaz contra bacterias comunes, especialmente bacterias gram positivas, especialmente bacterias como Staphylococcus aureus, o contra Escherichia coli y hongos, por ejemplo, del género Candida.

10 La cepa según la presente invención se caracteriza genotípicamente y es identificable de una manera clara y definida por rasgos específicos identificados dentro del genoma. Esta cepa ha evolucionado espontáneamente, sin ninguna intervención directa ni manipulación genética, y tiene las características relevantes para la aplicación industrial. Para comprobar y determinar las características de la cepa DSM 28251 y descartar el posible solapamiento de esta cepa con las cepas descritas en la técnica anterior, se realizó una caracterización del genotipo por DSMZ.

15 En un aspecto, la invención se proporciona para el uso cosmético de una composición tópica tal y como se define en las reivindicaciones 7, 8, especialmente para el tratamiento o prevención cosméticos de la piel sensible, piel roja, cuperosa, esqui seco, en particular de la cara de un ser humano.

En determinados aspectos, la invención también se refiere a una cepa o pared o postbiótico de la cepa de C. acnes DSM 28251 para usos médicos en el tratamiento de:

- una enfermedad ginecológica tal como vaginitis, infección o inflamación vaginal o
- un trastorno proctológico, por ejemplo hemorroides, fisuras anales o cicatrices cutáneas o el área perianal o
- 20 - heridas, lesiones, abrasión, ulceraciones de la piel, por ejemplo úlceras por presión o heridas cicatrizantes.

Definiciones en la presente invención:

25 - "Cepa DSM 28251" pretende incluir una cepa bacteriana del género Cutibacterium, especie acnes, presentada el 18 de diciembre de 2013 (referencia de identificación ULTIMO) y convertida en un depósito según The Budapest Treaty el 22 de diciembre de 2019 con el número de acceso DSM 28251 en The International Deposit Authority Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Típicamente, Cutibacterium acnes es una bacteria grampositiva.

30 - "Manipulación genética" pretende incluir cualquier intervención técnica destinada a dirigir el proceso de adquisición de características genéticas específicas que se expresan como rasgos fenotípicos correspondientes, donde las intervenciones técnicas comprenden (Sturley & Young, 1986): (i) el cruce de cepas naturales, seguido de selección; (ii) la producción de híbridos seguido de selección; (iii) la transformación, es decir, la inserción de DNA exógeno en cromosomas o en el genoma mitocondrial, u otros elementos genéticos tales como plásmidos; (iv) la mutagénesis aleatoria inducida normalmente seguida de selección y/o producción de híbridos (Nevoigt 2008) se puede añadir como modo adicional de manipulación;

35 - "Variante derivada" pretende incluir una variante de la cepa de la cepa de Cutibacterium acnes, depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 28251, que puede rastrearse hasta ella mediante perfiles de DNA microsatélite o debido a un rasgo genético distintivo detectable mediante secuenciación genómica y análisis comparativo.

40 - "Medio de crecimiento" (sinónimos: medio, medio de crecimiento/caldo de cultivo/caldo de crecimiento) se refiere a un sustrato que contiene todos los compuestos (factores) necesarios para un microorganismo, especialmente una bacteria tal como una bacteria gram+ para la replicación celular que resulta en el aumento del número de células individuales y el crecimiento de la población. Los factores necesarios para los microorganismos para su crecimiento en el medio pertenecen principalmente a las categorías: fuente de carbono, fuente de nitrógeno similar (constituida tanto por amoniaco como por aminoácidos libres, el último también conocido como FAN), vitaminas y sales (oligoelementos). Fuentes de carbono típicas son melaza de caña de azúcar, melaza de remolacha, extracto de malta de cebada y extracto de malta de trigo.

45 La composición de células no vitales/células no viables, extractos celulares, lisado celular está estrictamente relacionada con las propiedades metabólicas y fisiológicas únicas de la cepa DSM 28251.

- "Postbióticos" significa productos bacterianos no viables incluyendo subproductos metabólicos secretados por un microorganismo tal y como la cepa depositada en la DSMZ con número de acceso DSM 28251 que tienen actividad biológica en el huésped o cuando se aplica sobre un tejido del cuerpo humano tal como la piel.

50 Los postbióticos también comprenden materiales de la cepa de Cutibacterium DSM 28251, incluyendo células inactivadas térmicamente, el sobrenadante de células lisadas mecánicamente o fragmentos de pared celular.

Los postbióticos proporcionan beneficios fisiológicos al huésped y pueden usarse para formular una composición para usos médicos o cosméticos y para administración oral y/o tópica tal y como se describe en la presente memoria.

El postbótico de la cepa de Cutibacterium DSM 28251 puede obtenerse según un procedimiento/proceso general que incluye las siguientes etapas:

5 La cepa bacteriana se cultiva en un medio o en un caldo para obtener una suspensión.

La suspensión se centrifuga en tubos de ensayo, usando tecnología convencional.

Al final de la centrifugación, se obtiene una estratificación de la suspensión. Un sedimento que contiene las células se deposita en el fondo del tubo de ensayo con una capa superior que contiene el sobrenadante, que es el líquido/medio de cultivo.

10 El sobrenadante se retira después dejando el sedimento depositado en el fondo del tubo de ensayo, que se recoge y se lava con agua. El sedimento se re-suspende después en una solución fisiológica (disolución salina) para obtener las células y se centrifuga adicionalmente para eliminar el medio de cultivo restante. Las células suspendidas en agua se tratan mecánicamente con un agitador mecánico, tal como Ultraturrax (lisis mecánica).

Con la lisis mecánica de la pared celular se libera el contenido celular y se obtiene el postbiótico (sobrenadante).

15 Las realizaciones específicas de este procedimiento se describen en la siguiente descripción detallada y en los Ejemplos.

- "Vehículo" se refiere a un excipiente, vehículo, diluyente o adyuvante, que puede o puede estar presente en la composición de la invención.

20 - "Producto nutricional" significa un producto, que mejora el estado nutricional y puede usarse para apoyar o mejorar la actividad funcional de uno o más órganos o la funcionalidad del cuerpo humano dentro de los límites fisiológicos.

- "Cepa bacteriana seleccionada" o "cepa" tal y como se menciona en la presente memoria significa la cepa de la invención depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 28251.

25 - "Pared celular" o "pared de la cepa bacteriana (de la invención)" significa la pared celular de la cepa bacteriana de Cutibacterium acnes depositada con el número de acceso DSM 28251.

La pared de la cepa de la invención puede romperse en partes o fragmentos. El término "fragmento" significa una parte de la pared de la cepa DSM 28251 de la invención. Un fragmento también puede designar un lisado celular de la pared de la cepa DSM 28251.

30 Un fragmento o lisado de la pared celular de la cepa DSM 28251 puede obtenerse por métodos convencionales o generales de rotura celular, por ejemplo como se describe en la presente memoria más adelante:

Las bacterias en caldo o medio de cultivo se lavan y deslipidan típicamente usando un extractor soxhlet. Las bacterias deslipidadas se suspenden después en agua y después se someten a lisis mecánica, por ejemplo con un agitador mecánico, por ejemplo usando un Ultraturrax y el contenido se trata con sulfato de amonio para precipitar los fragmentos de la pared bacteriana.

35 Los fragmentos pueden limpiarse después por ejemplo lavando con agua para obtener fragmentos de pared.

Un procedimiento específico para obtener un fragmento de pared de la cepa de C. acnes DSM 28251 se describe en el Ejemplo 6.

Una destrucción/rotura adecuada de la cepa o de su pared puede conseguirse sometiendo la cepa de la invención a métodos mecánicos/tratamientos de lisis o métodos no mecánicos/tratamientos de lisis.

40 **Rotura de la cepa con métodos/aparatos mecánicos**

Los métodos mecánicos adecuados para romper (lisis) la pared de la célula de la presente cepa y obtener fragmentos de pared incluyen métodos de cizallamiento sólido o cizallamiento líquido.

El cizallamiento sólido incluye el uso de molino de perlas, prensa X o prensa Hughes.

45 El cizallamiento líquido incluye sonicación y métodos de alta presión que incluyen la prensa Hughes o la prensa francesa y/o la homogeneización con un homogeneizador o el uso de un homogeneizador de microfluidos.

La técnica con molino de perlas (o abrasión) incluye típicamente la agitación de una suspensión de la cepa con perlas de vidrio.

5 Típicamente, la rotura de la pared de la célula con un método de molino de perlas se lleva a cabo en un molino de perlas que incluye una cámara de molienda con camisa con un eje giratorio que pasa por su centro. El eje está equipado con agitador(s) que imparte la energía cinética a las perlas en la cámara, forzándolas a colisionar entre sí (Chisti & Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995). Las perlas adecuadas pueden tener un diámetro de 0,10-0,15 mm para la rotura eficaz de las bacterias. Los grandes aparatos industriales pueden usar perlas de 0,4-0,6 mm de diámetro debido al mecanismo para separar las perlas de la suspensión (Kula & Sutte, 1987). La velocidad de punta adecuada es de al menos 10 m^{-1} para la rotura de las bacterias (Kula & Shutte, 1987). Las concentraciones celulares pueden variar del 40-50% en peso húmedo en el caldo introducido en la cámara.

10 Los cizallamientos sólidos adecuados también comprenden sonicación y métodos de alta presión, incluyendo la prensa Hughes o la prensa francesa, en la que una suspensión congelada de células se fuerza a través de una pequeña abertura mediante altas presiones (Engler, 1985).

La sonicación incluye el uso de ultrasonidos, ondas sonoras típicamente con una frecuencia superior a 15-20 kHz que puede romper la pared de células en suspensión. Potencia acústica adecuada, por ejemplo, cuando se sonicen 5-30 mL de una suspensión bacteriana al 20% en un medio líquido convencional usando 35-95 W de potencia acústica.

15 Alternativamente, la rotura mecánica puede obtenerse en un homogeneizador de válvula de alta presión haciendo pasar una suspensión celular de la cepa a alta presión a través de una válvula de descarga de orificio restringido ajustable, tal como lo reporta Engler, 1985. Típicamente, un diseño de homogeneizador básico comprende una bomba de desplazamiento positivo que fuerza una suspensión celular a través del centro de un asiento de válvula y a través de la cara de asiento. El ajuste de la fuerza sobre la válvula controla la presión. El fluido fluye radialmente a través de la válvula e incide en un anillo de impacto (Middelberg, 1995). La rotura da como resultado la separación inespecífica de la pared celular.

20 El tipo de homogeneizador ejemplar es el diseño Manton-Gaulin APV (Middelberg, 1995). Por ejemplo, la temperatura se eleva de aproximadamente 21°C por 10 MPa en un homogeneizador. Existe una fuerte influencia de la presión de funcionamiento sobre el proceso de rotura en el homogeneizador. Al operar el homogeneizador a presiones más altas, es posible disminuir el número de pases de la suspensión de células a través del homogeneizador para un grado dado de rotura (Chisti & Moo-Young, 1986; Bury et al., 2001).

25 También se puede usar un homogeneizador de microfluidos como equipo para obtener pared celular fragmentada. En este aparato, dos corrientes de una suspensión celular impactan a alta velocidad contra una superficie estacionaria y la entrada de energía se disipa casi instantáneamente en el punto de impacto, lo que conduce a la rotura de las células (Middelberg, 1995; Agerkvist & Enfors, 1990). El tiempo de permanencia de la suspensión de la cepa en la cámara de rotura de los microfluidos, que es la parte más caliente del dispositivo, es de 25-40 ms. El enfriamiento en su lugar puede conseguirse mediante inmersión de la cámara de rotura en un baño de hielo (Sauer et al., 1989; Geciova, experiencia personal). La fracción de células rotas aumenta con el aumento de la presión y el número de pases.

Rotura de la cepa con métodos no mecánicos

35 Un método no mecánico se basa en la descompresión obtenida introduciendo un gas subcrítico o supercrítico presurizado en las células, provocando la rotura después de la liberación de la presión aplicada por expansión.

Otra rotura no mecánica de la pared celular puede obtenerse mediante choque osmótico en el que una suspensión de la cepa celular se diluye en un medio/caldo líquido después del equilibrio a alta presión osmótica en condiciones convencionales.

40 Un método alternativo para la lisis celular es la termólisis que implica el tratamiento térmico de las células en condiciones convencionales. Otra lisis celular no mecánica puede obtenerse por permeabilización química especialmente con una sustancia seleccionada de antibióticos tales como antibiótico de beta lactamas, por ejemplo penicilina, agentes quelantes, por ejemplo EDTA, caotropos, por ejemplo urea, guanidina, etanol, detergentes, por ejemplo la serie Triton X, dodecilsulfato de sodio, laurilsarcosinato de sodio, disolventes tales como tolueno, acetona, cloroformo, hidróxidos tales como hidróxido de sodio, hipocloritos tales como hipoclorito de sodio y mezclas de los mismos.

