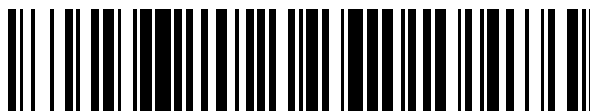


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 459**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
C07K 14/335 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2011 PCT/IT2011/000003**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11086589**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2011 E 11709193 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2523673**

54 Título: **Proceso para la preparación de una biomasa que comprende plantaricina y usos de la misma en el campo médico**

30 Prioridad:

12.01.2010 IT RM20100004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.08.2017

73 Titular/es:

GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via Palagi, 2
I-20129 Milano, IT

72 Inventor/es:

GIULIANI GIAMMARIA;
BENEDUSI ANNA;
GOBBETTI MARCO;
DL CAGNO RAFFAELLA;
DE ANGELIS MARIA y
CALASSO MARIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 631 459 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de una biomasa que comprende plantaricina y usos de la misma en el campo médico

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de una biomasa que comprende plantaricina y al uso de la misma en el campo médico. En particular, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de plantaricina A, N o K o mezclas de las mismas o una biomasa que contiene una o más de las plantaricinas anteriormente mencionadas junto con bacterias ácido lácticas usadas para la preparación y el uso de las mismas para estimular la función de barrera de las células intestinales o los queratinocitos epidérmicos humanos.

Se sabe que la epidermis y la pared intestinal desempeñan una función de barrera hacia el medio externo y los agentes dañinos hallados en él. La función de barrera de la epidermis y de la pared intestinal se puede debilitar debido a diversos factores. Una de las condiciones que con más frecuencia dan como resultado alteraciones de la función de barrera de la epidermis es la exposición a factores ambientales de origen diverso. En condiciones normales, de todos modos, la epidermis es capaz de adaptarse a posibles lesiones exógenas por medio de una adaptación que da como resultado la consecución de un "estado estacionario" y un grado de tolerancia adecuado. La agresión continua de la epidermis por detergentes irritantes y sustancias químicas (disolventes orgánicos, jabones, disoluciones detergentes), por ejemplo, puede dañar no solamente el componente lipídico de la película superficial de la epidermis, sino también el componente intercelular de la capa córnea, lo que da como resultado la degradación de la función de barrera.

Esto da como resultado una dermatitis de bajo grado caracterizada por un incremento de la pérdida transepidérmica de agua, descamación leve y pérdida de elasticidad de la capa córnea, posiblemente seguida de la formación de pequeñas soluciones superficiales continuas. Esta afección irritante leve, a menudo subclínica, desencadena los procesos de restauración que, por medio de un incremento de la síntesis de lípidos y la estimulación de la actividad de proliferación de queratinocitos basales, permite alcanzar un nuevo equilibrio y la restauración de la función de barrera.

Cuando la barrera dérmica ya no es adecuada para llevar a cabo correctamente las funciones defensivas intrínsecas, se incrementa el riesgo de aparición de patologías cutáneas inflamatorias, desencadenadas por la liberación de citocinas, lo que da como resultado la producción *in situ* de mediadores flogógenos y radicales libres. Esto último, además de la generación de lesiones directas en el ADN y las proteínas mediante un mecanismo oxidativo, puede provocar la peroxidación de las membranas celulares dérmicas.

Aunque la epidermis no contiene vasos sanguíneos, contiene de todas formas una pequeña cantidad de agua indispensable para el equilibrio fisiológico y la integridad del tejido córneo. El agua de los capilares dérmicos fluye a través de la unión dérmica-epidérmica y el canal entre las hileras de corneocitos hasta niveles similares a la mayoría de los tejidos, es decir, alrededor del 60-70% en las zonas profundas (capa córnea compacta), y el 10-35% en las regiones más superficiales (capa córnea disyuntiva). El hecho de que, también en la parte más externa, en contacto con el aire, la epidermis sea capaz de mantener un depósito de humedad se basa en dos funciones particulares: la actividad de barrera que previene la evaporación del fluido y la actividad hidrófila global de la capa córnea (capacidad de retención de agua), que es el resultado de la presencia de partículas sumamente higroscópicas. Los experimentos basados en la eliminación progresiva de las capas más delgadas de corneocitos de la capa córnea disyuntiva, y la película hidrolipídica solapante, demuestran que la función de barrera no se ve afectada de manera notable, mientras que, por otra parte, la misma se degrada gradualmente por la eliminación de las capas más profundas de las capas córneas compactas subyacentes, cuya estructura de pared cementada, con ladrillos de corneocitos que consisten en agrupamientos de queratina compactados con flagrina y una envoltura proteica rígida, es muy conocida. Mediante microscopía electrónica se ha mostrado que los corneocitos están firmemente sellados mediante placas desmosómicas modificadas (corneosomas) y están incrustados dentro de un adhesivo lipídico conocido como cemento intercorneocitario, lo que genera una película de barrera flexible y prácticamente impenetrable. Las condiciones de gran tensión afectan posiblemente de manera aguda o crónica a la barrera cutánea, y el cuerpo genera contra las mismas una serie de mecanismos homeostáticos que dan como resultado la capacidad de la epidermis de monitorizar y restaurar la eficacia cuando se da un fallo de la misma independientemente del origen del agente nocivo agudo. La epidermis responde a las tensiones cutáneas crónicas, inducidas por una exposición prolongada a la baja humedad del aire, tal como ocurre generalmente en los climas secos, por medio de fenómenos adaptativos compensatorios que dan como resultado el incremento de la proliferación de las células basales y el incremento consecuente del grosor de la capa córnea y de la epidermis en conjunto. Además se incrementa la producción y exocitosis de cuerpos de Odland y lípidos intercorneocitarios (que mantienen la composición habitual) de forma que la epidermis puede conservar de mejor manera los recursos hídricos. En cualquier caso, la deficiencia de humedad da como resultado un cambio de fase con respecto a la estratificación líquido-lípido del cemento intercorneocitario con una cristalización posterior. Como resultado, se da una menor plasticidad y rigidez con respecto a las tracciones inducidas por los movimientos músculo-articulares y los estímulos dinámicos extrínsecos, y así se generan fácilmente microlesiones. Otra implicación de las respuestas adaptativas similares consiste en la hiperqueratosis: el incremento de la capa de proliferación no se contrarresta con una tasa de exfoliación superior correspondiente de corneocitos que, en vez de descamarse, permanecen incrustados en agrupamientos masivos córneos y se desprenden solamente en forma de grandes descamaciones.

Además, las tensiones ambientales crónicas activan una cascada de citocinas con aspectos histológicos de flogosis en asociación con hipertrofia y desgranulación de mastocitos en la dermis. Esto puede explicar la exacerbación de las dermatopatologías inflamatorias observadas en invierno.

Cada lesión aguda contra la barrera de la epidermis induce una respuesta de citocinas por parte de las células cutáneas implicadas, cuyos efectos se reflejan en los queratinocitos y la dermis subyacente, lo que da como resultado consecuencias morfológicas y funcionales importantes dirigidas a la restauración de la función de barrera, el texturizado de la superficie epidérmica, y, sobre todo, la estimulación de la actividad de los fibroblastos en la que se basa la mejora de la compactibilidad y la rigidez de la dermis.

En realidad, los métodos usados para restaurar la función de barrera se basan en el uso de sustancias de restauración e hidrorregulación adecuadas para evitar la defensa cutánea insuficiente que resulta de la alteración de la función de barrera. Estas sustancias son compuestos con actividad de rehidratación y reestructuración. Muchos productos dermocosméticos permiten la rehidratación cutánea y, de acuerdo con su función restauradora, favorecen la regeneración cutánea. Sin embargo, los mismos actúan por medio de un simple "enmascaramiento cosmético" de una superficie rugosa, y no poseen un auténtico efecto terapéutico, que tendrían que ejercer por medio de una actividad reparadora y regenerativa dirigida a la restauración de la integridad morfofuncional cutánea.

Recientemente se ha resumido que las bacterias son adecuadas para liberar y detectar moléculas señal como respuesta a las modificaciones de las condiciones ambientales, lo que incluye las variaciones de su densidad celular y/o el número de otras especies celulares microbianas que se dan en un ecosistema (Sturme et al., 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFA1. *Microbiology* 153: 3939-3947). Con respecto a las bacterias ácido lácticas, estas respuestas, que se dan de acuerdo con un mecanismo de "detección de quórum" (QS), incluyen moléculas señal denominadas autoinductores de tipo 2 (AI-2, principalmente derivados de furanonas) sintetizados mediante el uso de la actividad de la enzima LuxS (Miller y Bassler, 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6: 191-197), o moléculas señal denominadas feromona peptídica o autoinductor peptídico (AIP) (Nakajama et al., 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 41: 145-154). Recientemente se ha probado que el genoma de *L. plantarum* WCFS1 contiene un elevado número de genes que codifican péptidos AIP, junto con otros genes que codifican otras funciones implicadas en los mecanismos de "detección de quórum" (Sturme et al., 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFA1. *Microbiology* 153: 3939-3947). Algunos estudios han demostrado que el sistema que se dirige a la síntesis de una feromona peptídica de tipo plantaricina está implicado en mecanismos de comunicación celular intraespecie. En este caso, la feromona peptídica se usa como medio para medir la densidad celular de la especie que sintetiza la molécula (Diep et al., 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl Environ Microbiol* 60:160-166). Otros estudios también han demostrado que las feromonas peptídicas de tipo plantaricina pueden estar implicadas en mecanismos de comunicación celular interespecie. En particular, la presencia de microorganismos competitivos puede activar el sistema de regulación implicado en los mecanismos de antagonismo microbiano (Maldonado et al., 2004. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* 181: 8-16). En presencia de otras especies microbianas a una densidad celular elevada, la feromona peptídica favorece una serie en cascada de reacciones de fosforilación que implican fenómenos complejos de regulación metabólica que dan como resultado la síntesis de moléculas señal que actúan específicamente como compuestos antimicrobianos de tipo bacteriocina (por ejemplo, plantaricinas A, K y N) (Hauge et al., 1998. Plantaricin A is an ampiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* 37:16026-16032).

Aunque se ha dilucidado parcialmente el mecanismo de comunicación celular entre células procarióticas y eucarióticas, existe una bibliografía muy limitada con respecto a las interacciones entre las moléculas señal implicadas en los mecanismos de "detección de quórum" de las bacterias (por ejemplo, las feromonas peptídicas) y las células de la mucosa intestinal humana. El único ejemplo es el pentapéptido CSF, sintetizado por el microorganismo probiótico *Bacillus subtilis*, como molécula implicada en los fenómenos de competencia y esporulación (Fujita et al., 2007. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 1:299-308). Se ha demostrado que dicho pentapéptido es adecuado para inducir la quinasa p38 MAP, quinasa B (Akt) y criotolerancia, por lo que se favorece la prevención del daño oxidativo a nivel intestinal y se refuerza la función de barrera. Además, en el estado de la técnica actual no existe ninguna publicación o patente centrada en el efecto de las moléculas señal implicadas en los mecanismos de comunicación celular bacteriana con respecto a la epidermis humana.