45 La lisis celular de la cepa también puede obtenerse mediante lisis enzimática, por ejemplo, usando una proteasa y glucanasa para atacar, en primer lugar, el complejo de manoproteínas de la pared celular y después el esqueleto de glucano (Kitamura, 1982). Un producto adecuado para la lisis de la pared de la cepa es el producto comercial Zymolase-20T (Seikagaku America, Inc., Rockville, MD). La lisozima también puede usarse para la lisis de capas de peptidoglicano ya que cataliza la hidrólisis de enlaces b-1,4-glicosídicos.

50 Según una realización preferida, un fragmento de pared de la cepa de *C. acnes* DSM 28251 se puede obtener por tratamiento de la cepa bacteriana con sulfato de amonio, preferiblemente a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, por ejemplo, en el intervalo de 10 a 2°C, y de manera ventajosa después del tratamiento, la suspensión se centrifuga y se recoge el fragmento precipitado.

55

- De manera ventajosa, antes del tratamiento con sulfato de amonio, la cepa de *C. acnes* DSM 28251 se seca y se centrifuga opcionalmente con agua. Opcionalmente, después de la centrifugación, el sobrenadante resultante de la centrifugación se calienta, por ejemplo, a una temperatura de 40 a 95°C, preferiblemente a 75-85°C y después se enfría, por ejemplo, con agua fría, preferiblemente a 3 a 15°C. Después de eso, la etapa de precipitación se realiza incubando con una solución de sulfato de amonio a una concentración de 20 a 60 % v/v, por ejemplo, de 2 a 10°C. De manera ventajosa, después de la incubación, la suspensión obtenida se centrifuga y el fragmento precipitado puede recogerse. Por ejemplo, el sedimento bacteriano se deslipida mediante tratamiento con Soxhlet usando disolventes orgánicos seleccionados de éter-etanol, cloroformo, metanol-cloroformo y una mezcla de los mismos, después se seca, por ejemplo, en una campana de flujo laminar. Después del secado, el sedimento se homogeneiza mediante 2 etapas de tratamiento con Ultraturrax, preferiblemente 1 minuto cada una, añadiendo agua destilada, preferiblemente en la proporción de 1:2 p/v. Después de la centrifugación, el sobrenadante se calienta a 80°C y después se enfría en agua fría, preferiblemente de 3 a 15°C, y finalmente en hielo. Posteriormente, la etapa de precipitación de fragmentos se realiza mediante la incubación con sulfato de amonio frío al 40 % v/v durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación, la suspensión se centrifuga, y el fragmento precipitado se recogió y se liofilizó.
- En algunas realizaciones, el fragmento de la pared celular de *Cutibacterium acnes* depositada con el número de acceso DSM 28251 se deslipida, es decir, se trata para eliminar o reducir considerablemente el componente lipídico de la pared celular de la bacteria por medio de técnicas químicas/biotecnológicas. Por ejemplo, la *Cutibacterium acnes* depositada con el número de acceso DSM 28251 se deslipida antes de la trituración para producir los fragmentos de pared celular. Típicamente, los fragmentos deslipidados de la pared celular de la cepa de la invención comprenden azúcares y cadenas peptídicas, típicamente unidas entre sí en glicopéptidos que forman una malla tejida cerrada. Los azúcares típicos de la pared celular comprenden ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- La cepa bacteriana DSM 28251 y cepas esencialmente derivadas de la misma o un fragmento o postbiótico resultante de la misma demuestran ser extremadamente ventajosos para la aplicación industrial en la preparación de composiciones farmacéuticas, especialmente para aplicación tópica.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana como se definió anteriormente, fragmento o postbiótico resultante de la misma y un excipiente farmacéutica o fisiológicamente aceptable. El vehículo, diluyente o excipiente fisiológica o farmacéuticamente adecuado puede seleccionarse basándose en la vía de administración para la que se pretende la composición farmacéutica resultante.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición preparada mezclando una cepa tal y como se define en la presente memoria, fragmento de la misma o postbiótico de la misma según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones son adecuadas para uso farmacéutico en un animal o ser humano.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa como se ha definido anteriormente o fragmento/postbiótico de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- Una composición farmacéutica puede contener opcionalmente otros principios activos. El término "vehículo" se refiere a un vehículo, excipiente, diluyentes o adyuvante con el que se administra el principio terapéutico o activo. Se contempla cualquier vehículo y/o excipiente adecuado para la forma de preparación deseada para la administración para su uso con las cepas/pared/postbiótico descritas en la presente memoria.

- El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo oral o parenteral, incluyendo intravenosa. En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, se puede emplear uno cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones orales sólidas frente a las preparaciones líquidas.

- En determinadas realizaciones, la cepa/pared/postbiótico de la presente invención se puede combinar como un principio activo en una mezcla íntima con un vehículo y/o excipiente farmacéutico adecuado según las técnicas de composición farmacéutica convencionales.

- Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración parenteral, incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa, pulmonar, nasal, rectal, tópica u oral. La vía de administración adecuada en cualquier caso dado dependerá en parte de la naturaleza y gravedad de las afecciones que se están tratando y de la naturaleza del principio activo. Una vía de administración ejemplar es la vía oral. Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante uno cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Las composiciones preferidas incluyen composiciones adecuadas para administración oral, parenteral, tópica, subcutánea o pulmonar, en forma de inhalación nasal o bucal. Las

composiciones pueden prepararse mediante uno cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsión, polvos, supositorios y como formulaciones de liberación sostenida.

5 Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas. En determinadas realizaciones, dichas composiciones y preparaciones pueden contener al menos 0,1 por ciento de cepa. El porcentaje de cepa/pared/postbiótico activo en estas composiciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 60 por ciento 0,5 a 20% del peso de la unidad. La cantidad de cepa/pared/postbiótico activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación terapéuticamente activa. La cepa/pared/postbiótico también se puede administrar intranasalmente como, por ejemplo, gotas líquidas o pulverización.

10 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un agente aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Para evitar la descomposición durante el tránsito a través de la parte superior del tracto gastrointestinal, la composición será una formulación con recubrimiento entérico.

En el marco de la invención, se prefieren los usos tópicos. Por consiguiente, en determinadas realizaciones preferidas, la composición es para la aplicación tópica. En esta aplicación, la composición que contiene cepa/pared/postbiótico tal y como se define en la presente memoria puede aplicarse sobre la piel de los seres humanos.

25 Las composiciones para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, pomadas, cremas, lociones, soluciones, pastas, geles, barras, liposomas, nanopartículas, parches, vendas y apósitos para heridas. En determinadas realizaciones, la formulación tópica comprende un potenciador de penetración.

30 Las composiciones para administración pulmonar incluyen, pero no se limitan a, composiciones de polvo seco que consisten en el polvo de una cepa/fragmento/postbiótico, y el polvo de un vehículo y/o lubricante adecuado. Las composiciones para administración pulmonar pueden inhalarse desde cualquier dispositivo inhalador de polvo seco adecuado conocido por un experto en la técnica.

Típicamente, la composición para uso tópico puede contener una cantidad de la cepa bacteriana identificada anteriormente de 0,00001% a 10%, de 0,0001 a 3%, de 0,1 a 2% en peso con respecto al peso total de la composición.

35 La composición para aplicación tópica puede estar en forma sólida, semisólida o fluida. Las formulaciones adecuadas en forma sólida incluyen cremas, geles, pomadas, pastas, ungüentos, cremas, parches.

La composición para aplicación local en forma fluida puede estar en forma de lociones, geles, suspensiones, emulsiones.

40 En el caso de la forma de formulaciones fluidas o semifluidas, la cepa bacteriana puede diluirse en un vehículo en forma líquida fisiológicamente aceptable tal como agua, alcohol, solución hidroalcohólica o de glicerilo o mezclarse con otros líquidos adecuados para aplicación local.

A modo de ejemplo, las composiciones de la invención en forma líquida pueden prepararse disolviendo o dispersando la cepa bacteriana o un subproducto de la misma en agua y/o alcohol. La composición líquida puede tamponarse para alcanzar un intervalo de pH convenientemente seleccionado de 5 a 7 para que sea compatible con el pH de la piel y después filtrarse y envasarse en recipientes adecuados tales como botellas o viales.

45 En una realización, la formulación para la aplicación local está en forma de una crema o emulsión que contiene la cepa bacteriana transportada en un excipiente adecuado.

Según otras realizaciones, la composición de la invención está en forma para administración sistémica, en particular para administración oral. En estos casos, la composición contiene la *cepa bacteriana* como se ha definido anteriormente y uno o más vehículos o excipientes adecuados para administración sistémica.

50 La administración de las composiciones se realiza bajo un protocolo y a una dosificación suficiente para reducir la enfermedad objetivo en el sujeto.

En algunas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención el principio activo o principios activos se formulan generalmente en unidades de dosificación. La unidad de dosificación puede contener de 0,00001 a 1000 mg de una cepa/pared/postbiótico por unidad de dosificación para administración diaria.

En algunas realizaciones, las cantidades eficaces para la formulación tópica dependerán de la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, terapia previa, el estado de salud del individuo y la respuesta al fármaco. En algunas realizaciones, la dosis está en el intervalo de 0,001 % en peso a aproximadamente 60 % en peso de la formulación.

5 Cuando se usa en combinación con uno o más de otros ingredientes activos, la cepa/pared/postbiótico de la presente invención y el otro ingrediente activo se pueden usar en dosis más bajas que cuando cada uno se usa individualmente.

10 Con respecto a las formulaciones con respecto a cualquier variedad de vías de administración, se describen métodos y formulaciones para la administración de fármacos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., 1985, y Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. 20th Edition, 2000, Williams & Wilkins PA, USA y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Eds., 2005; y en Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Eds., 2005.

En determinadas realizaciones, la composición de la invención para administración oral es un producto nutricional o dietético o nutracéutico.

15 A continuación se describen ejemplos de realizaciones y procedimientos preferidos de la presente invención para ilustrar la invención.

Ejemplo 1

Migración potencial in vitro de células de fibroblastos humanos estimuladas con sobrenadante derivado de un cultivo de la cepa bacteriana con No. de Acceso DSM 28251.

Objetivo del estudio

20 Uno de los mecanismos de acción del sobrenadante de un cultivo de la cepa bacteriana con No. de acceso DSM 28251 se atribuye a un efecto postbiótico. El término postbiótico se refiere a subproductos metabólicos de microorganismos, especialmente bacterias y/o probióticos. Típicamente, los postbióticos se producen por la actividad metabólica o los procesos fermentativos de bacterias tales como probióticos (microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos para los huéspedes cuando se administran en cantidades adecuadas).

25 Los postbióticos desempeñan papeles extremadamente importantes en la regulación de la salud y el mantenimiento de una microbiota sana.

Uno de los objetivos de este estudio es evaluar el efecto postbiótico sobre la migración de células de fibroblastos de piel humana inmortalizadas, para evaluar si con el sobrenadante derivado de un cultivo de la cepa bacteriana con número de acceso DSM 28251 se promueve la migración de esta línea celular.

Muestras ensavadas

Sobrenadante derivado de un cultivo de la cepa bacteriana con número de acceso. DSM 28251.

Materiales y métodos

Bacterias

35 La cepa bacteriana con número de acceso DSM 28251 de la invención se cultivó en medio de caldo infusión cerebro corazón (BHI) durante la noche a 37°C y después para evaluar el efecto postbiótico, el sobrenadante del crecimiento bacteriano se centrifugó y posteriormente se filtró (0,45 µm) para eliminar las células bacterianas. Antes de su uso, se sembró una alícuota en agar BHI y se incubó durante 24 horas a 37°C para verificar la ausencia de crecimiento microbiano.

Línea celular

40 Células del fibroblasto de la piel humana no tumorigénicas se mantuvieron en matraces de cultivo de 25 cm² en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 1% de L-glutamina 200 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomocina (100 µg/mL) y 10% de FBS. Las células, después de lavar con DPBS, se separaron a temperatura ambiente con solución 1X de tripsina-EDTA al 0,25%, y las células se observarán bajo un microscopio invertido hasta que la capa celular se dispersará (normalmente en 5 minutos). Las células se colocaron en placas en µ-Dish (diámetro 45 35 mm) que contenían el inserto de cultivo (código 81176 lbi, Giemme, Italia). El inserto de cultivo consiste en dos pocillos; cuando ambos pocillos se llenan con células adherentes, se crea un espacio libre de células (canal) de aproximadamente 500 µm después de retirar el inserto de cultivo. La suspensión celular se preparó a la densidad de 3-7 x 10⁵ células/mL, se aplicó en los dos pocillos de inserto de cultivo (70 µL/pocillo) y se mantendrá a 37°C en CO₂ al 5 % en DMEM suplementado con 1% de L-glutamina 200 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomocina (100 µg/mL) y 50 FBS al 10 %. Después de 24 horas de unión celular apropiada, el inserto de cultivo se retirará usando pinzas estériles y la µ-Dish se llenó con medio (2 mL).

Experimento celular para análisis de migración

Las células se trataron con sobrenadante, previamente filtrado, derivado de un cultivo de bacterias Aileens diluido 1:10 y 1:100 con DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco). Además, se han usado como control fibroblastos tratados con BHI diluidos a 1:10 y a 1:100 con DPBS.