Los autores de la presente invención han descubierto que la plantaricina, en particular la plantaricina A, ejerce un efecto positivo sobre la función de barrera de los queratinocitos en la epidermis humana y también en las células intestinales.

Se conocen los estudios sobre los procesos para la preparación de plantaricina mediante el uso de monocultivos bacterianos (intraespecie). Sin embargo, el cultivo de los microorganismos de interés se lleva a cabo en medios de cultivo complejos y demasiado caros para ampliarlos a nivel industrial para la preparación de moléculas señal para fines terapéuticos.

Los autores de la presente invención han desarrollado un proceso para la preparación de plantaricina mediante el uso de un cocultivo de dos bacterias ácido lácticas específicas adecuadas para obtener un rendimiento mayor que los obtenidos según la técnica conocida. En particular, el cultivo de *L. plantarum* DC400 (depositada en la DSMZ el 21 de diciembre de 2009 con el número DSM 23213) en forma de un cocultivo con *L. rossiae* DPPMA174 (depositada en la DSMZ el 21 de diciembre de 2009 con el número DSM 23214) es adecuado para activar la síntesis de la feromona peptídica de tipo plantaricina (en particular plantaricina A), y se obtienen concentraciones alrededor de 50 veces mayores que en presencia de un monocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213). Además, se ha demostrado que el cultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) con otras especies de bacterias ácido lácticas, también aisladas mediante "fermentación natural", no es adecuado para estimular la síntesis de la feromona peptídica como cuando está en asociación con *L. rossiae*. Otro aspecto importante del proceso según la presente invención es que la síntesis de plantaricina A es viable no solamente en el medio de cultivo empleado normalmente para el cultivo de laboratorio de bacterias ácido lácticas, sino también en mosto de uva, suero de leche y extractos acuosos de frutas y de productos vegetales.

Según la técnica conocida, ninguna publicación o patente describió la síntesis de plantaricina tipo A (PlnA) como mecanismo de respuesta al cocultivo de dos bacterias ácido lácticas (por ejemplo, *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis*) que se da en el mismo ecosistema alimentario, como la "fermentación natural" usada para la producción de productos fermentados horneados. Además, de acuerdo con la bibliografía, no se ha informado un incremento de la síntesis de plantaricina A en cocultivo (interespecie) con respecto a las condiciones de monocultivo (intraespecie). Además, como se informó anteriormente, según los procesos conocidos, se usan medios de cultivo muy caros y complejos.

Además, se ha descubierto sorprendentemente que la biomasa obtenida de acuerdo con el proceso de la invención que comprende una o más plantaricinas en asociación con las bacterias ácido lácticas *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) ejerce una eficacia mayor que la plantaricina sola en la mejora de la función de barrera a nivel de la epidermis o de la pared intestinal.

Las bacterias ácido lácticas según la presente invención pertenecen a la especie *Lactobacillus* y se han aislado a partir de "fermentaciones naturales" para la producción típica de pan en el sur de Italia.

Se ha estandarizado y optimizado un protocolo biotecnológico que implica el cocultivo de dichas bacterias en CDM (medio químicamente definido), WFH (hidrolizado de harina de trigo) (Gobbetti, 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and sourdoughs. *Trends Food Sci Technol* 9:267-274), mosto de uva (dilución al 1% de carbohidratos solubles, adición de un 0,5% de maltosa y 0,5% de extracto de fermentación, pH 5,6), suero de leche (adición de un 0,5% de maltosa y 0,5% de extracto de fermentación, pH 5,6) o extractos acuosos de productos vegetales y de frutas (adición de un 0,5% de maltosa y 0,5% de extracto de fermentación, pH 5,6) durante 18 - 24 horas a 30 - 37 °C. Al final del cultivo, las células se pueden eliminar o no del caldo de cultivo mediante centrifugación, y después el sobrenadante se somete a un proceso de deshidratación mediante secado o liofilización.

A continuación se describe un esquema del protocolo biotecnológico para la formulación de la preparación basada en plantaricina A.

Propagación de cultivos de bacterias ácido lácticas a 30 °C durante 24 horas, lavado, suspensión en agua a una densidad celular de 9,0 log ufc/ml y coinoculación (1-4%) del medio de cultivo (CDM, WFH, mosto de uva, suero de leche, extractos acuosos de frutas y de productos vegetales)

↓

Cultivo a 30 - 37 °C durante 18 - 24 horas

↓

Eliminación de las células mediante centrifugación

↓

Deshidratación del sobrenadante mediante secado o liofilización

↓

Formulación de la preparación para la aplicación en un producto para el cuidado de la piel

Cuando se lleva a cabo un cultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) en condiciones de cocultivo en cualquiera de los sustratos anteriormente mencionados, se detecta la síntesis de plantaricina A a una concentración de 2,5 a 4,0 µg/mL. En condiciones de monocultivo, la concentración de la plantaricina A sintetizada por *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) es de alrededor de 0,06 µg/mL. En condiciones de

cocultivo con otras especies de bacterias ácido lácticas (por ejemplo *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus rhamnosus*), la síntesis de plantaricina A es notablemente inferior. En condiciones de cocultivo con *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214), se ha detectado la síntesis de otras feromonas peptídicas, como plantaricina tipo K y N, aunque a concentraciones inferiores que plantaricina A, y en particular en el intervalo de 0,02 a 0,06 µg/ml. Según una posible formulación, la aplicación de 2,5 µg/ml de plantaricina A estimuló las funciones de barrera como se demostró mediante el uso de un modelo de epidermis reconstruida (SkinEthic®) y un ensayo de resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Se han obtenido resultados similares mediante el uso de células intestinales Caco-2/TC7 adecuadas para reproducir la mucosa intestinal.

Según los análisis complementarios llevados a cabo mediante el uso de técnicas microbiológicas, cromatográficas y ensayos *in vitro* y *ex vivo* sobre cultivos celulares, el cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214), nunca usado en estudios anteriores, según la presente invención, permite: (i) la síntesis de moléculas señal implicadas en los mecanismos de comunicación celular interespecie a una concentración indetectable en presencia de otras asociaciones de bacterias ácido lácticas en un único ecosistema; (ii) la síntesis de plantaricina A, y otras plantaricinas (K y N), también mediante el uso de sustratos de bajo coste; y (iii) un efecto protector que aumenta la función de barrera a nivel celular en la epidermis y el intestino, lo que demuestra que las moléculas señal sintetizadas por las células procarióticas también son detectadas por las células eucarióticas.

Por lo tanto, un objetivo específico de la presente invención es un proceso biotecnológico para la síntesis de una biomasa que comprende o que consiste en al menos una plantaricina seleccionada de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, o mezclas de las mismas y las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o para la preparación de una o más plantaricinas seleccionadas de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, o mezclas de las mismas, y dicho proceso comprende o consiste en las siguientes etapas:

a) propagación del cultivo de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214;

b) coinoculación de un sustrato seleccionado del grupo que consiste en medio químicamente definido (CDM), hidrolizado de harina de trigo (WFH), mosto de uva, suero de leche o extractos de frutas y de productos vegetales, con una suspensión acuosa de bacterias ácido lácticas como se definió en la etapa a);

c) incubación; y, opcionalmente,

d) centrifugación del caldo de cultivo para eliminar las células de bacterias ácido lácticas.

En particular, la densidad celular de la suspensión de la etapa a) puede ser de alrededor de 9,0 Log ufc/ml para cada especie de bacteria ácido láctica, y se añade al sustrato en un porcentaje que oscila del 1 al 4% basado en el volumen de sustrato. La etapa de incubación se puede llevar a cabo a una temperatura de 30 a 37 °C, preferiblemente 30 °C, durante 18 - 24 horas, preferiblemente 18 horas, mientras la centrifugación se puede llevar a cabo a 10000 x g durante 15 min a 4 °C.

El proceso según esta invención puede comprender además una etapa e) para la deshidratación del sobrenadante obtenido de la etapa d) mediante secado o liofilización.

Un objetivo adicional de la presente invención es una biomasa obtenible u obtenida según el proceso anteriormente mencionado, que comprende o que consiste en al menos una plantaricina seleccionada de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, o mezclas de las mismas, y las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica o cosmética que comprende o que consiste en la biomasa anteriormente definida, como principio activo, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Un aspecto particular de la presente invención se refiere además al uso de la biomasa o composición anteriormente definida para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la alteración de la función de barrera de la epidermis o de la pared intestinal, o para la cicatrización de heridas.

Las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 o *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, o las mezclas de las mismas, son un objetivo adicional de la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso de una o más plantaricinas seleccionadas de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la alteración de la función de barrera de la epidermis o de la pared intestinal, o para la cicatrización de heridas.

La presente invención se describirá a continuación de una manera ilustrativa pero no limitante, según las realizaciones preferidas de la misma, en particular con referencia a los dibujos adjuntos.

La Figura 1a muestra los resultados del análisis mediante HPLC multidimensional (MDLC) acoplado a MS (nano-ESI/MS-MS) con trampa de iones con ionización por electrospray (ESI) del sobrenadante sin células del caldo de cultivo obtenido mediante el cocultivo de *Lactobacillus plantarum* DC400 (DSM 23213) y *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DSM 23214). La Figura 1b muestra el cromatograma obtenido a partir del cromatograma real de la Figura 1a basado en el tiempo de adquisición específico con las proporciones m/z relativas a la plantaricina A. La Figura 1c muestra el espectro MS/MS que detecta especies basándose en la proporción m/z 1493,7 observada en el cromatograma de la Figura 1a.

La Figura 2 muestra la concentración de plantaricina A sintetizada a partir de monocultivos de *Lactobacillus plantarum* DC400 (DC400), *L. plantarum* DPPMA 20 (DPPMA20), *Lactobacillus pentosus* 12H5 (12H5), *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DPPMA174) y *Pediococcus pentosaceus* 2XA ϵ (2XA3), y cocultivos de *L. plantarum* DC400 con *L. plantarum* DPPMA20 (DC400-DPPMA20), *L. pentosus* 12H5 (DC400-12H5); *L. rossiae* DPPMA174 (DC400-DPPMA174) o *P. pentosaceus* 2XA3 (DC400-2XA3). Los datos son la media de tres experimentos por triplicado.

La Figura 3 muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus rossiae* DPPMA174. Monocultivo (●); cocultivo con *Lactobacillus plantarum* DC400 (○); monocultivo con plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml) (Δ); y monocultivo con plantaricina A sintetizada químicamente (2,5 μ g/ml) (▲). La plantaricina A purificada corresponde a la sintetizada mediante el cocultivo de *L. plantarum* DC400 y *L. rossiae* DPPMA174. Los datos son la media de tres experimentos por triplicado.

La Figura 4 muestra porciones de geles relacionadas con el análisis bidimensional electroforético de las proteínas expresadas de *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 tras 18 horas de cultivo. Panel A, monocultivo; panel B, cocultivo con *Lactobacillus plantarum* DC400; y panel C, monocultivo en presencia de plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml). Los números marcados con un óvalo o triángulo se refieren a proteínas que exhiben un incremento o disminución del nivel de expresión en el cultivo con *L. plantarum* DC400 o plantaricina A purificada. Los números marcados con un rombo o triángulo doble se refieren a proteínas que exhiben un incremento o disminución del nivel de expresión solamente en el cocultivo con *L. plantarum* DC400.

La Figura 5 muestra la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) (Ohms x cm²) de epidermis reconstruidas (SkinEthic®) tras la exposición durante 0 y 24 horas a tampón PBS, plantaricina A (2,5 μ g/ml) o biomasa que contiene 2,5 μ g/ml de plantaricina A, respectivamente. Los datos son la media de tres experimentos por triplicado.

La Figura 6 muestra la viabilidad de células Caco2/TC7 medida como la absorción de Rojo Neutro tras 24, 48 y 72 horas de incubación con plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml) producida mediante un monocultivo de *Lactobacillus plantarum* DC400 (DC400) o con un cocultivo de *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DC400-DPPMA174). La fracción purificada del monocultivo de *L. rossiae* DPPMA174 eluida según las condiciones cromatográficas como para plantaricina A se ha usado como control negativo (DPPMA174). Otro control negativo es el medio de cultivo DMEM (DMEM). La plantaricina A sintetizada químicamente (2,5 μ g/ml) se ha usado como control positivo (PInA). Los datos son la media de tres experimentos por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,01$) con respecto al control negativo.

La Figura 7 muestra la viabilidad de células Caco2/TC7 medida como la absorción de Rojo Neutro tras 24, 48 y 72 horas de incubación con interferón γ (IFN- γ) (1000 U/ml) solo y con IFN- γ + plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml) (IFN- γ + DC400-DPPMA174). La plantaricina purificada es de un cocultivo de *Lactobacillus plantarum* DC400 y *Lactobacillus rossiae* DPPMA174. El medio de cultivo DMEM se ha usado como control negativo (DMEM). Se ha usado plantaricina A sintetizada químicamente (2,5 μ g/ml) junto con IFN- γ como control positivo (PInA). Los datos son la media de tres experimentos por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,01$) con respecto al control negativo.

La Figura 8 muestra la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) (Ohms x cm²) de células Caco2/TC7 tras 24 y 48 horas de incubación. La incubación se ha llevado a cabo con: plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml) de un monocultivo de *Lactobacillus plantarum* DC400 (DC400); plantaricina A purificada (2,5 μ g/ml) de un cocultivo de *L. plantarum* DC400 y *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DC400-DPPMA174); plantaricina A sintetizada químicamente (2,5 μ g/ml) (PInA); interferón γ (IFN- γ) (1000 U/ml) y plantaricina A purificada de un cocultivo de *L. plantarum* DC400 y *L. rossiae* DPPMA174 (IFN- γ + DC400-DPPMA174); e IFN- γ y plantaricina A sintetizada químicamente (PInA + IFN- γ). El medio de cultivo DMEM (DMEM) se ha usado como control negativo. Los datos son la media de tres experimentos por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,01$) con respecto al control negativo.

La Figura 9 muestra los resultados de los ensayos de cicatrización de heridas en queratinocitos tratados con el control, plantaricina A o biomasa que contiene plantaricina A, respectivamente.

La Figura 10 muestra la distancia entre los márgenes de una herida tratada con control, plantaricina A o biomasa que contiene plantaricina A.

La Figura 11 muestra el porcentaje de incremento de la cicatrización para la herida tratada con el control, plantaricina A o biomasa que contiene plantaricina A.

La Figura 12 muestra imágenes representativas de una monocapa de queratinocitos humanos 2544 NCTC tratados,

tras el corte, con Plantaricina cocultivada (a) y Plantaricina sintética (b), a los diferentes intervalos de tiempo considerados. El corte de la monocapa se ha llevado a cabo mediante el uso de una punta de pipeta de 200 µl. Las células se han tratado con Plantaricina cocultivada y sintética independientemente, y a concentraciones de 0,1, 1 y 10 µg/ml.

5 La Figura 13 muestra el porcentaje de células migradas a través del área del corte tras el tratamiento con Plantaricina cocultivada (0,1, 1 y 10 µg/ml). Los porcentajes de migración se han determinado midiendo el área clara entre las dos líneas del corte a 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas tras el corte. Las barras representan las medias ± E.E.M de dos experimentos independientes por triplicado.

10 La Figura 14 muestra el porcentaje de células migradas a través del área del corte en el momento inicial tras el tratamiento con Plantaricina sintética (0,1, 1 y 10 µg/ml). Los porcentajes de migración se han determinado midiendo el área clara entre las dos líneas del corte a 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas tras el corte, en comparación con el área clara inicial. Las barras representan las medias ± E.E.M de dos experimentos independientes por triplicado.

15 La Figura 15 muestra el porcentaje de área clara con respecto al área del corte inicial tras el tratamiento de la monocapa de queratinocitos humanos NCTC2544 con Plantaricina cocultivada (0,1, 1 y 10 µg/ml). Los porcentajes de migración se han determinado midiendo el área clara entre las dos líneas del corte a 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas tras el corte, en comparación con el área clara inicial. Las barras representan las medias ± E.E.M de dos experimentos independientes por triplicado.

20 La Figura 16 muestra el porcentaje de área clara con respecto al área del corte inicial tras el tratamiento de la monocapa de queratinocitos humanos NCTC2544 con Plantaricina sintética (0,1, 1 y 10 µg/ml). Los porcentajes se han determinado midiendo el área clara entre las dos líneas del corte a 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas tras el corte, en comparación con el área clara inicial. Las barras representan las medias ± E.E.M de dos experimentos independientes por triplicado.

25 La Figura 17 muestra el efecto de la Plantaricina cocultivada (0,1, 1 y 10 µg/ml), Plantaricina sintética (0,1, 1 y 10 µg/ml) y Conectivina (200 µg/ml) sobre la expresión de TGFβ1 en una monocapa de queratinocitos humanos NCTC 2544, en la que se hizo una incisión para obtener un corte con una punta de pipeta de 200 µl.

Ejemplo 1: *Síntesis y purificación de feromonas peptídicas de tipo plantaricina y estudio de los efectos de las mismas sobre la epidermis y las células Caco-2.*

30 *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM) de la Collezione di Colture del Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata dell'Università degli Studi di Bari, previamente aisladas de "fermentaciones naturales", se han propagado a 30 °C durante 24 horas en medios MRS modificados (mMRS), que contienen, además de los ingredientes habituales, un 5% de maltosa y un 10% de agua de fermentación - pH final 5,6.

35 Las células cultivadas 24 h, recogidas mediante centrifugación (10.000 x g durante 15 min a 4 °C), lavadas dos veces con tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 y resuspendidas en agua a una densidad celular de 9,0 log ufc/ml, se han inoculado (4%, para cada especie) en condiciones de mono- o cocultivo en medios de cultivo WFH (Gobbetti, 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and sourdoughs. *Trends Food Sci Technol* 9:267 - 274). Se ha aplicado el mismo procedimiento y se han obtenido los mismos resultados, descritos sucesivamente, mediante el uso de mosto de uva (dilución al 1% de carbohidratos solubles, adición de un 0,5% de maltosa y un 0,5% de extracto de fermentación, pH 5,6), suero de leche (véanse las integraciones previas) o extractos acuosos de productos vegetales y de frutas (véanse las integraciones previas) como sustratos de cultivo. La incubación se lleva a cabo durante 18 horas a 30 °C. Tras la eliminación de las células mediante centrifugación (10.000 x g durante 10 min a 4 °C), a los sobrenadantes de los mono- y cocultivos se les ha añadido ácido trifluoroacético (0,05%) y se han centrifugado a 10.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se ha filtrado mediante el uso de filtros de poro de 0,22 µm. El análisis mediante HPLC se ha llevado a cabo con el uso de un aparato AKTA Purifier (GE Healthcare) 45 equipado con un detector que funciona a 214 nm y con el uso de una columna de fase inversa C18 XTerra (Waters, Mildford). Se ha usado una mezcla de agua, 2-propanol y ácido trifluoroacético (0,05%) como fase móvil. Todas las fracciones que contienen plantaricina tipo A se han analizado mediante el uso de un cromatógrafo multidimensional (MDLC) acoplado a un espectrómetro de masas ESI-trampa de iones MS. Las condiciones de análisis para la identificación y cuantificación de las plantaricinas A, K y N son según Di Cagno et al. (Di Cagno et al., 2010. Quorum 50 sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 (DSM 23213): induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, en prensa).

(2) Cinética de crecimiento de *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DSM 23214)

55 Los datos cinéticos de crecimiento de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) se han procesado mediante el uso de la ecuación de Gompertz, modificada sucesivamente (Zwietering et al., 1990. Modelling of bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56: 1875-1881). El recuento de células se ha llevado a cabo mediante la colocación en placas en medio de cultivo SDB a 30 °C durante 48 horas. Se ha determinado la viabilidad celular y el número de células dañadas y/o muertas por medio del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD bacLight (Molecular Probes, Inc., Cambridge).

(3) Análisis electroforético bidimensional e identificación de proteínas

Se ha llevado a cabo un análisis electroforético bidimensional de las proteínas citoplasmáticas de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) mono- o cocultivada mediante el uso de un sistema inmobilina-poliacrilamida (De Angelis et al., 2005. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762:80-93). Se han analizado cuatro geles para cada condición, y los datos se han estandarizado según el procedimiento de Bini et al. (Bini et al., 1997. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis.* 18:2831-2841).

La identificación de proteínas se ha llevado a cabo mediante el uso de un análisis LC-ESI-MS/MS y la comparación de las secuencias obtenidas respecto de diversas bases de datos (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EE.UU.; ProFound, <http://www.prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>).

(4) Ensayos en epidermis reconstruida y determinación TEER (resistencia eléctrica transepitelial)

La epidermis humana reconstruida SkinEthic® (epidermis humana reconstruida) consiste en queratinocitos normales de epidermis humana multicapa. Es una epidermis completamente diferenciada de un cultivo de queratinocitos humanos en un medio químicamente definido (MCDM 153), sin adición de suero de ternero, sobre un soporte de policarbonato poroso inerte en una interfase aire-líquido, a lo largo de 17 días. En esta etapa del crecimiento, el análisis morfológico muestra una epidermis viable multicapa y una capa córnea que consiste en más de diez capas celulares compactas. La epidermis humana SkinEthic® se ha usado según un protocolo descrito previamente (Di Cagno et al., 2009. Synthesis of γ -amino butyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSMZ19463: functional grape must beverage and dermatological application. *Appl Biotechnol Microbiol* DOI: 10.1007/s00253-009-23704).