- 5 Las células se mantendrán durante 24 horas más. El grado de migración celular se fotografiará mediante un Digital Microscope Eyepiece y se medirá usando el software de análisis de imágenes, Image J (V 1.45s, proporcionado por the National Institute of Health, USA). Cada imagen se transformará posteriormente en negativo usando una función del software y después se medirá. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como una media \pm SE. Se utilizará la prueba T de Student para la significación estadística. Los valores de $p > 0,05$ se considerarán estadísticamente significativos.
- 10

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que el sobrenadante de la cepa bacteriana con No. de acceso DSM 28251 diluido 1:10 y 1:100 con DPBS promueve la migración celular (Figura 1 y 2). Además, BHI diluido 1:10 y 1:100 con DPBS no interfiere con la migración de fibroblastos.

15 **Ejemplo 2**

Actividad de la cepa bacteriana inactivada térmicamente depositada bajo el No. de Acceso DSM 28251 con DSMZ sobre el crecimiento de microorganismos patógenos humanos.

Material y métodos

- 20 La cepa bacteriana se ha cultivado en medio de infusión cerebro-corazón (BHI) durante una noche a 37°C y después se ha inactivado térmicamente a 60°C durante 1 hora.

- El cultivo se lavó con agua para lavar el medio y el cultivo libre de medio se diluyó a 10^7 , 10^6 y 10^5 CFU/ml de ambos en medio Müller Hinton (MH) o Sabouraud. 10^5 células/ml de inóculo *S. aureus* ATCC 29213, y *E. coli* ATCC 11775 se cultivaron por triplicado en el volumen final de 150 ul de cada dilución de Muller Hinton del cultivo inactivado térmicamente en una placa de 96 pocillos. De manera similar, 10^5 células/ml de inóculo *C. albicans* se cultivaron por triplicado en diluciones 10^7 , 10^6 y 10^5 de Sabouraud del cultivo bacteriano inactivado. Como controles, se produjeron triplicados de todas las diluciones en ambos medios, así como controles para el crecimiento de las cepas se produjeron con 10^5 células/ml de inóculo de las cepas de *S. aureus* y *E. coli* y *C. albicans* en el volumen final de 150 ul de medio de Müller Hinton y Sabouraud respectivamente. La densidad óptica (O.D.) a la longitud de onda de 600 nm se midió para cada pocillo antes (T0) y después de 3, 6, 20 y 24 horas (T3, T6, T20, T24) de incubación a 37°C. El crecimiento como tendencia de los valores de O.D. observado para cada cepa en el medio añadido por la cepa inactivada térmicamente se comparó con uno del medio Muller Hinton o Sabouroaud solo.
- 25
- 30

La capacidad de la cepa bacteriana con No. de acceso DSM 28251 para interferir o inhibir el crecimiento microbiano de bacterias y hongos encontrados comúnmente en la piel humana (véase cepas bacterianas probadas) se probó con un método espectrofotométrico descrito por Hall et. al.

- 35 La inhibición del crecimiento microbiano se evaluó en placas de poliestireno de 96 pocillos. Las diluciones en serie de la mezcla tindalizada (de 10^7 a 10^5 CFU/ml) se inocularon con los microorganismos ensayados, junto con microorganismos solos (control) y medio (blanco). Todas las cepas microbianas se ensayaron según las directrices del CLSI (Clinical Standard Laboratory Institute) [3,4].

- 40 A intervalos definidos (3, 6, 20 y 24 horas i) se realizó una lectura espectrofotométrica a 600 nm. Los resultados se proporcionaron como curvas de crecimiento (microorganismo solo) y curvas de inhibición (microorganismo y concentraciones tindalizadas). Cada experimento se realizó ocho veces y se repitió tres veces, los resultados se expresan como la media \pm SD.

Cepas bacterianas ensayadas:

- Staphylococcus aureus
- 45 - Candida albicans
- Escherichia coli

Los resultados se presentan en la Figura 3 adjunta.

Como se evidencia en la Figura 3, la adición de la cepa bacteriana con No. de Acceso DSM 28251 de la invención a los cultivos de *S aureus* ralentizan en una dosis dependiente la fase logarítmica de crecimiento.

- 50 Se encuentran resultados similares con *C. albicans*.

Estos datos experimentales apoyan un efecto inhibitor para la cepa bacteriana con No. de acceso DSM 28251 según la invención.

Ensayo comparativo con el medio de cultivo solo (es decir, sin la cepa 28251).

Ejemplo 3

5 **Ensayos con formulaciones que contienen la cepa DSM 28251 de la invención sobre el crecimiento de C. albicans**

Material y métodos

Formulaciones ensayadas

A) una fórmula base (libre de cepa DSM 28251)

10 B) una fórmula con 1% de cepa DSM 28251

C) una fórmula con 2,5% de cepa DSM 28251

D) una fórmula con 2,5% de cepa DSM 28251 (2x C40)

La fórmula base de la formulación contiene agua, triglicérido caprílico/cáprico, glicerina, mantequilla butyrospermum parkii.

15 **Procedimiento**

Cada formulación se incluyó en el medio agar (20%) en placas de 4 sectores. Los 4 sectores se usaron para sembrar diferentes diluciones fúngicas (10⁻⁵ 10⁻⁸ CFU/ml), las mismas diluciones se sembraron en medio sin formulaciones, como un control. Después de la inoculación, las placas con la formulación se incubaron a 37°C durante 48 horas. El crecimiento fúngico en los medios con formulaciones se chequeó frente al control. Además, se registró el pH del medio solo y de las fórmulas/medio, para verificar una posible interferencia con la transición del estado de virulencia al de no virulencia de C. albicans.

Resultados

En el control, se observó una formación evidente de numerosas colonias con la morfología típica blanca y turbia (2x10⁹ CFU/ml).

25 A partir de los descubrimientos microscópicos, observamos las morfologías celulares características del microorganismo patógeno con la producción de hifas fúngicas.

Para todas las formulaciones ensayadas, observamos la formación de una pátina opaca con la formación fallida de hifas, dos características que están asociadas con la transición del patógeno del estado de virulencia al de no virulencia.

30 Además, el pH del medio de cultivo solo (S) es similar al pH de los medios de las fórmulas; por lo tanto, el cambio de pH no parece estar implicado en el cambio fenotípico.

Conclusiones

35 En C. albicans se observó una variación en la morfología de las colonias: en ausencia de las formulaciones, se observaron las colonias típicas de aspecto lechoso, mientras que en presencia de las formulaciones se obtuvo una pátina homogénea y translúcida. Esta variación también se confirmó a nivel microscópico, sin las formulaciones el microorganismo se observó tanto como levadura como moho (presencia de hifas), mientras que en presencia de las fórmulas sólo como levadura.

Esta observación es una evidencia de la actividad inhibitora sobre el crecimiento de Candida albicans de las formulaciones que contienen la cepa seleccionada de la invención.

40 **Ejemplo 4**

Acción inhibitora de una formulación que contiene la cepa DSM 28251 (LimpiAD) contra toxinas/catabolitos producidos por S. aureus: ensayo in vivo de Galleria mellonella y ensayo de expresión de genes

Introducción

45 Se probó la acción potencial de la fórmula y del principio activo como agentes capaces de reducir los efectos de las toxinas de S. aureus sobre un objetivo biológico específico. S. aureus es uno de los microorganismos más conocidos en la etiología y desarrollo de dermatitis atópica. Uno de sus principales mecanismos de patogénesis es la producción

de una amplia gama de toxinas.

La fórmula de LimpiAD ensayada contiene agua, triglicérido caprílico/cáprico, glicerina, mantequilla de butyrospermum parkii.

5 Para este fin, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando *Larvas de Galleria mellonella*. La polilla más grande de la cera *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) es un organismo modelo que ya está validado para experimentos de infección bacteriana y para ensayos de toxicidad farmacológica. Representa una herramienta esencial para la selección preliminar de nuevos compuestos y una evaluación rápida y fiable de la actividad inhibidora potencial y, por lo tanto, debe reducir el número de experimentos necesarios usando modelos de mamíferos [6].

10 Las larvas de *G. mellonella* dan múltiples opciones para la fácil administración del patógeno, tal como aplicación tópica, administración oral e inyección. El microorganismo puede inyectarse directamente en el hemocele larval y por lo tanto, las larvas reciben una cantidad conocida de patógenos.

15 Otra ventaja del modelo de *G. mellonella* es la posibilidad de evaluar la expresión de genes relacionados con la inmunidad y el estrés. De este modo, para investigar la acción del dispositivo sobre las larvas de *G. mellonella* inoculadas con el sobrenadante de *S aureus*, hemos realizado un ensayo de qPCR para evaluar el efecto de LimpiAD sobre los genes de inmunidad y estrés de *G. mellonella*. Hemos seleccionado genes que juegan un papel crucial en las respuestas inmunitaria de insectos a la infección: fagocitosis, regulación de citoquinas, adhesión celular e inhibidor de metaloproteinasas.

Material y métodos

Cepas microbianas ensayadas y condiciones de cultivo

20 *Staphylococcus aureus* ATCC BAA1680 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se cultivaron en caldo de infusión cerebro-corazón y se incubaron en condiciones térmicas a 37°C durante la noche.

Preparación de los sobrenadantes: los cultivos de una noche de ambas cepas de *Staphylococcus* se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Las células bacterianas residuales se separaron mediante esterilización por filtro (0,22 µm) y se diluyeron en disolución salina en una relación (1:2).

25 Los sobrenadantes diluidos se mezclaron (1:5 p/v) con tres formulaciones diferentes (Tabla 1):

- LimpiAD A (fórmula de base, sin componente activo);
- LimpiAD D (con 2,5% de componente activo);
- el componente activo solo.

30 Después de 1 h y 4 h de incubación de las formulaciones, los sobrenadantes se recuperaron mediante centrifugación y se usaron para inocular *larvas de Galleria mellonella*. Las *larvas* tratadas inyectadas con sobrenadantes (sin formulación) y medio de cultivo solo (caldo de infusión cerebro-corazón) en una proporción 1:2 se usaron como controles (Figura 25).

35 Para evaluar la supervivencia de las larvas de infección *por larvas de G. mellonella*: las larvas se seleccionaron en función del peso y tamaño y se dividieron en los grupos experimentales enumerados en la Tabla 1. Las larvas se inocularon mediante inyección utilizando un dispensador repetitivo equipado con una jeringa de insulina (BD, Wellington) y una aguja ultrafina de 1 mL a través del último prolego de la larva. Después de la inoculación, las larvas para cada condición se incubaron en placas Petri a 35°C y se observó la supervivencia en las siguientes 96 horas.

Tabla N. 1 Sustancias ensayadas y número de larvas de *G. mellonella* inyectadas para cada grupo.

Sustancias ensayadas	Nº de larvas
Sobrenadante ATCC BAA1680/29213 + LimpiAD D (1h)	20
Sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpiAD A (4h)	20
Sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpiAD D (1h)	20
Sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpiAD D (4h)	20
Sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 + componente activo (1h)	20
Sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 + componente activo (4h)	20
Control positivo sobrenadante ATCC BAA1680/ATCC 29213 1:2	20
Control negativo (BHI) 1:2	20
Disolución salina	20

Ensayo de expresión génica: qPCR

5 Tres larvas de supervivencia para cada grupo (Control, disolución salina; Infectadas, sobrenadante ATCC BAA1680; Tratadas con sobrenadante ATCC BAA1680 de *S aureus*) se recuperaron a las 96 h después del tratamiento. El RNA se extrajo reactivo TRI (Sigma Aldrich) siguiendo el protocolo del fabricante. Los extractos de RNA se cuantificaron espectrofotométricamente, después se transcribieron de forma inversa a cDNA utilizando una mezcla de síntesis de cDNA ReadyScript™ (Sigma Aldrich)

10 Las funciones de nombre de los cebadores y las secuencias usadas en la expresión génica se enumeran en la Tabla 2. Las veces de expresión génica en relación con un gen de referencia EF1, se determinaron en las muestras normalizadas por Rotor-Gene Q - QIAGEN, con PowerSYBR®(AppliedBiosystems). Las condiciones de ciclación fueron de 95°C 5 min, después 42 ciclos de: 95°C 5 s, fortalecimiento 10 s, 72°C 20 s. Un contacto inicial de 1°C por ciclo de 65°C durante los primeros 5 ciclos, dio como resultado una amplificación óptima para todos los loci. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para tres mediciones diferentes [7].

Tabla 2. Cebadores usados para analizar la expresión génica en larvas de *Galleria mellonella*

Cebador	Proceso	Función	Cebador directo	Cebador inverso
EF1	Factor de elongación 1 - alfa	De mantenimiento	AACCTCCTTACAGTGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCC AG
Impi	Metaloproteínasa	Gen diana	TAGTAAGCAGTAGCATAGTCC	GCCATCTTCACAGTAG CA
Glut	Respuesta al estrés oxidativo,	Gen diana	CCACACTGTGAGGCAACATT	GTTTGCTTAGCACGGT CACA
CytK	Regulación de citoquinas	Gen diana	CGAGCTAAAGACAGGCGATT	TCACCTGCGTTGAAT CATA
Phag	Fagocitosis	Gen diana	ATTGCTAGCCAGGTTTCAGGA	AGCTATTTGGCGGAAA CTCA

15

La preparación del sobrenadante y la *S. aureus* usada en el ensayo se muestran en la Figura 5.

Supervivencia de las larvas

En comparación con los grupos de control, los sobrenadantes que habían sido pre-incubados durante una hora con las fórmulas de ensayo fueron mucho menos letales.

Por lo tanto, el aumento de la supervivencia de las larvas de *S. aureus* ATCC BAA1680 ha atribuido la acción de los componentes activos.

De manera similar, después de 4 h de incubación, la actividad de la fórmula base A se confirmó a un nivel menor, mientras que la fórmula D confirmó la mayor supervivencia de las larvas.

5 Con respecto a la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, también se confirmó la menor actividad para la fórmula base A con respecto a las otras fórmulas probadas. En este caso, los componentes activos produjeron el mayor aumento de la supervivencia de las larvas con respecto a la fórmula D tanto en pretratamientos de 1 h como de 4 h.

10 En conjunto, estos resultados sugirieron que los componentes activos podrían interferir con la patogénesis asociada a las toxinas/catabolitos producidos por *S. aureus* ATCC BAA1680. Además, la acción se pudo apreciar ya después de 1 h de incubación tanto para las cepas como para la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, la intensidad de interferencia resultó mayor a medida que se prolongaba más la interacción putativa con las toxinas/catabolitos en los sobrenadantes (Fig. 27-28).

15 Por el contrario, el gen 18-wheeler se hipo-expresó (99,98 %) en el grupo infectado en comparación con el grupo tratado. La preincubación con LimpiAD, por lo tanto, aumentó de manera significativa la expresión de este gen implicado en la adhesión y migración celular.

Ensayo de expresión de genes

20 La expresión de los dos genes relacionados con el estrés metabólico IMPI y GLUT no se alteró de manera significativa en comparación con el control en ambos grupos, como se evidencia en la Figura 7. Por lo tanto, LimpiAD no altera la expresión de estos genes. La expresión de los dos genes relacionados con la inmunidad innata se expresó de manera diferente en el grupo infectado que en el grupo tratado. El gen CITOK que regula las citocinas inflamatorias (cascada de NF-kappa B) se sobre-expresaron (93,8%) en el grupo infectado en comparación con el grupo tratado. Por lo tanto, LimpiAD redujo la expresión de citocinas proinflamatorias.

Tabla 3. Expresión génica de *G. mellonella* después del tratamiento con LimpiAD/infectado

GEN	% de expresión tratado/infectado	Expresión
IMPI	6,56%	Hipo-expresado
GLUT	6,56%	Sobreexpresado
CITOK	93,08%	Hipo-expresado
18 - wheeler	99,08	Hipo-expresado

25 **Conclusión**

Las infecciones por cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* se consideran como un factor perjudicial en la dermatitis atópica, ya que estos microorganismos, que producen catabolitos, estimulan la emisión de citocinas inflamatorias y contribuyen al daño de la barrera epidérmica y la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad.

30 Los resultados obtenidos sugieren que los componentes de LimpiAD reducen el efecto de los catabolitos producidos por *S. aureus* en la supervivencia de larvas de *G. mellonella* inyectadas.

35 Además, el tratamiento con LimpiAD redujo la expresión de citocinas pro-inflamatorias y aumentó la expresión del gen de 18-wheeler implicado en la adhesión y migración celular. Los datos obtenidos de la expresión de genes de estrés metabólico e inmunidad proporcionan una evidencia adicional sobre el mecanismo de acción del dispositivo de LimpiAD.

Ejemplo 5

Ensayo comparativo *in vitro*

Un ensayo comparativo con *C. acnes* DSM 28251 tinalizada frente a otras cepas de cutibacterium sobre el crecimiento del microorganismo patógeno de la piel.

40

Objetivo del ensayo

5 La actividad inhibitoria de bacterias inactivadas térmicamente de la cepa de *C. acnes* DSM 28251 sobre bacterias colonizantes de la piel se comparó con la actividad de cuatro cepas diferentes de la misma especie (cepas de *Cutibacterium* con la misma composición de peptidoglicanos) y una cepa de *C. granulosum* que está muy próxima desde el punto de vista evolutivo (proximidad filogenética).

El objetivo de este estudio fue evaluar si la cepa de *C. acnes* DSM 28251 tiene propiedades peculiares o mejoradas en comparación con otras especies con proximidad filogenética.

Para este fin, cuatro cepas de *Cutibacterium* spp. (tres *Cutibacterium acnes* y una *Cutibacterium granulosum*) que difieren de la cepa DSM 28251, ya sea por filotipo o distancia filogenética, se han elegido y ensayado (cepa ensayada).

10 En el estudio también se han incluido dos cepas de *C. acnes* (DSM 30738 y 30753) cuyas características no son conocidas, aunque pertenecen a la misma especie que la cepa DSM 28251 de esta invención.

CEPAS ENSAYADAS (género *Cutibacterium*)

<i>Cutibacterium</i> spp.	Composición del peptidoglicano (tipo de filotipo de mureina)	Distancia filogenética de <i>C. acnes</i> DSM 28251 (% de homología de 16S rDNA)
<i>C. acnes</i> DSM 28251	A3y LL-Dpm-Gly I	
1. <i>C. acnes</i> ATCC 11828	A3y LL-Dpm-Gly II	99,9%
2. <i>C. granulosum</i> DSM 20458 ATCC 11829	A3y LL-Dpm-Gly NA*	94,0%
3. <i>C. acnes</i> DSM 1897	A3y LL-Dpm-Gly I	99,9%
4. <i>C. acnes</i> DSM 16379	A3y LL-Dpm-Gly I	99,9%
5. <i>C. acnes</i> DSM 30738	NAv*	NAv*
6. <i>C. acnes</i> DSM 30753	NAv*	NAv*

NA*: no asignado. La clasificación de filotipos está solo disponible para las cepas de *C. acnes*.

NAv*: no disponible.

Microorganismos patógenos de la piel

15 La actividad inhibitoria de las seis cepas de *Cutibacterium* anteriores se ha ensayado contra los cinco microorganismos siguientes que son patógenos de la piel bien conocidos y ampliamente representados:

- *S. aureus* ATCC 29213
- *S. aureus* ATCC BAA-1680
- *S. aureus* DSM 20491
- *S. epidermidis* ATCC 12228

20 - *Candida albicans* ATCC 90028

MATERIAL Y MÉTODOS**Preparación de las bacterias inactivadas térmicamente (*Cutibacterium*)**

Las *Cutibacterium* ensayadas se destruyeron por tinalización (esterilización fraccionada).

25 Todas las cepas de *Cutibacterium* se cultivaron en caldo BHI (infusión de cerebro-corazón) con un 20 % de suplementación a una temperatura de 37°C hasta que se verificó la fase exponencial máxima de crecimiento mediante lectura espectrofotométrica (O.D. 600 nm). Posteriormente, el medio se retiró mediante centrifugación y se procesó para el ensayo del sobrenadante. El sedimento bacteriano se lavó en disolución salina (NaCl al 0,9 %) hasta la

eliminación completa de cualquier sobrenadante residual y después se diluyó a una concentración de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml).

El inóculo titulado se sometió a tindalización.

5 El proceso de tindalización implicó calentar a 80°C durante 30 minutos para inactivar las formas vegetativas, seguido de un período de incubación a 37°C durante 24 horas para promover la germinación de las células vegetativas restantes no inactivadas por el tratamiento térmico, después el material se llevó de nuevo a 80°C durante 30 minutos. El ciclo térmico entero se repitió 3 veces. Se sembró una alícuota del material tindalizado en agar Columbia Blood y se incubó a 37°C en aerobiosis durante 24 horas para verificar la ausencia de crecimiento microbiano y la correcta implementación del proceso. Las células bacterianas tindalizadas tienen una replicación y capacidad enzimática inactivada mientras mantienen su estructura y pared celular, por lo tanto fisiológicamente intactas y, por esta razón, inmunológicamente activas.

Evaluación de la actividad de cepas inactivadas sobre el crecimiento de microorganismos patógenos

La capacidad de las cepas de *C. acnes* inactivadas térmicamente para interferir y/o inhibir con/sobre el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* y una cepa de *C. albicans* ensayadas se evaluó usando un método espectrofotométrico.

15 Las cepas inactivadas térmicamente se ensayaron usando el mismo medio de crecimiento (caldo BHI, suplementado con 20% de concentración) a través del siguiente procedimiento:

Las *bacterias inactivadas térmicamente* se diluyeron previamente hasta la concentración final de 10^5 CFU/ml y después se inocularon con los microorganismos patógenos de la piel como sigue.

20 Por triplicado, 100 μ l de cultivos activos de cepas ensayadas de *S. aureus* ATCC@BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC® 29213™, *S. epidermidis* ATCC@ 12228™ y *C. albicans* ATCC® 90028™ se inocularon en los pocillos de cada fragmento. Cada cepa bacteriana se cultivó previamente en medio BHI a 37°C hasta la etapa de crecimiento exponencial y las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en medio BHI fresco para obtener suspensiones con una concentración de 1×10^5 CFU/ml.

Estas suspensiones se usaron como inóculos en los pocillos de la placa de 96 pocillos.

25 Las placas de 96 pocillos se prepararon por triplicado, cada una con controles experimentales, es decir, inóculo de las cepas solas sin ningún fragmento añadido, y los "blancos" del experimento (medio BHI con cada fragmento) para la calibración espectrofotométrica.

30 La densidad óptica a 600 nm (O.D. 600 nm) se midió usando el sistema VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) y se consideró como el valor de crecimiento en el tiempo cero (T0) para cada cepa y tratamiento. Las mediciones posteriores se realizaron después de 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 y 24 horas durante el período de incubación. Los valores de O.D. se normalizaron frente a blancos y controles y después se analizaron para evaluar la tendencia de crecimiento de los diferentes gérmenes con/sin (CTR) los fragmentos de pared. Los resultados se expresaron como valor medio \pm S.D. (Desviación Estándar), y las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal utilizando una función sigmoideal adecuada para el crecimiento bacteriano. Los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism versión 7.0a.

RESULTADOS

40 Las curvas de crecimiento del microorganismo patógeno de la piel en presencia y ausencia (control) de las bacterias inactivadas térmicamente de las *cepas de Cutibacterium* se muestran en la Figura 9. Una primera evaluación cualitativa de AUC muestra que *C. acnes* DSM 28251 inactivada térmicamente tiene un efecto inhibidor mejorado sobre el crecimiento microbiano para todos los microorganismos patógenos de la piel ensayados.

La siguiente Tabla 2a presenta una evaluación cuantitativa del AUC para cada derivado contra todos los microorganismos ensayados. Estos valores confirman lo que se muestra en la Figura 9 en donde las bacterias inactivadas térmicamente obtenidas a partir de *C. acnes* DSM 28251 muestran una notable influencia/actividad inhibidora sobre el crecimiento de todos los microorganismos de la piel ensayados.

45

ES 2 983 028 T3

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

Tabla 2a. Los valores del área bajo la curva (AUC) y los errores estándar relativos (azul claro) de las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 2 con/sin bacterias inactivadas térmicamente (control). La escala de color para cada cepa indica el intervalo de valores de AUC: desde el valor de AUC menor (rojo oscuro) hasta el mayor (verde oscuro).

5

El porcentaje de reducción en el crecimiento comparado con las condiciones de control se muestra en la siguiente Tabla 2b. Estos datos confirman los resultados discutidos anteriormente, destacando la actividad mejorada de la *C. acnes* DSM 28251 inactivada térmicamente frente a las cepas comunes de *C. acnes*.

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
<i>S. aureus</i>	23,344	2,379	6,495	14,727	16,270	9,260	5,338
ATCC29213							
<i>S. aureus</i>	20,386	2,572	3,473	13,891	18,264	13,826	6,495

<u>ATCC BAA-1680</u>							
<i>S. aureus</i>	19,135	0,439	4,148	10,415	15,719	4,148	2,560
<u>DSM 20491</u>							
<i>S. epidermidis</i>	15,834	7,094	5,392	11,578	13,734	9,875	11,464
<u>ATCC 1228</u>							
<i>C. albicans</i>	31,207	18,979	16,746	20,946	19,617	20,362	26,582
<u>ATCC 90028</u>							

Tabla 2b. Porcentaje de crecimiento decreciente con respecto a la condición de control (sin inóculos de bacterias inactivadas térmicamente). La escala de color para cada cepa indica el intervalo de disminución: de disminución del crecimiento (%) mayor (rojo oscuro) a menor (verde oscuro).

5 **Ejemplo 6**

Se repitió el ensayo comparativo del Ejemplo 5 usando postbióticos/sobrenadantes de todas las cepas de *C. acnes* (en lugar de cepas inactivadas térmicamente del Ejemplo 5).