La determinación TEER se ha llevado a cabo mediante el uso de un micróhmetro Millicell-ERS (Di Cagno et al., 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, en prensa).

(5) Ensayos en células Caco-2/TC7

Se han cultivado células Caco-2/TC7 humanas (clon TC7) en medio de Dulbecco (DMEM), con la adición de suero de ternero (10%), aminoácidos no esenciales (1%), gentamicina/estreptomicina (50 μ g/ml), glutamina (2 mM) y ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinil-etansulfónico (1%) (Di Cagno et al., 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, en prensa). Se ha determinado la viabilidad celular con un ensayo de absorción mediante el uso del colorante Rojo Neutro (Balls et al., 1987. Approaches to validation alternative methods in toxicology. En: Goldber A.M. (Ed). N.Y. Academic Press, pags. 45-58). Después de un tratamiento de 24 - 72 horas con diversas preparaciones, las células se han lavado con tampón PBS y se han incubado durante 4 horas a 37 °C con una disolución de Rojo Neutro (33 mg/l). Sucesivamente, las células se han lavado de nuevo con tampón PBS y se han tratado con una disolución de lisis (50% de etanol en agua que contiene un 1% de ácido acético). La lectura de las placas se ha llevado a cabo mediante el uso de un lector de placas Novapath (Biorad, Hercules, CA). Di Cagno et al., 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation conditions with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, en prensa).

Para la determinación TEER, se han inoculado células Caco-2/TC7 ($7,5 \times 10^4$ células/ml) en una placa de 24 pocillos y un filtro de polietileno (poro de 0,4 μ m). Antes del tratamiento, las células se han incubado durante 21 días a 37 °C. Los tratamientos con las diversas preparaciones se han llevado a cabo durante 18, 24 y 48 horas. Por lo tanto, se ha determinado la integridad de la capa celular por medio de la determinación TEER.

Resultados

(1) Síntesis y purificación de feromonas peptídicas de tipo plantaricina

Después de 18 horas de crecimiento en medio de cultivo WFH, la densidad celular del monocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) fue $9,27 \pm 0,18$ log ufc/ml. Los valores de $\mu_{\max}$ y λ fueron, respectivamente, alrededor de 0,27 log ufc/ml/h y 3,77 h. La densidad celular de las bacterias ácido lácticas cambió de $9,0 \pm 0,05$ (*L. brevis* CR13) a $9,43 \pm 0,31$ log ufc/ml (*L. plantarum* DPPMA20). Los valores de $\mu_{\max}$ variaron de $0,11 \pm 0,05$ (*L. pentosus* 12H5) a $0,15 \pm 0,04$ log ufc/ml/h (*L. plantarum* DPPMA20), y el valor λ cambió de $0,37 \pm 0,07$ (*P. pentosaceus* 2XA3) a $4,20 \pm 0,36$ h (*L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214)). En comparación con el monocultivo, la densidad celular de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) no cambió significativamente ($P > 0,05$) ($9,06 \pm 0,34$ - $9,28 \pm 0,42$ log ufc/ml) al cocultivar el microorganismo con las otras bacterias ácido lácticas. Además, el rendimiento celular de *L. plantarum* DPPMA20, *Lactobacillus paralimentarius* 8D, *L. pentosus* 12H5, *Lactobacillus reuteri* y *Weissella cibaria* 10XA16 no se ha condicionado por las condiciones de cocultivo. Al contrario, la densidad celular de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) y *P. pentosaceus* 2XA3 disminuye notablemente ($P < 0,05$) (alrededor de 8,08 y 8,39 log ufc/ml) en comparación con las condiciones de monocultivo. En general, los valores de $\mu_{\max}$ disminuyen para todas las bacterias ácido lácticas al cocultivarlas con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213). Con la excepción de *L. plantarum* DPPMA20, también se incrementa la fase de latencia λ para todas las bacterias ácido lácticas. Las cepas de bacterias ácido lácticas que han mostrado una inhibición (*L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) y *P. pentosaceus*

2XA) como resultado del cocultivo con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y ciertas cepas no afectadas por las condiciones de cocultivo (*L. plantarum* DPPMA20 y *L. pentosus* 12H5) se han usado en experimentos sucesivos.

De acuerdo con los resultados anteriores, el número de células viables de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) disminuye de $9,0 \pm 0,28$ a $8,32 \pm 0,25$ log células/ml de monocultivo en las condiciones de cocultivo con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213). El número de células viables y cultivables no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$). De nuevo con referencia a las condiciones de monocultivo, el número de células de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) muertas o dañadas se incrementa significativamente ($P < 0,05$) en las condiciones de cocultivo con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213). Además, el número de células de *P. pentosaceus* cultivables disminuye significativamente ($P < 0,05$) cuando la bacteria láctica se ha cocultivado con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213).

Tras la eliminación de las células, los sobrenadantes de los mono- y cocultivos se usan para la determinación de las feromonas peptídicas de tipo plantaricina mediante el uso de análisis MDLC acoplado a espectrometría de masas nano-ESI/MS-MS. La Figura 1a muestra un cromatograma de barrido completo de una muestra de cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214). Debido a la complejidad de la matriz, ha sido posible identificar ciertas especies, mientras, al contrario, fue difícil llevar a cabo una separación completa de los picos adyacentes. Sin embargo, fue posible separar las especies co-eluidas mediante filtración de señales en correspondencia con los valores m/z particulares. Un ejemplo de las especies identificadas se informa en la Figura 1b. Se han obtenido espectros MS/MS para cada especie. Por ejemplo, la Figura 1c muestra el espectro correspondiente al valor m/z 1493,7, seleccionado para la muestra del cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214). Para la búsqueda de secuencias en la base de datos NCBI, se han especificado los siguientes parámetros: género (*Lactobacillus*), proporción de tolerancia m/z para el reconocimiento de iones (0,2 Da) e instrumentación usada para el análisis. La presencia de plantaricina A (SEQ ID N°: 1 Lys-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gln-Met-Gly-Ala-Thr-Ala-Ile-Lys-Gln-Val-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Trp-Gly-Trp) se ha observado para los monocultivos de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y DPPMA20, y todos los cocultivos en los que se ha cultivado la cepa DC400 con otras bacterias ácido lácticas.

Basándose en los resultados previos, las muestras de los mono- y cocultivos se han purificado mediante el uso de 4 análisis cromatográficos, y se han analizado adicionalmente mediante el uso de nano-ESI-MS para excluir otra contaminación peptídica. La concentración de plantaricina A sintetizada por *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) se ha determinado mediante análisis cromatográfico, con el uso de una columna de fase inversa C18 XTerra (Waters, Milford), y un método OPA. La Figura 2 muestra la concentración de plantaricina A en diversas condiciones. Es posible observar que el rendimiento de la síntesis de la feromona peptídica se incrementa desde las condiciones de monocultivo (alrededor de 0,06 µg/ml) hasta las condiciones de cocultivo en presencia de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) (alrededor de 2,5 µg/ml). En ciertas condiciones experimentales, la concentración de plantaricina A es de alrededor de 4,0 µg/ml. Aunque se ha observado la producción de plantaricina A en condiciones de cocultivo con otras especies de bacterias ácido lácticas, la cantidad obtenida es notablemente inferior al cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214).

Este resultado demuestra que la síntesis de la feromona peptídica es específica en presencia de interacciones microbianas específicas adecuadas para inducir la liberación de moléculas señal. La síntesis de plantaricina A se inicia durante la fase de crecimiento exponencial intermedia (alrededor de 7 horas) y se incrementa hasta el final de la fase exponencial (alrededor de 12 horas). Aunque a concentraciones inferiores, es decir, alrededor de 0,02-0,06 µg/ml, también se han detectado plantaricinas de tipo K y N solamente en el cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214). Se han obtenido los mismos resultados mediante el uso de CDM, mosto de uva, suero de leche o extractos acuosos de frutas y de productos vegetales como sustratos para el cocultivo.

(2) Cinética de crecimiento de *Lactobacillus rossiae* DPPMA174 (DSM 23214)

Se ha cultivado *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) en medio de cultivo WFH con la adición de 2,5 µg/ml de plantaricina A purificada o sintetizada químicamente. En la Figura 3 se observa que la presencia de plantaricina A purificada dio como resultado una disminución notable del número de células, es decir, de $9,18 \pm 0,26$ (en condiciones de monocultivo) a $8,4 \pm 0,14$ log ufc/ml. Se han obtenido resultados similares mediante el uso de plantaricina A sintetizada químicamente. En ambos casos, se han observado resultados similares a los hallados para el cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214). El número de células de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) dañadas o muertas al llevar a cabo el cultivo en presencia de plantaricina A purificada o sintetizada químicamente ha sido significativamente mayor ($P < 0,05$) que para el monocultivo (alrededor de $8,80 \pm 0,14$ frente a $6,08 \pm 0,22$ log células/ml).

Los datos obtenidos muestran que el efecto inhibitorio de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) contra *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) resulta de la síntesis de plantaricina A y, probablemente, otras feromonas peptídicas que pertenecen a la misma clase química.

(3) Variación de los niveles de expresión de proteínas en *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214)

En comparación con el monocultivo, el análisis electroforético bidimensional de extractos citosólicos de *L. rossiae*

DPPMA174 (DSM 23214) cultivada en un cocultivo con *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) o en presencia de plantaricina A purificada ha mostrado la variación del nivel de expresión de 51 y 27 proteínas, respectivamente. Todas las proteínas hiper-expresadas en presencia de plantaricina A también se han hiper-expresado en condiciones de cocultivo. A modo de ejemplo, la Figura 4 muestra porciones de geles con respecto a condiciones de monocultivo, cocultivo con *L. plantarum* DC440 y monocultivo en presencia de plantaricina A purificada. Algunas de las proteínas más hiper-expresadas se han identificado mediante el uso de un análisis de espectrometría de masas, y se ha descubierto que están implicadas en la biosíntesis de proteínas (seril-tARN sintetasa), el metabolismo energético (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa, acetaldehído-CoA deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y β -fosfoglucomutasa), el catabolismo de proteínas y aminoácidos (Clp proteínasa dependiente de ATP y aminopeptidasa R), las respuestas a la tensión ambiental (GroEL, GroES, proteínas ribosómicas S2 y S5) y la homeostasis del potencial redox (NADH oxidasa). La mayoría de estas proteínas se ha identificado también en otras bacterias ácido lácticas como respuesta a condiciones de tensión ambiental y/o mecanismos de comunicación celular (Di Cagno et al., 2007. Cell-cell communication in sourdough lactic acid bacteria: a proteomic study in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Proteomics* 7:2430-2446). En particular, la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cataliza la liberación de un pentapéptido fratrídico en los mecanismos de muerte programada de células de *Escherichia coli* (Kolodkin-Gal et al., 2007. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazef-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318:652-655).