Objetivo del ensayo

10 Se comparó la actividad inhibidora de postbióticos/sobrenadantes obtenidos de las mismas seis cepas de *Cutibacterium* del ejemplo 5 sobre los mismos microorganismos patógenos de la piel del ejemplo 5.

El objetivo de este estudio fue evaluar si un postbiótico de una cepa de *C. acnes* DSM 28251 tiene una actividad inhibidora mejorada sobre microorganismos patógenos de la piel en comparación con postbióticos de la especie *C. acnes* del Ejemplo 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

15 Preparación del postbiótico de *C. acnes* DSM 28251.

Los sobrenadantes bacterianos obtenidos previamente a partir de cepas de *Cutibacterium* se sometieron a filtración (filtros de 0,22 µm) para eliminar cualquier residuo celular; la esterilidad se confirmó por la ausencia de crecimiento bacteriano después de la inoculación en agar Columbia Blood e incubación a 37°C en aerobiosis durante 24 horas de una alícuota de cada sobrenadante en investigación.

20 Con el fin de excluir cualquier interferencia debida a la producción de sustancias ácidas típicas de algunas cepas de *Cutibacterium* spp., el pH de cada sobrenadante se midió cuidadosamente y, si fuera necesario, se neutralizó con una disolución de hidróxido de sodio 1M.

Evaluación espectrofotométrica de la actividad de los postbióticos sobre el crecimiento de microorganismos patógenos.

25 La capacidad del postbiótico procedente de cepas de *C. acnes* referido en el Ejemplo 5 para interferir y/o inhibir con/sobre el crecimiento de las mismas cepas de *Staphylococcus* y una cepa de *C. albicans* descrita en el Ejemplo 5 se evaluó usando un método espectrofotométrico.

Los postbióticos se ensayaron usando el mismo medio de crecimiento del Ejemplo 5 (caldo BHI, suplementado con 20% en concentración) a través del siguiente procedimiento:

30 Los sobrenadantes se diluyeron en una proporción 1:10 en caldo BHI y después se incubaron con microorganismos de la piel ensayados.

35 Por triplicado, 100 µl de cultivos activos de microorganismos patógenos de la piel de *S. aureus* ATCC®BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC® 29213™, *S. epidermidis* ATCC® 12228™ y *C. albicans* ATCC® 90028™ se inocularon en los pocillos. Cada cepa bacteriana se cultivó previamente en medio BHI a 37°C hasta la etapa de crecimiento exponencial y las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en medio BHI reciente para obtener suspensiones con una concentración de 1x10⁵ CFU/ml.

Estas suspensiones se usaron como inóculos en los pocillos de una placa de 96 pocillos.

Las placas de 96 pocillos se prepararon por triplicado, cada una con controles experimentales, es decir, inóculo de cepas solas, y los "blancos" del experimento (medio BHI con cada fragmento) para la calibración espectrofotométrica.

La densidad óptica a 600 nm (O.D. 600 nm) se midió usando el sistema VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) y se consideró como el valor de crecimiento en el tiempo cero (T0) para cada cepa y tratamiento. Las mediciones posteriores se realizaron después de 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 y 24 horas durante el período de incubación. Los valores de O.D. se normalizaron frente a blancos y controles y después se analizaron para evaluar la tendencia de crecimiento de los diferentes gérmenes con/sin (CTR) los fragmentos de pared. Los resultados se expresaron como valor medio \pm S.D. (Desviación Estándar), y las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal utilizando una función sigmoideal adecuada para el crecimiento bacteriano. Los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism versión 7.0a.

RESULTADOS

Las curvas de crecimiento del microorganismo patógeno de la piel en presencia y ausencia (control) del postbiótico de la cepa de *C. acnes* DSM 28251 se muestran en la Figura 8.

Una primera evaluación cualitativa del AUC (Área Bajo la Curva) muestra que el probiótico (sobrenadante) obtenido de la cepa de *C. acnes* DSM 28251 tiene la mayor acción inhibitoria sobre el crecimiento microbiano para la mayoría de los microorganismos patógenos ensayados.

La Tabla 1a muestra la evaluación cuantitativa de la AUC para cada sobrenadante. Estos valores confirman lo que se demuestra en la Figura 1. De hecho, el postbiótico/sobrenadante de *C. acnes* DSM 28251 inhibe el crecimiento de todas las bacterias de la piel ensayadas más que los otros sobrenadantes ensayados con la única excepción de *C. albicans* ATCC 90028 (que es inhibido por el derivado de DSM 30738).

Tabla 1a

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

Tabla 1a. Los valores del área bajo la curva (AUC) y los errores estándar relativos (azul claro) de las curvas de crecimiento mostrados en la Figura 1 con/sin sobrenadante bacteriano (control). La escala de color para cada cepa indica el intervalo de valores de AUC: desde el valor de AUC menor (rojo oscuro) hasta el mayor (verde oscuro).

5 El porcentaje de reducción del crecimiento *contra* las condiciones de control obtenidas por los sobrenadantes ensayados se muestran en la Tabla 1b. Estos datos también confirman los resultados discutidos hasta ahora, destacando adicionalmente que la actividad del sobrenadante de DSM 30738 sobre la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 es sólo ligeramente superior y por lo tanto comparable a la del sobrenadante de *C. acnes* DSM 28251.

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

10 Tabla 1b. Porcentaje de crecimiento decreciente con respecto a la condición de control (sin inóculos de sobrenadante). La escala de color para cada cepa indica el intervalo de disminución: de disminución del crecimiento (%) mayor (rojo oscuro) a menor (verde oscuro).

RESULTADOS

15 Una primera evaluación cualitativa de la AUC muestra que el postbiótico/sobrenadante de *C. acnes* DSM 28251 tiene un efecto inhibitor mejorado sobre el crecimiento microbiano para todos los microorganismos patógenos ensayados de la piel.

Ejemplo 7

Se repitió el ensayo comparativo del Ejemplo 5 usando fragmentos de pared celular de todas las cepas de *C. acnes* ensayadas (en lugar de las cepas inactivadas térmicamente del Ejemplo 5).

20 Objetivo del ensayo

El objetivo de este ensayo fue comparar la actividad inhibitora de fragmentos de pared de las mismas seis cepas de *Cutibacterium* del Ejemplo 5 sobre los mismos microorganismos patógenos de la piel del Ejemplo 5.

25 El objetivo de este estudio fue evaluar si un fragmento de pared de la cepa de *C. acnes* DSM 28251 tiene una actividad inhibitora mejorada sobre microorganismos patógenos de la piel en comparación con el fragmento de la pared bacteriana de la especie comparativa de *C. acnes* del Ejemplo 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los fragmentos de pared de cepas de *C. acnes* DSM 28251 y *C. acnes* comparativa.

La cepa de *C. acnes* DSM 28251 y cepas de *Cutibacterium* ATCC@ 11829, DSM 16379, DSM 30738, DSM 30753 y DSM 1897, se cultivaron a 37°C en medio BHI suplementado con 20% en concentración.

30 El cultivo se operó en sistemas discontinuos y de escalado de volúmenes de 5 a 1000 ml y se prolongó hasta la obtención de una masa celular consistente (es decir 2 días en el volumen más alto de inóculo). Los sedimentos bacterianos obtenidos se recogieron después y se sometieron al procedimiento estandarizado para obtener el fragmento de pared de interés, como se describe a continuación. En lo sucesivo, los fragmentos aislados se denominarán con el código de catálogo de las cepas de derivación.

35 Específicamente, el aislamiento de fragmentos de pared se ha realizado como se describe a continuación.

5 El sedimento bacteriano se sometió previamente al procedimiento de deslipidación mediante tratamiento con Soxhlet usando un disolvente orgánico (por ejemplo, éter-etanol, cloroformo, metanol-cloroformo, mezclas de los mismos) disolventes posteriormente; después se secaron bajo una campana de flujo laminar. Después del secado, el sedimento se homogeneizó mediante 2 etapas de tratamiento con Ultraturrax (de 20 segundos a 10 min cada una), añadiendo agua destilada (en la proporción de 1:2 p/V). Después de la centrifugación, el sobrenadante se calentó a 80°C y después se enfrió en agua fría, preferiblemente de 3 a 15°C, y finalmente en hielo. Posteriormente, la etapa de precipitación de fragmentos se realizó incubando con sulfato de amonio frío al 15-40 % v/v durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación, la suspensión se centrifugó y el fragmento precipitado se recogió y se liofilizó.

10 Las muestras liofilizadas fueron finalmente esterilizadas a través del procedimiento de múltiples etapas *ad-hoc* (ultracongelación a -80°C, sobrecalentamiento a 80°C, esterilización U.V. de 1 hora). Finalmente, se usaron para configurar el experimento, como se describe a continuación.

Evaluación espectrofotométrica de la actividad de los postbióticos sobre el crecimiento de microorganismos patógenos.

15 La actividad de los fragmentos de pared procedentes de las cepas de *C. acnes* (véase anteriormente) para interferir y/o inhibir con/sobre el crecimiento de las mismas cepas de *Staphylococcus* y una cepa de *C. albicans* descritas en el Ejemplo 5 se evaluó usando un método espectrofotométrico.

Los fragmentos de pared se ensayaron usando el mismo medio de crecimiento del Ejemplo 5 (caldo BHI, suplementado con 20% en concentración) a través del siguiente procedimiento:

20 Los fragmentos de pared se pulverizaron y emulsionaron en medio de crecimiento BHI a la concentración final de 10 mg/ml. Se añadieron alícuotas de 100 µl a los pocillos de placas de fondo plano de 96 pocillos.

25 Por triplicado, 100 µl de cultivos activos de microorganismos patógenos de la piel de *S. aureus* ATCC@BAA-1680™, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC@ 29213™, *S. epidermidis* ATCC@ 12228™ y *C. albicans* ATCC@ 90028™ se inocularon en los pocillos de cada fragmento. Cada cepa bacteriana se cultivó previamente en medio BHI a 37°C hasta la etapa de crecimiento exponencial y las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en medio BHI fresco para obtener suspensiones con una concentración de 1x10⁵ CFU/ml.

Estas suspensiones se usaron como inóculos en los pocillos de una placa de 96 pocillos.

30 Las placas de 96 pocillos se prepararon por triplicado, cada una con controles experimentales, es decir, inóculo de cepas solas sin ningún fragmento añadido, y los "blancos" del experimento (medio BHI con cada fragmento) para la calibración espectrofotométrica.

35 La densidad óptica a 600 nm (O.D. 600 nm) se midió usando el sistema VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) y se consideró como el valor de crecimiento en el tiempo cero (T₀) para cada cepa y tratamiento. Las mediciones posteriores se realizaron después de 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 y 24 horas durante el período de incubación. Los valores de O.D. se normalizaron frente a blancos y controles y después se analizaron para evaluar la tendencia de crecimiento de los diferentes gérmenes con/sin (CTR) los fragmentos de pared. Los resultados se expresaron como valor medio ± S.D. (Desviación Estándar), y las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal utilizando una función sigmoideal adecuada para el crecimiento bacteriano. Los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism versión 7.0a.

RESULTADOS (fragmentos de pared de *C. acnes*)

40 Las curvas de crecimiento de bacterias cutáneas cultivadas con y sin (CTR) los diversos fragmentos de pared ensayados se muestran en la Figura 10. Basándose en una evaluación cualitativa preliminar del parámetro "Área bajo la curva" (AUC), se destaca cómo para la mayoría de los gérmenes de la piel ensayados el fragmento de DSM 28251 produce la mayor acción inhibidora sobre el crecimiento microbiano.

45 En su lugar, en la siguiente Tabla 3a se reportan los resultados de una evaluación cuantitativa del mismo parámetro de AUC para todos los gérmenes de la piel ensayados. Los valores de AUC calculados confirman la hipótesis formulada a través de la evaluación cualitativa. El fragmento de pared celular bacteriana DSM 28251 demostró un efecto inhibitor más alto sobre el crecimiento bacteriano que los otros fragmentos ensayados.

50 Profundizando en la estimación de la inhibición del crecimiento, los valores mostrados en la Tabla 3b representan los porcentajes de reducción del crecimiento (%) con respecto a la condición de control de cada cepa que se considera como el 100 % de la velocidad de crecimiento en las condiciones experimentales específicas. La comparación de las reducciones del porcentaje de crecimiento fue consistente con la conclusión discutida anteriormente sobre el mayor efecto inhibitor del fragmento de la cepa DSM 28251.

Aunque el fragmento obtenido a partir de la cepa de *C. acnes* DSM 30738 muestra valores de inhibición cercanos comparados con el fragmento DSM 28251, el porcentaje de inhibición de este último siempre resulta mayor, también con un mejor rendimiento contra la cepa de *S. aureus* ATCC BAA-1680 (82,43% para DSM 30738 vs 94,95% para DSM 28251).

5 **Tabla 3a.** Los valores del área bajo la curva (AUC) y los errores estándar relativos (azul claro) de las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 3 con/sin (control) fragmentos de pared bacteriana. La escala de color para cada cepa indica el intervalo de los valores de AUC: desde el valor de AUC menor (rojo oscuro) hasta el mayor (verde oscuro).

		<i>DSM</i> <i>28251</i>	<i>ATCC</i> <i>11828</i>	<i>DSM</i> <i>20458</i>	<i>DSM</i> <i>1897</i>	<i>DSM</i> <i>16379</i>	<i>DSM</i> <i>30738</i>	<i>DSM</i> <i>30753</i>	<i>Control</i>
<i>S. aureus</i>	Área total	0,20	1,13	2,23	6,63	2,89	0,70	3,19	11,73
ATCC 29213	Error estándar	0,11	0,15	0,24	0,22	0,16	0,15	0,28	0,26
<i>S. aureus</i>	Área total	0,57	1,66	1,09	3,87	1,53	1,99	1,99	11,34
ATCC BAA-1680	Error estándar	0,31	0,088	0,11	0,32	0,16	0,20	0,082	0,31
<i>S. aureus</i>	Área total	0,36	1,47	1,35	5,40	2,14	0,39	2,72	11,26
DSM 20491	Error estándar	0,35	0,16	0,16	0,32	0,28	0,15	0,24	0,23
<i>S. epidermidis</i>	Área total	0,15	1,27	2,14	2,21	1,07	0,15	1,21	6,03
ATCC 1228	Error estándar	0,34	0,18	0,34	0,33	0,17	0,32	0,15	0,20
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Área total	0,03	1,27	1,15	0,48	1,20	0,03	0,90	7,35
	Error estándar	0,10	0,35	0,35	1,20	0,12	0,28	0,33	0,22

10 **Tabla 3b.** Porcentaje de crecimiento decreciente con respecto a la condición de control (sin inóculos de fragmentos). La escala de color para cada cepa indica el intervalo de disminución: de disminución (%) del crecimiento mayor (rojo oscuro) a menor (verde oscuro).

	<i>DSM</i> <i>28251</i>	<i>ATCC</i> <i>11828</i>	<i>DSM 20458</i> <i>ATCC</i> <i>11829</i>	<i>DSM</i> <i>1897</i>	<i>DSM</i> <i>16379</i>	<i>DSM</i> <i>30738</i>	<i>DSM</i> <i>30753</i>
<i>S. aureus</i>	98,29	90,38	80,99	43,44	75,32	94,02	72,83
ATCC 29213							

ES 2 983 028 T3

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

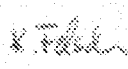
TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA EFECTOS DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES



FORMULARIO INTERNACIONAL

ALEENS PHARMA SRL
Via Donatori di Sangue 1
20034 Nova Sfilanese (SI)
Italy

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de conformidad con la regla 7.1 por la
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Identificado en la parte inferior de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: ULTIMO	Número de acceso dado por la INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY DSMZ 20201
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I, está acompañado por: <input type="checkbox"/> Una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> Una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz donde aplique)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta International Depositary Authority acepta el microorganismo identificado en I, anterior, que fue recibido el 2013-12-18 (Fecha del depósito Original)*.	
IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en I, anterior, fue recibido por esta autoridad depositaria internacional el 2013-12-18 (Fecha del depósito Original) Y la solicitud para convertir el depósito original a un depósito bajo el Budapest Treaty fue recibido el 2019-12-22 (Fecha de recibo de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: <small>La Oficina Internacional de Depósitos de Cultivos de Microorganismos (DSMZ) de la OIEA</small> Dirección: <small>Südkorngasse 11 1070 Wien, Austria</small>	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen poder para representar la International Depositary Authority o del oficial autorizado:  Fecha 2020-01-20

* Cuando se aplica la regla 5.A (d), dicha fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de la autoridad depositaria internacional.
Formulario DSMZ-BP/4 (página única) 07/2019

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana, que es *Cutibacterium acnes* depositada bajo el número de acceso de depósito No. DSM 28251 con International Deposit Authority Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
- 5 2. Un producto postbiótico que comprende células inactivadas térmicamente o el sobrenadante de células lisadas mecánicamente, o fragmentos de pared celular de la cepa bacteriana de la reivindicación 1.
3. El producto postbiótico de la reivindicación 2, en el que las células lisadas se obtienen mediante lisis mecánica de la pared celular.
4. Un fragmento de la pared celular de la cepa bacteriana de la reivindicación 1.
- 10 5. La cepa bacteriana de la reivindicación 1 caracterizada porque se inactiva, preferiblemente mediante tindalización.
6. La cepa bacteriana de la reivindicación 1 o el producto postbiótico de la reivindicación 2 o un fragmento de pared celular de la reivindicación 4 para su uso como un medicamento.
- 15 7. Una composición que comprende una cantidad eficaz de *Cutibacterium acnes* depositada bajo el número de acceso de depósito No. DSMZ 28251 según la reivindicación 1, o un producto postbiótico de la misma según la reivindicación 2 o un fragmento de la pared celular de la misma según la reivindicación 4 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
8. Una composición según la reivindicación 7, en la que la composición es una composición tópica preferiblemente en forma de crema, espuma, pomada, pasta, polvo, gel, solución, ovulo, irrigación o emulsión.
- 20 9. Una composición como se reivindica en la reivindicación 7, para su uso como un medicamento.
10. Una composición según la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o infección inflamatoria o alérgica.
11. Una composición según la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento tópico de una enfermedad inflamatoria o alérgica de la piel o mucosa.
- 25 12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11 en la prevención o tratamiento de una infección bacteriana o fúngica de la piel o mucosa.
13. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 12, en la que la enfermedad de la piel es eccema, dermatitis atópica, acné, dermatitis seborreica, rosácea, psoriasis, eritema, erupción cutánea.
- 30 14. Una composición para su uso según la reivindicación 12 para el tratamiento de una infección fúngica de la piel o mucosa, especialmente infección por *Cándida*.
15. Una composición según la reivindicación 7 u 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad ginecológica que es una infección, inflamación vaginal.
16. Una composición para su uso según la reivindicación 15, en la que la enfermedad ginecológica es vaginitis.
- 35 17. Una composición según la reivindicación 7 u 8 para uso proctológico en el tratamiento de hemorroides, fisuras anales o cicatrices de la piel.
18. Una composición según la reivindicación 7 u 8 para su uso en el tratamiento de heridas, lesiones, abrasión, ulceraciones de la piel o úlceras por presión o para curar heridas.
19. Un producto postbiótico que es el sobrenadante total obtenible mediante un proceso fermentativo de la cepa bacteriana de la reivindicación 1.

40

FIGURA 1

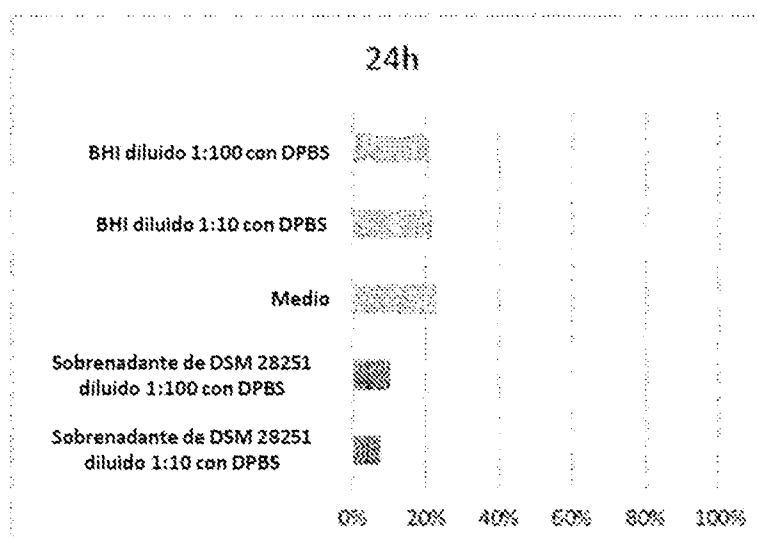
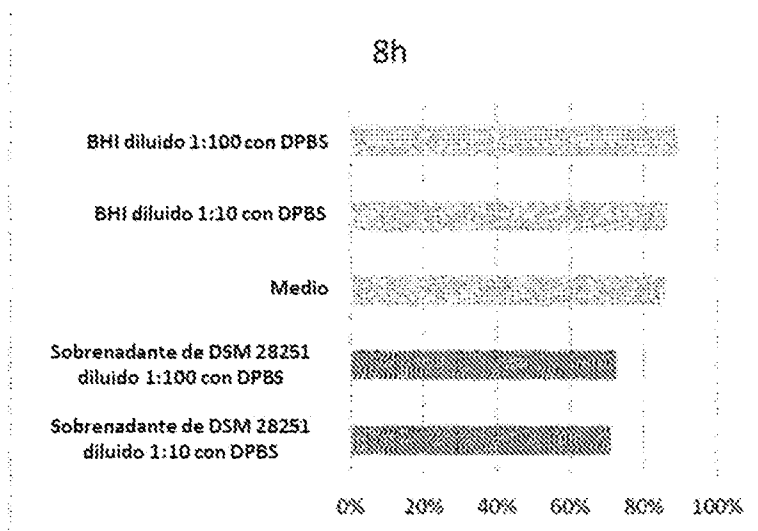
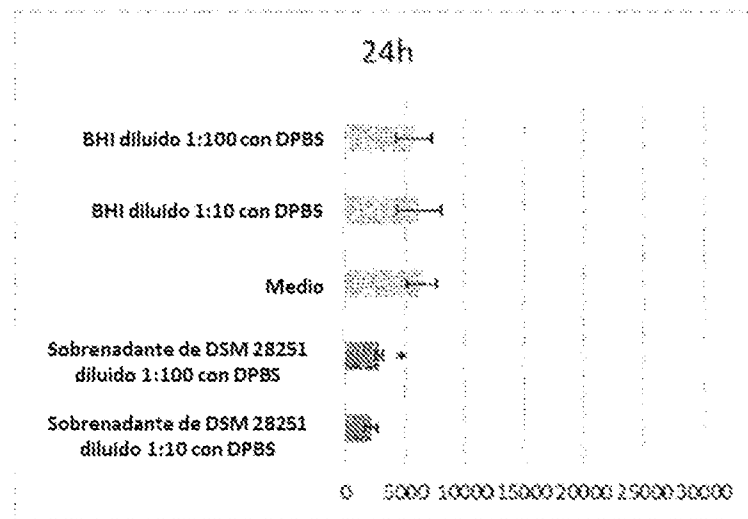
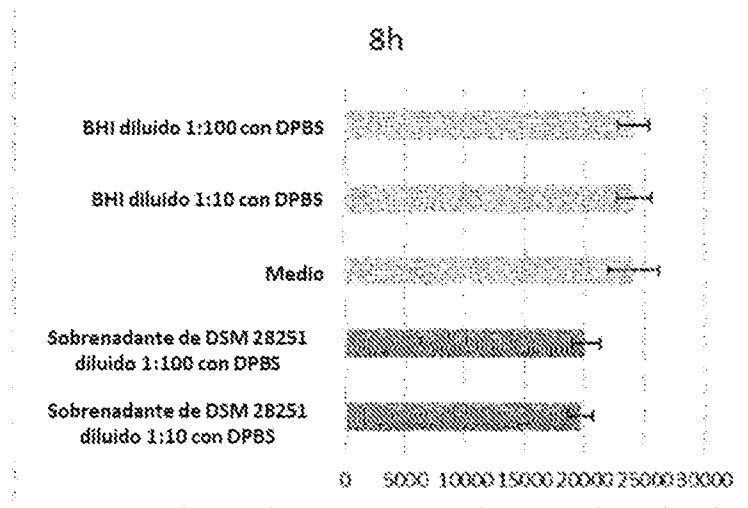