Los resultados obtenidos muestran que el efecto inhibitorio de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) como resultado de la síntesis de plantaricina A se basa en un mecanismo de comunicación celular y, probablemente, es adecuado para desencadenar respuestas que dan como resultado la muerte del microorganismo objetivo. Este resultado demuestra una valencia bactericida de la molécula señal.

(4) Ensayos en epidermis reconstruida y determinación TEER (resistencia eléctrica transepitelial)

Se ha ensayado una muestra de biomasa de cocultivo de *L. Plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) con una concentración de plantaricina A de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y una plantaricina A purificada obtenida de un cocultivo a la misma concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para el tratamiento de la epidermis humana reconstruida según el modelo SkinEthic®. Este modelo se ha usado y aceptado de manera generalizada por parte de la comunidad científica (Di Cagno et al., 2009. Synthesis of γ -amino butyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSMZ19463: functional grape must beverage and dermatological application. *Appl Biotechnol Microbiol* DOI: 10.1007/s00253-009-23704). Después de 24 horas de tratamiento, se han llevado a cabo las medidas de TEER. Este tipo de análisis, aceptado de manera generalizada por la comunidad científica internacional, analiza la corrosión del tejido tomando como referencia la integridad de la capa córnea y la función de barrera. En particular, mediante el uso de este análisis, es posible obtener información sobre la presencia de una estructura lamelar compacta a nivel de la capa córnea, uniones integrales firmes y grosor epidérmico. Estos factores en conjunto definen una función de barrera eficaz. La Figura 5 muestra que tanto en presencia de una biomasa que contiene plantaricina como con una plantaricina A purificada obtenida de un cocultivo, se da un incremento significativo ($P < 0,05$) del valor de TEER, por lo que se demuestra una actividad protectora de la molécula a nivel cutáneo. Se ha obtenido el mismo resultado mediante el uso de plantaricina A sintetizada químicamente.

Según el estado actual de la técnica, este es el primer ejemplo de aplicación de una feromona peptídica, implicada en mecanismos de comunicación celular en bacterias, adecuada para ser detectada por las células humanas de la epidermis, lo que da como resultado la estimulación de la función de barrera.

(5) Ensayos en células Caco-2/TC7

La viabilidad de las células Caco-2/TC7 se ha analizado como la capacidad de adsorción del colorante Rojo Neutro. En comparación con el medio DMEM (control negativo), la incubación durante 24 - 72 horas con plantaricina A purificada (2,5 $\mu\text{g/ml}$) incrementó notablemente la viabilidad de las células Caco-2/TC7 (Figura 6). Se ha obtenido el mismo resultado mediante el uso de plantaricina A sintetizada químicamente. No se ha observado la inducción con el tratamiento mediante el uso de una muestra obtenida de una fracción purificada de un monocultivo de *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) eluida según las mismas condiciones cromatográficas usadas para plantaricina A. Como se esperaba, la exposición de las células Caco-2/TC7 a interferón γ (IFN- γ) dio como resultado una disminución notable de la viabilidad ($P < 0,05$) (Figura 7). Al contrario, el efecto negativo de IFN- γ se elimina completamente en presencia de un tratamiento simultáneo con plantaricina A purificada o sintetizada químicamente. La adición de plantaricina A purificada dio como resultado un incremento notable ($P < 0,05$) de los valores de TEER para las células Caco-2/TC7 (Figura 8). Se ha observado el mismo resultado mediante el uso de células Caco-2/TC7. En comparación con el medio DMEM, la adición de IFN- γ redujo significativamente los valores de TEER ($P < 0,05$). Sin embargo, la adición de plantaricina A purificada o sintetizada químicamente también eliminó en este caso los efectos negativos.

Las células Caco-2/TC7 son uno de los sistemas más usados *in vitro* para simular la mucosa intestinal. Aunque de origen neoplásico, dichas células son adecuadas para diferenciarse espontáneamente en enterocitos maduros y expresar enzimas del borde en cepillo. En condiciones de cultivo, las células Caco-2/TC7 son adecuadas para desarrollar características morfológicas y funcionales, que incluyen uniones intercelulares firmes, cuya integridad se determina mediante las determinaciones de TEER (Sambuy et al., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the

intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Cao-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21:1-26). Los resultados de este estudio demuestran que la plantaricina A obtenida de un cocultivo purificado de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) o sintetizada químicamente es adecuada para estimular la función de barrera de la mucosa intestinal y para prevenir los efectos negativos de los tratamientos con interferón γ .

(6) Desarrollo de un protocolo biotecnológico para la síntesis de plantaricina A y uso de la misma en el campo dermatológico

Como se resumió anteriormente en otra parte del texto, se ha desarrollado un proceso biotecnológico para la síntesis de plantaricina A y el uso de la misma en el campo dermatológico. Dicho proceso comprende:

a) el cultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) en cultivo puro en un medio de cultivo mMRS;

b) la recogida de células, el lavado, la resuspensión en WFH, CDM, mosto de uva, suero de leche o extractos acuosos vegetales o de frutas que se integran de manera adecuada para la disponibilidad de nutrientes como medio de cultivo;

c) la incubación del cocultivo durante 18 - 24 horas, preferiblemente durante 24 horas a 30 - 37 °C, preferiblemente 30 °C;

d) la separación de las células mediante centrifugación. Según una variante del proceso, la preparación puede contener además células de bacterias ácido lácticas;

e) la deshidratación de la preparación mediante un proceso de secado o liofilización;

f) la producción de una preparación dermatológica.

Ejemplo 2: *Estudio sobre el efecto de la biomasa según la invención y Plantaricina A en la cicatrización de heridas*

Método

Se han incubado queratinocitos humanos cultivados con Plantaricina A (2,5 $\mu\text{g/ml}$) o una biomasa que contiene Plantaricina A durante 1 hora.

Al final de la incubación, las células se han lavado y se ha restablecido el medio de cultivo.

Cicatrización de heridas

El ensayo consiste en llevar a cabo una interrupción mecánica de la continuidad de la monocapa celular para analizar si el efecto del tratamiento favorece o no la capacidad de los queratinocitos de migrar más allá del borde de la lesión, y por lo tanto "cicatrizan la lesión".

Para este fin, la monocapa de queratinocitos, tratada como se describió anteriormente, se incubó a lo largo de otras 24 horas tras la aplicación del estímulo, y después se fijó y se tiñó mediante el uso de tinción de hematoxilina/eosina. Las imágenes se han observado con un microscopio óptico mediante el uso de un objetivo 5X.

Para cada imagen, se han detectado y calculado los límites de la migración celular máxima y la distancia o hueco entre ellos, respectivamente (Fig. 9-10).

Resultados

En la Figura 9, se informan los resultados del ensayo de cicatrización de heridas. Tras una incubación de 24 horas después de la interrupción de la continuidad celular, la monocapa de queratinocitos sin estimular (control) muestra algunas células que se extienden desde los márgenes de la herida. La migración celular, sin embargo, es especialmente evidente cuando las células se estimulan con ácido hialurónico. En este caso, de hecho, el hueco de la lesión es más estrecho que para las células sin tratar (control), lo que evidencia la capacidad de la migración celular para la cicatrización de heridas.

Para estimar analíticamente la capacidad de migración celular, los márgenes de las heridas se han delineado, medido y analizado como se informa en la Fig. 10.

Los queratinocitos incubados con Plantaricina A o la biomasa que contiene Plantaricina A reducen el hueco entre los márgenes de las heridas en comparación con las células de control, y el porcentaje de incremento de cicatrización en comparación con el control se informa en la Fig. 11.

Sistema de Ensayo: epidermis humana reconstruida

El modelo de epidermis usado lo produce SkinEthic® Laboratories, Niza (Francia), y se usa como una muestra de

0,5 cm² del día 17º de diferenciación con un grosor medio del lote de 120 µm (capa córnea y epidermis vital).

La epidermis completamente diferenciada se obtiene de queratinocitos humanos cultivados en un medio químicamente definido (MCDB 153) sin adición de suero de ternero, sobre un soporte inerte de policarbonato poroso en una interfase aire-líquido a lo largo de 17 días; en esta etapa de diferenciación, el análisis morfológico muestra una epidermis vital multicapa y una capa córnea que consiste en más de 10 capas celulares compactas.

DETERMINACIÓN TEER

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) es una medida directa de la funcionalidad de la barrera cutánea: refleja la resistencia del tejido en conjunto que resulta del grosor y la estructura. Refleja la integridad de los contactos intercelulares a nivel de unión firme, la estructura lipídica bilamelar que protege de la penetración de sustancias del exterior.

TEER es un ensayo validado en la U.E. - *resistencia eléctrica en piel de rata* (B 40) - con parámetros discriminantes del ensayo para el análisis de la corrosividad que considera como criterios de valoración la integridad de la capa córnea y la función de barrera.

Es inversamente proporcional a TEWL, tal como se mide *in vivo*, que es la medida de la pérdida de agua transepidérmica: una TEWL mayor corresponde a una alteración mayor de la función de barrera, mientras una TEER mayor corresponde a una alteración menor de la función de barrera.

Sobre el inserto se dosifica 1 ml de PBS y se mide la resistencia eléctrica trans-epitelial mediante el uso de un instrumento Millicell-ERS (intervalo 0-20 kΩ).

Se han llevado a cabo diversas medidas para cada tejido.

La Figura 5 muestra los valores de TEER con respecto a una media para 3 tejidos, y se llevan a cabo 3 determinaciones para cada una.

Con respecto al valor de TEER, son importantes las siguientes propiedades: la presencia de una estructura compacta lamelar a nivel de la capa córnea, uniones firmes integrales y un grosor epidérmico que en conjunto definen una función de barrera eficaz. Cada tejido se toma como referencia con determinaciones a t=0 y t=24 horas.

Los resultados obtenidos son especialmente interesantes, de hecho es evidente un incremento notable de TEER tanto en presencia de Plantaricina A como de una biomasa que contiene Plantaricina A.

Este incremento es una consecuencia directa del incremento del grosor epidérmico y una mejor compactibilidad e integridad de la capa córnea a nivel de las uniones firmes.

Ejemplo 3: *Plantaricina A: estudio sobre el papel de la misma para el mantenimiento y el restablecimiento de la función de barrera cutánea*

El estudio se basa en el uso de Plantaricina A obtenida de un cocultivo de *L. plantarum* DC400 (DSM 23213) y *L. rossiae* DPPMA174 (DSM 23214) para conseguir los objetivos siguientes:

Análisis de los efectos de la biomasa sobre la *reparación de heridas*, por medio del estudio de los efectos sobre la migración y la proliferación de una monocapa de queratinocitos humanos (NCTC2544) en comparación con un control positivo (células sin tratar) y un control de actividad conocida negativa/disponible comercialmente. Los tratamientos se llevarán a cabo a diferentes concentraciones de la presente Plantaricina (tras la determinación mediante el uso de un ensayo de citotoxicidad) en tres momentos sucesivos (24, 48, 72 horas).