FIGURA 2



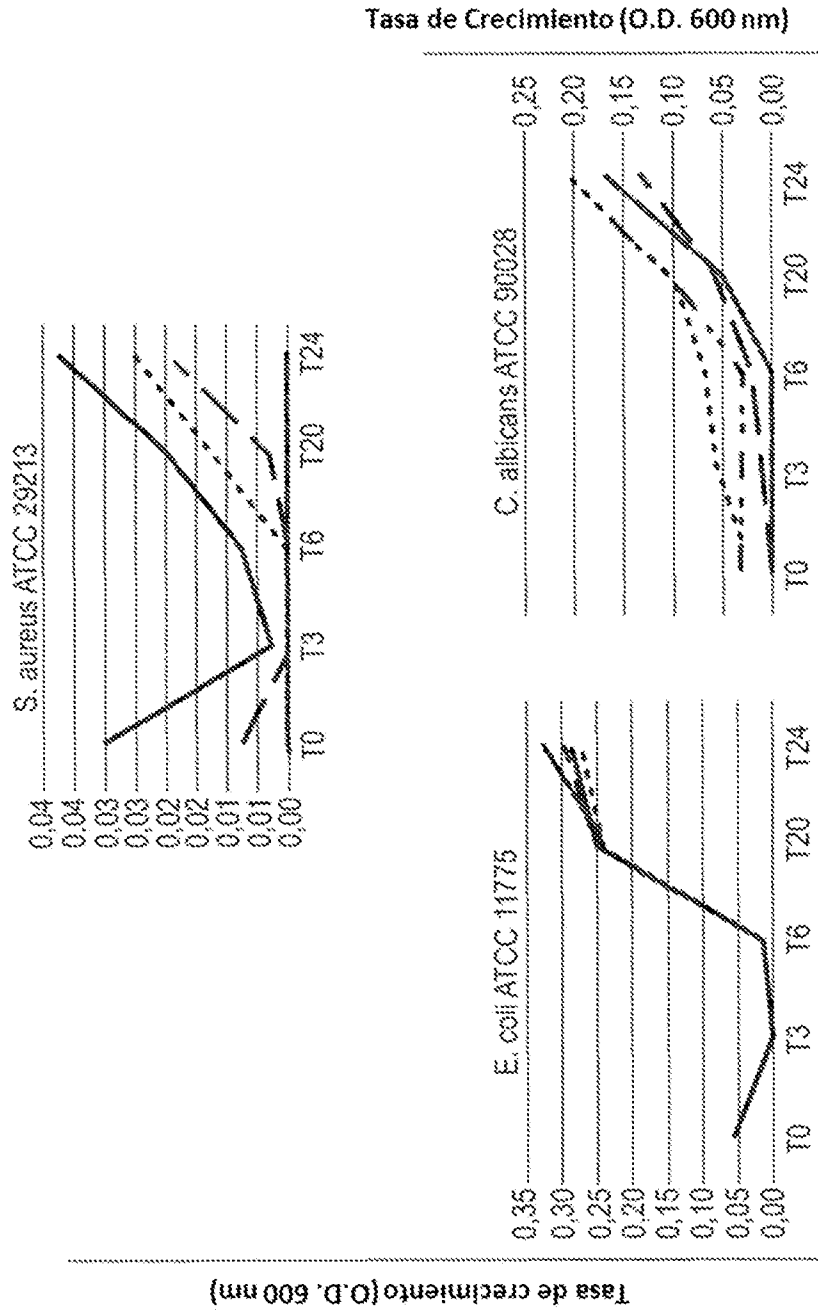
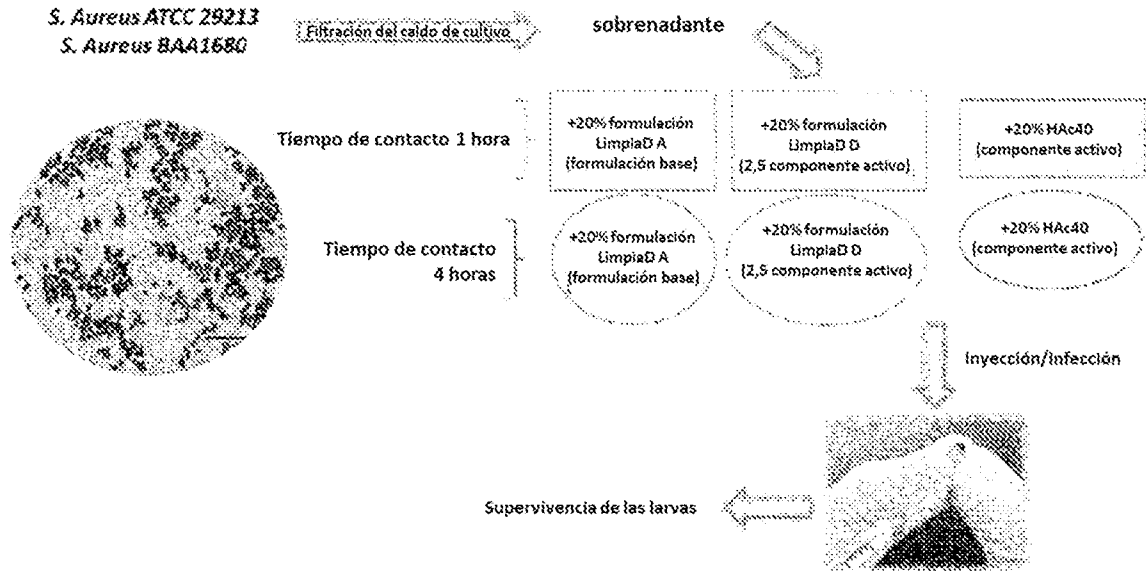
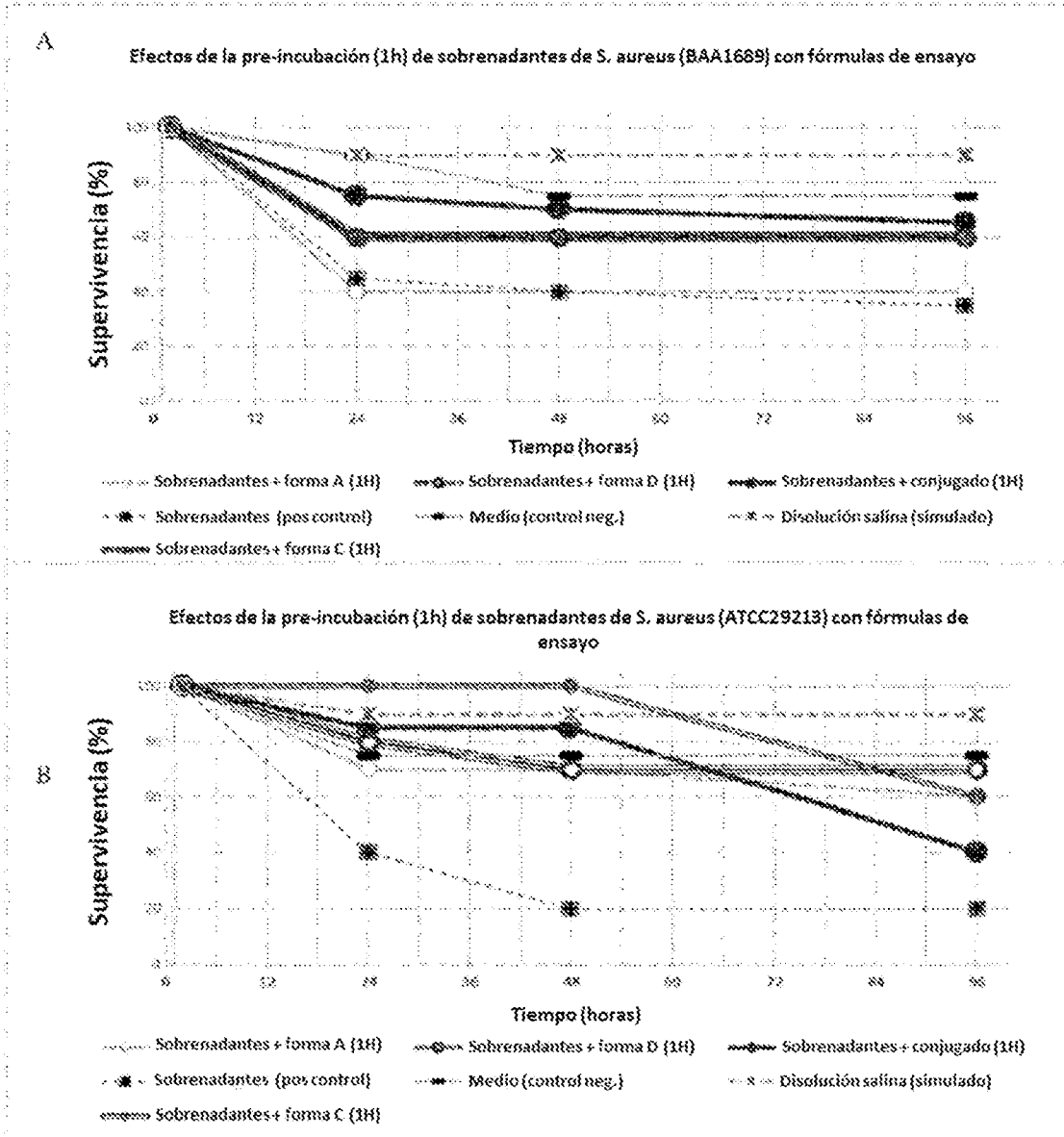


Fig. 3

FIG. 4



FIGURAS 5A Y 5B



FIGURAS 6A Y 6B

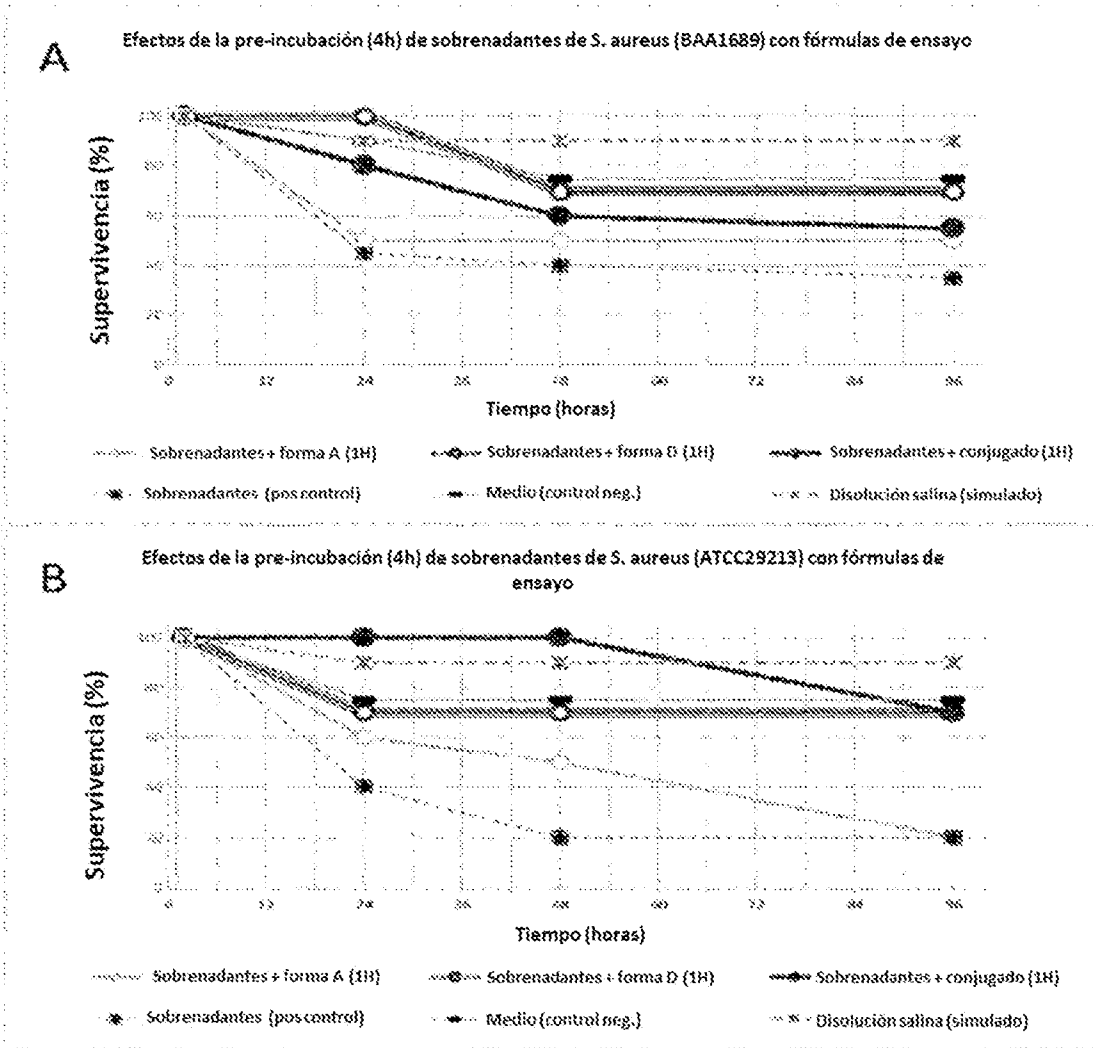
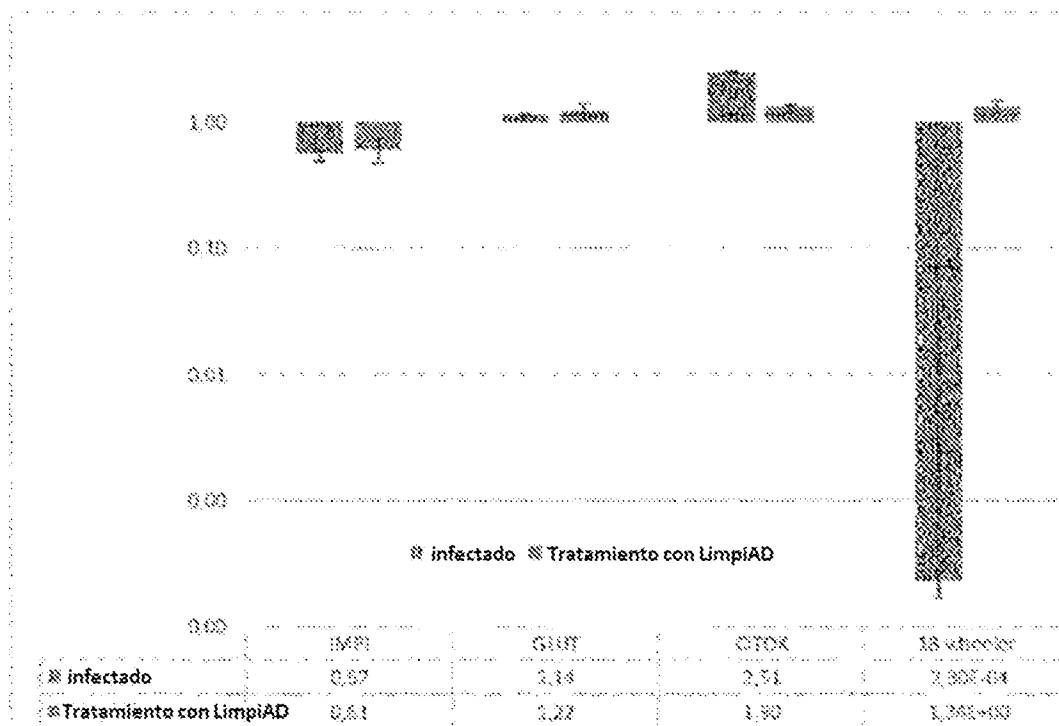