El análisis de la respuesta al daño celular, en los momentos y concentraciones consideradas, estudiando la modulación con mediadores como IL-8, KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), TGF-β1 (factor de crecimiento transformante-β), en comparación con un control positivo (células sin tratar) y un control de actividad conocido negativo/comercialmente disponible, por medio de PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

La línea celular usada es una línea celular de queratinocitos humanos NCTC 2544 (Perry, V.P., Sanford, K.K., Evans, V.J., Hyatt, G.W., Earle, W.R., 1957. Establishment of clones of epithelial cells from human skin. J Natl Cancer Inst. 18 (5): 709-717) cultivada en matraces estériles, incubada a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ en un medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo) con la adición de un 10% de suero de ternero (FBS), L-glutamina 2 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, en presencia de un 1% de penicilina y estreptomicina. Las células crecen *in vitro* adhiriéndose a la superficie de la placa de cultivo en forma de una monocapa.

ESTUDIO SOBRE LA CURA DEL DAÑO TISULAR A LO LARGO DEL TIEMPO POR MEDIO DE LA

CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

Principio del método:

El experimento implica en primer lugar el desarrollo de una monocapa de células confluentes. Sucesivamente, se lleva a cabo un corte, y el "hueco" generado se observa mediante el uso de un microscopio a medida que las células que se mueven gradualmente reparan la lesión.

Este proceso de cicatrización puede durar desde varias horas hasta más de un día, dependiendo de la línea celular, las condiciones y el grado de la herida.

Procedimiento experimental

- Se colocan en placas células NCTC 2544 y se cultivan a 37 °C, con un 5% de CO₂ durante 24 horas.
- Después de 24 horas, el medio de cultivo completo se sustituye por medio sin suero para evitar el efecto del suero sobre la proliferación celular, y las células se incuban durante otras 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂.
- Después de 24 horas, la monocapa celular se lesiona mecánicamente rozándola levemente con una punta de pipeta de 200 µl siguiendo la trayectoria de una línea horizontal de ~ 1 mm de anchura. Después se lava la monocapa y, tras la adición de las sustancias a ensayar, las placas se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante 72 horas.
- El efecto de las sustancias sobre la motilidad celular se analiza mediante el uso de un microscopio invertido de contraste de fases, tomando imágenes en diversos momentos de análisis seleccionados de manera oportuna.
- La cura de la lesión se determina midiendo el área clara entre los dos frentes de migración del corte a las 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas tras el corte, mediante el uso de un programa informático de procesamiento de imágenes (Leica Application Suite).
- Todos los datos para cada experimento se procesan estadísticamente en Excel para las determinaciones a las 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas.

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL DAÑO CELULAR MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-8, KGF, TGF-β CON EL USO DE PCR EN TIEMPO REAL

El procedimiento consiste en 3 etapas fundamentales:

I. Extracción del ARN total de las células

II. Retro-transcripción a cADN

III. PCR en tiempo real

I. Extracción del ARN total de las células

Se usa una línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos NCTC 2544, mantenida en matraces de cultivo, incubada a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ en un medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo) con la adición de un 10% de suero de ternero (FBS), glutamina 2 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, en presencia de un 1% de penicilina y estreptomycin. La línea celular se rasgará mediante el uso de una punta de pipeta de 200 µl y se aplicaron tratamientos en diferentes momentos y concentraciones.

II. Retro-transcripción del ARN

El proceso incluye la amplificación de muestras de ARN extraído mediante el uso del Kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystem).

III. PCR en Tiempo Real

El proceso incluye la amplificación de cADN mediante el uso de un ensayo específico Taqman Gene y un kit "TaqMan Universal PCR Master Mix with Amperease UNG 2X" (Applied Biosystem).

Se usará una cuantificación de tipo relativo para determinar una posible variación de la expresión génica de interés con respecto a un control positivo (células sin tratar) por medio de un gen constitutivo para la normalización y el análisis de los datos según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RESULTADOS

Cicatrización de heridas

Se ha analizado la capacidad de la Plantaricina obtenida de un cocultivo de modificar la migración de queratinocitos humanos NCTC 2544 mediante un ensayo de cicatrización de heridas.

- 5 El estudio también se ocupó del análisis comparativo de los efectos de la Plantaricina sintética y obtenida de un cocultivo de *L. plantarum* DC400 y *L. rossiae* DPPMA174.

Después de llevar a cabo un corte en la monocapa celular mediante el uso de una punta de pipeta de 200 µl y eliminar completamente las células del hueco entre las dos líneas del corte, dichas células se tratan con Plantaricina sintética y obtenida de un cocultivo a las siguientes concentraciones: 0,1 - 1 - 10 µg/ml. También se han ensayado por duplicado controles positivos y negativos (conectivina a 100 µg/ml).

- 10 Se han tomado imágenes de la misma área del corte a tiempo 0 y después de 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, para monitorizar la migración celular en el área del corte.

Las Figuras 12-16 muestran el análisis temporal del efecto de la Plantaricina cocultivada (0,1, 1 y µg/ml) (a) y sintética (0,1, 1 y µg/ml) (b) sobre la migración de la línea celular NCTC 2544.

- 15 La Figura 12 muestra la progresión de la cicatrización ($\Delta\mu\text{m}/\text{tiempo}$) en cada momento considerado (a un intervalo de 4 horas) para ambas sustancias activas ensayadas y los controles positivos y negativos.

- 20 Durante las etapas iniciales de la cicatrización celular, no es posible detectar diferencias significativas a tiempo 0 en la migración celular entre los controles y las sustancias activas ensayadas. Como es evidente en la Figura 12a, la Plantaricina cocultivada a una concentración de 0,1 y 1 µg/ml no es adecuada para acelerar notablemente la migración celular en comparación con el control. El efecto ya es significativo 4 horas después del corte, y permanece constante y significativo hasta las 72 horas. Los tratamientos con Plantaricina cocultivada a una concentración de 10 µg/ml producen en su lugar una cura del daño tisular comparable al control positivo, es decir, células no tratadas, para todos los intervalos de tiempo considerados.

- 25 Un experimento similar llevado a cabo con un tratamiento de células durante el mismo periodo de tiempo a concentraciones equivalentes de Plantaricina sintética demostró que también en este caso los tratamientos con Plantaricina (sintética) tienen una capacidad mayor de acelerar la migración celular en las dos líneas del corte en comparación con el control negativo.

En particular, también en este caso, durante las etapas iniciales de la cicatrización celular, no es posible detectar diferencias significativas a tiempo 0 en la migración celular para los dos controles usados y las dos sustancias activas en estudio.

- 30 La Figura 12b muestra que la Plantaricina sintética a una concentración de 0,1 y 10 µg/ml, respectivamente, produce un incremento de la migración celular mayor que los controles positivos y negativos, ya 4 horas tras el corte, y permanece constante para todos los intervalos de tiempo considerados hasta 72 horas. Los tratamientos con Plantaricina sintética a una concentración de 10 µg/ml producen en su lugar una cura del daño tisular comparable a los controles positivos y negativos. Para comprender más completamente y analizar los efectos de los tratamientos con Plantaricina cocultivada y sintética con respecto a los controles positivos y negativos en todos los intervalos de tiempo considerados, se han analizado estadísticamente las medidas obtenidas del análisis de imágenes.

- 40 Las Figuras 13 y 14 informan de los datos como porcentaje de células migradas a través de las dos líneas del corte en comparación con el control positivo para los tratamientos con Plantaricina cocultivada (Fig. 13) y sintética (Fig. 14), respectivamente. Además, los resultados se informan como porcentajes del área para las dos líneas del corte y las áreas iniciales, respectivamente (Fig. 15-16).

- 45 Los gráficos informados en las Figuras 13 y 14 muestran los datos relacionados con los porcentajes de células migradas durante diversos intervalos de tiempo considerados para los controles positivos y negativos, Plantaricina cocultivada (0,1-1 y 10 µg/ml) y sintética (0,1-1 y 10 µg/ml), respectivamente. De acuerdo con los datos obtenidos del procesamiento de imágenes, tras las primeras 8 horas de tratamiento, el control negativo no persiste en su actividad de cicatrización del corte y presenta un porcentaje de células migradas similar al control positivo.

Como para la Plantaricina cocultivada (Figura 13), en términos generales es posible afirmar que, a las tres concentraciones de tratamiento usadas, es posible perfilar un incremento mayor de la migración celular desde el tiempo 0 hasta las 72 horas de tratamiento, también en el tratamiento a la concentración más baja.

- 50 En particular, los tratamientos con Plantaricina cocultivada a una concentración de 10 µg/ml muestran valores de porcentaje de migración más altos para todos los intervalos de tiempo considerados, excepto tras 72 horas de tratamiento, pero estos datos no son significativos con los valores de porcentaje de células migradas del 165,56%, 138,18%, 134,64%, 118,08%, 139,07% y 149,04%, respectivamente.

La Figura 14 muestra el porcentaje de células migradas tras el tratamiento en diversos intervalos de tiempo considerados, a concentraciones equivalentes de Plantaricina sintética.

El tratamiento con Plantaricina sintética a una concentración de 0,1 µg/ml produce los valores de porcentajes más altos de células migradas para todos los intervalos de tiempo considerados, con valores desde el tiempo inicial hasta las 72 horas de tratamiento del 158,30%, 115,15%, 124,32%, 141,82%, 141,91% y 128,51%, respectivamente. El tratamiento con Plantaricina sintética a una concentración de 10 µg/ml da como resultado un porcentaje de células migradas para todos los intervalos de tiempo considerados, en comparación con un tratamiento con la misma sustancia activa a una concentración de 0,1 µg/ml, pero al mismo tiempo da como resultado un incremento mayor del porcentaje de células migradas en comparación con el control negativo después de 8 hasta 72 horas de tratamiento con un incremento del porcentaje de + 4,62%, +20,28%, +14,84% y +7,47%, respectivamente. Al contrario, el tratamiento con Plantaricina sintética a una concentración de 1 µg/ml produce un incremento mayor del porcentaje de células migradas en comparación con el control negativo solamente tras 12 y 24 horas de tratamiento, con valores de porcentaje del +9,86% y 15,48%, respectivamente.

Aunque el tratamiento de las células con las mismas concentraciones de Plantaricina cocultivada y sintética no da como resultado un incremento del porcentaje de células migradas mayor que el control negativo en todos los intervalos de tiempo considerados, la comparación de los resultados de los ensayos de cicatrización de heridas en queratinocitos humanos NCTC 2544 tratados con Plantaricina cocultivada con los de la Plantaricina sintética en las mismas condiciones permitió demostrar que la Plantaricina cocultivada tiene un efecto mayor sobre la migración celular a través del área del corte generado en comparación con el control negativo considerado. El gen de TGFβ1 es el más implicado en el proceso de cicatrización.