FIGURA 7



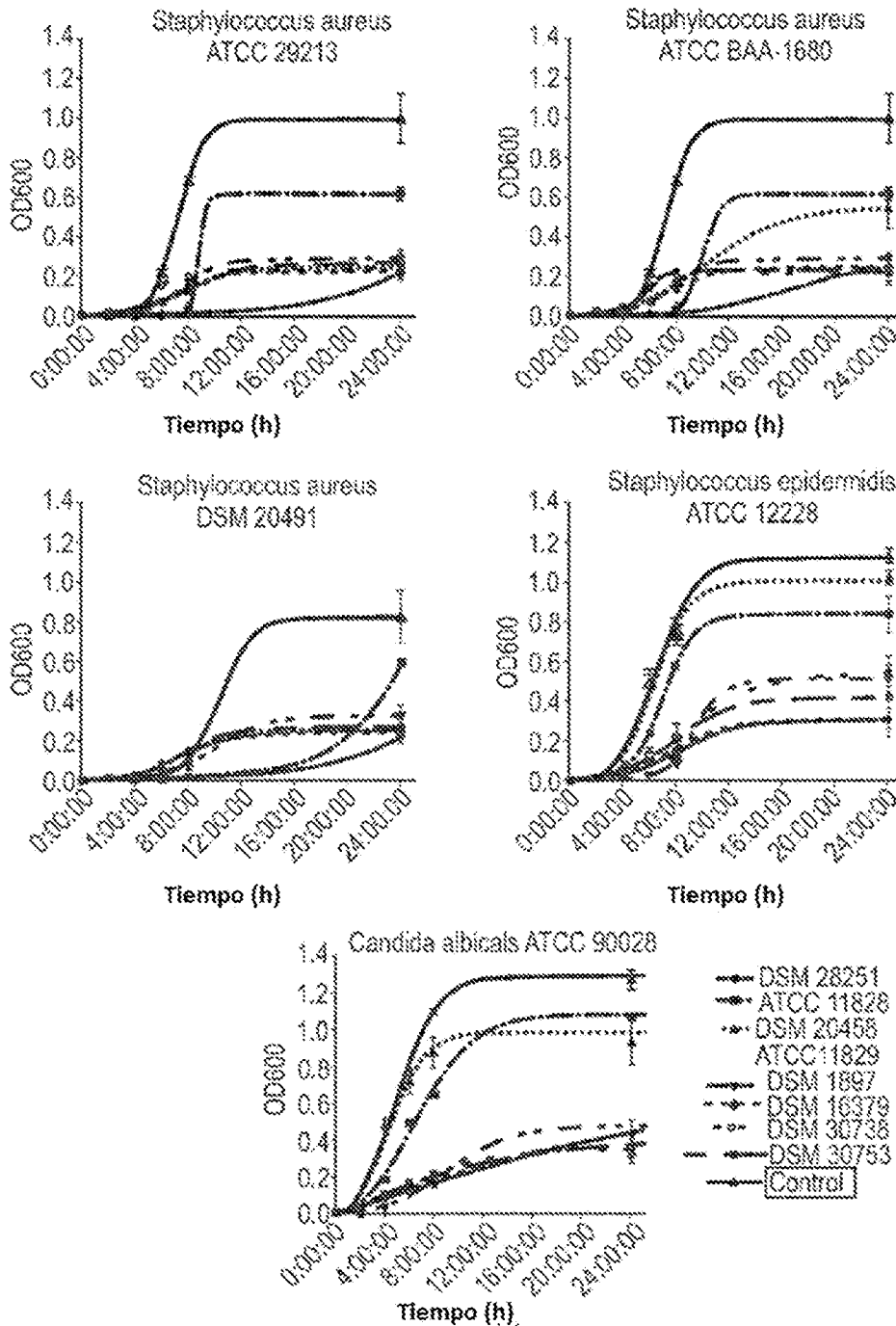


Fig. 8

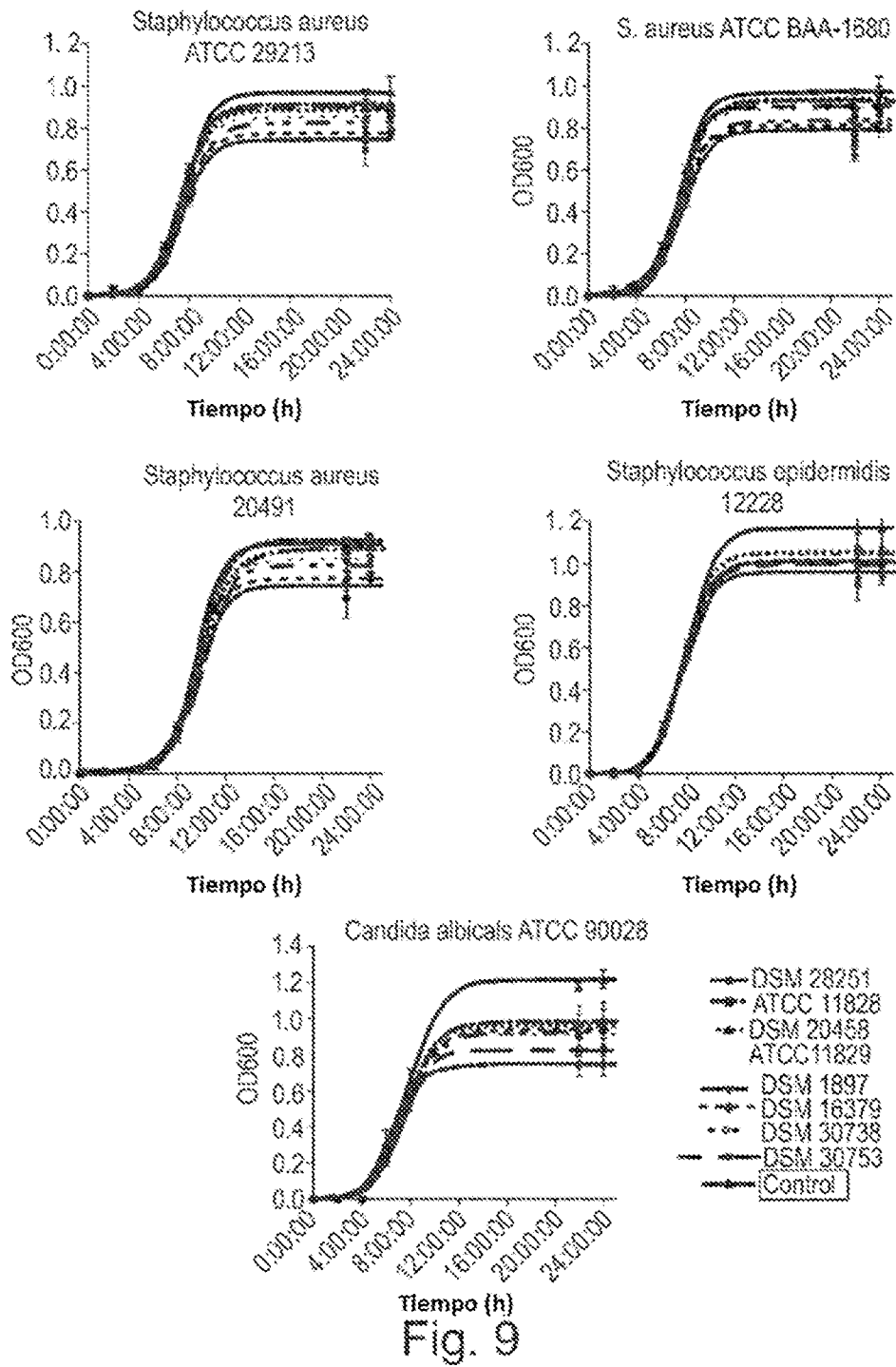


Fig. 9

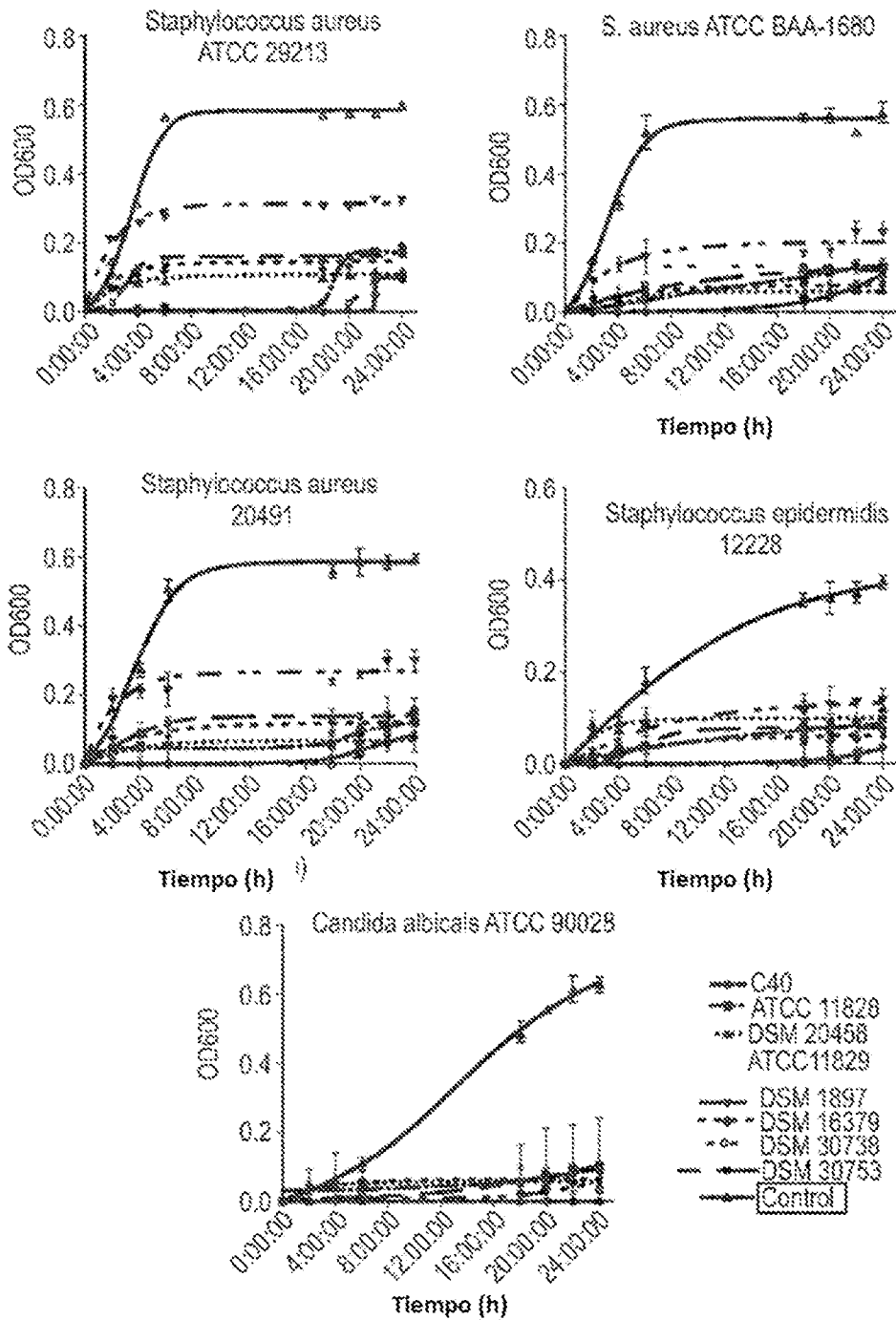


Fig. 10