Entre todos los tiempos considerados para la monitorización de la cicatrización de heridas, se ha llevado a cabo el análisis de la expresión génica tras 8 horas de tratamiento como confirmación de los datos obtenidos del análisis de la cicatrización.

Los resultados obtenidos resumen y confirman el efecto notable de la conectivina sobre la cicatrización.

Con respecto a los datos sobre la Plantaricina sintética, se señala que la expresión génica se incrementa notablemente incluso si es posible demostrar que a las mismas concentraciones (1 y 10 µg/ml) la Plantaricina cocultivada estimula un incremento mayor de la expresión génica, una confirmación adicional del efecto de la biomasa.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Giuliani SpA
- 5 <120> Proceso para la preparación de una biomasa que comprende plantaricina y usos de la misma en el campo médico
- <130> PCT28086
- 10 <150> RM2010A000004
<151> 12-01-2010
- <160> 1
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 26
<212> PRT
- 20 <213> Lactobacillus plantarum
- <400> 1
Lys Ser Ser Ala Tyr Ser Leu Gln Met Gly Ala Thr Ala Ile Lys Gln
1 5 10 15
Val Lys Lys Leu Phe Lys Lys Trp Gly Trp
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso biotecnológico para la síntesis de una biomasa que comprende o que consiste en al menos una plantaricina seleccionada de las plantaricinas A, K o N, o mezclas de las mismas, y las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214, y dicho proceso comprende o consiste en las siguientes etapas:
 - a) propagación del cultivo de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214;
 - b) coinoculación de un sustrato seleccionado del grupo que consiste en medio químicamente definido, hidrolizado de harina de trigo, mosto de uva, suero de leche o extractos de frutas y de productos vegetales, con una suspensión acuosa de bacterias ácido lácticas como se definió en la etapa a);
 - c) incubación; y, opcionalmente,
 - d) centrifugación del caldo de cultivo para eliminar las células de bacterias ácido lácticas.
2. Un proceso biotecnológico para la preparación de una o más plantaricinas seleccionadas de las plantaricinas A, K o N o mezclas de las mismas, y dicho proceso comprende o consiste en las siguientes etapas:
 - a) propagación del cultivo de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214;
 - b) coinoculación de un sustrato seleccionado del grupo que consiste en medio químicamente definido, hidrolizado de harina de trigo, mosto de uva, suero de leche o extractos de frutas y de productos vegetales, con una suspensión acuosa de bacterias ácido lácticas como se definió en la etapa a);
 - c) incubación; y, opcionalmente,
 - d) centrifugación del caldo de cultivo para eliminar las células de bacterias ácido lácticas.
3. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la densidad celular de la suspensión de la etapa a) es de alrededor de 9,0 Log ufc/ml para cada especie de bacteria ácido láctica, y se añade al sustrato en un porcentaje que oscila del 1 al 4% respecto del volumen de sustrato.
4. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura de 30 a 37 °C, preferiblemente 30 °C, durante 18 - 24 horas, preferiblemente 18 horas.
5. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la centrifugación se lleva a cabo a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C.
6. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa e) para la deshidratación del sobrenadante obtenido en la etapa d) mediante medios de secado o liofilización.
7. Una biomasa obtenible u obtenida por medio del proceso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y dicha biomasa comprende o consiste en al menos una plantaricina seleccionada de las plantaricinas A, K o N, o mezclas de las mismas, y las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 y *Lactobacillus rossiae* DSM 23214.
8. Una composición farmacéutica que comprende o que consiste en la biomasa como se definió en la reivindicación 7, como principio activo, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
9. Una composición cosmética que comprende o que consiste en la biomasa como se definió en la reivindicación 7, como principio activo, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
10. El uso de la biomasa como se definió en la reivindicación 7 o la composición como se definió en la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la alteración de la función de barrera de la epidermis o de la pared intestinal.
11. El uso de la biomasa como se definió en la reivindicación 7 o la composición como se definió en la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para la cicatrización de heridas.
12. Las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* DSM 23213 o *Lactobacillus rossiae* DSM 23214 o una mezcla de las mismas.
13. El uso de una o más plantaricinas seleccionadas de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la alteración de la función de barrera de la epidermis o de la pared intestinal.

14. El uso de una o más plantaricinas seleccionadas de las plantaricinas A, K o N, preferiblemente A, para la preparación de un medicamento para la cicatrización de heridas.

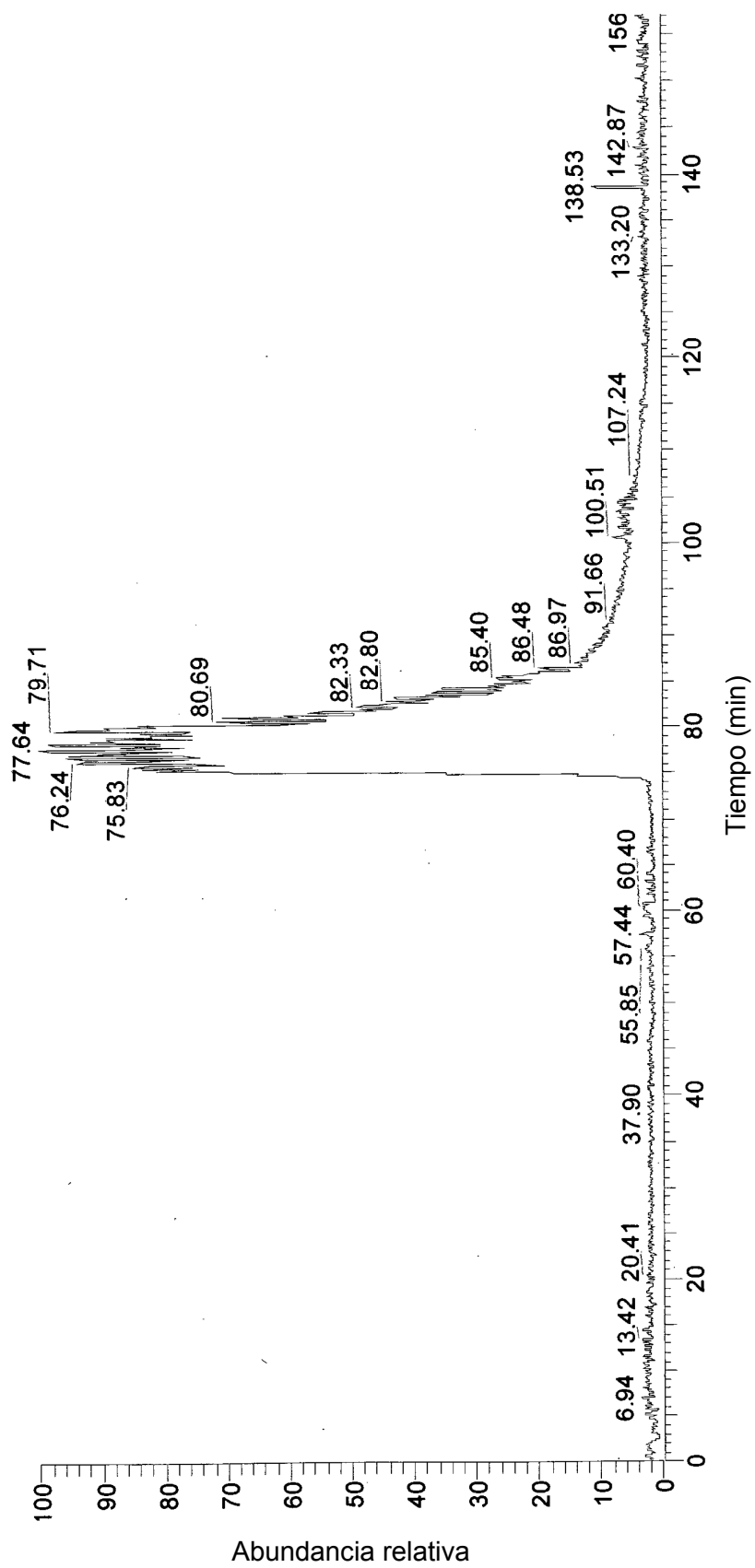
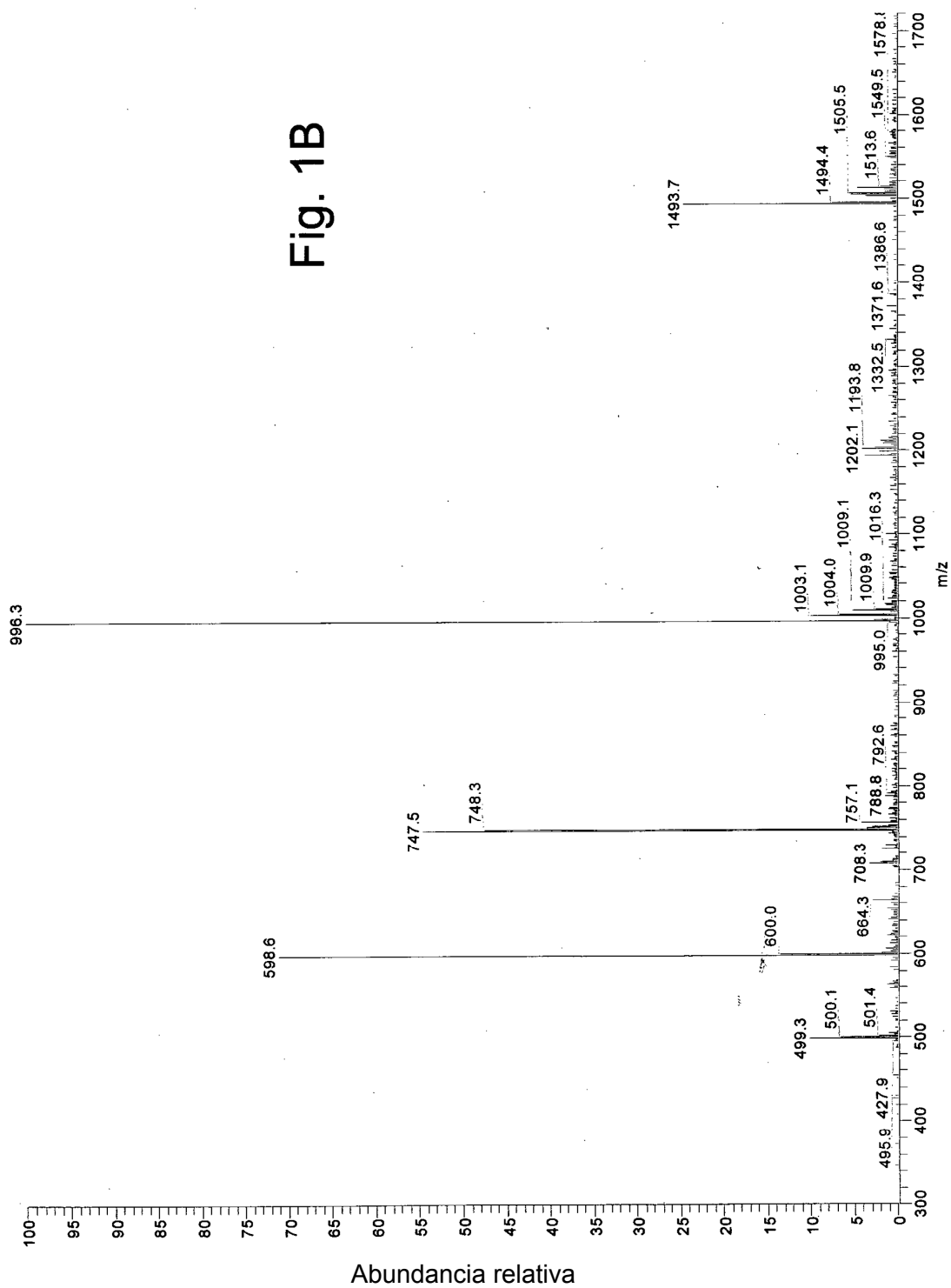


Fig. 1A

Fig. 1B



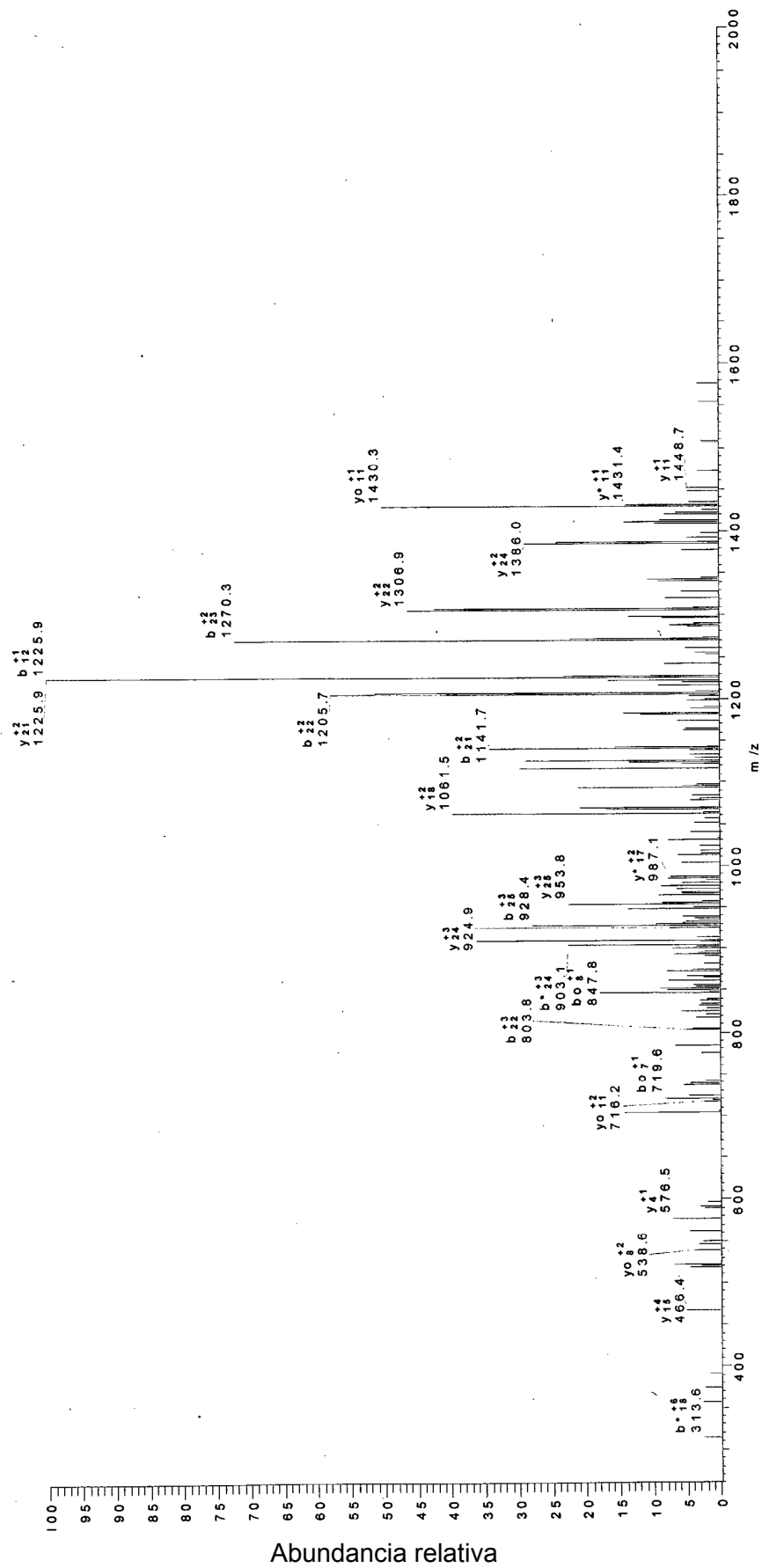


Fig. 1C

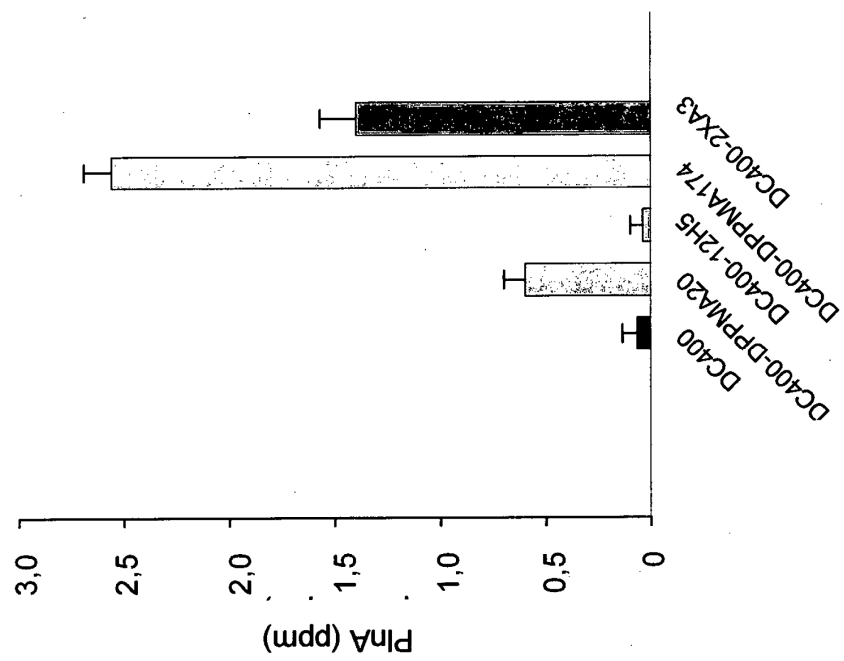


Fig. 2

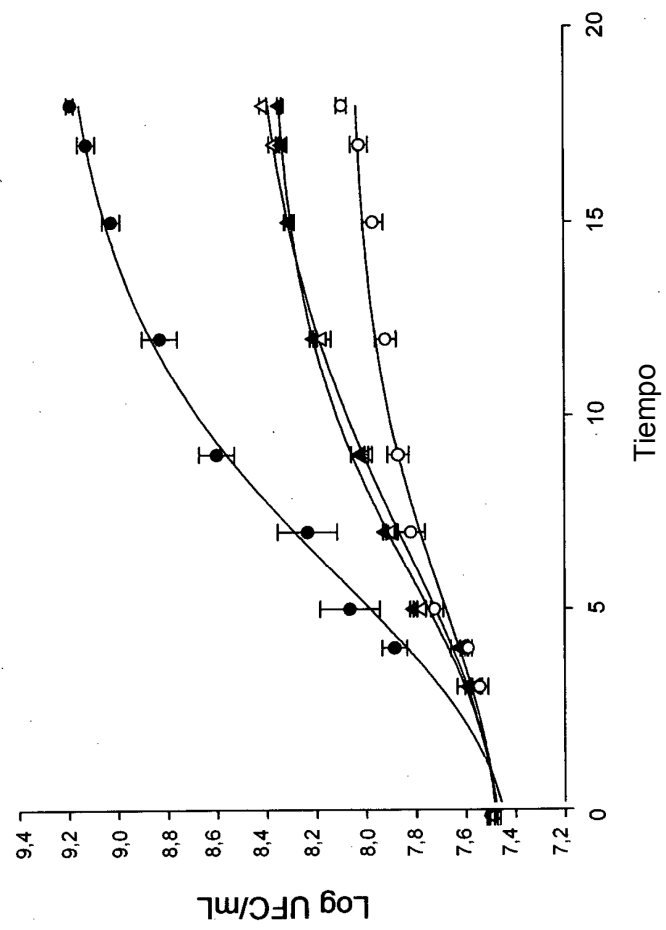


Fig. 3

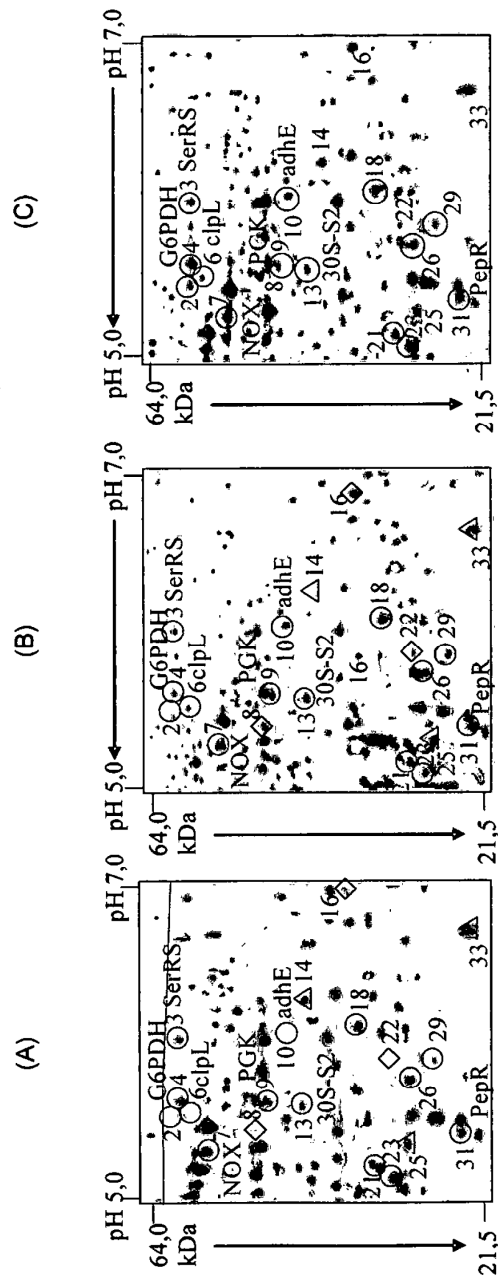


Fig. 4

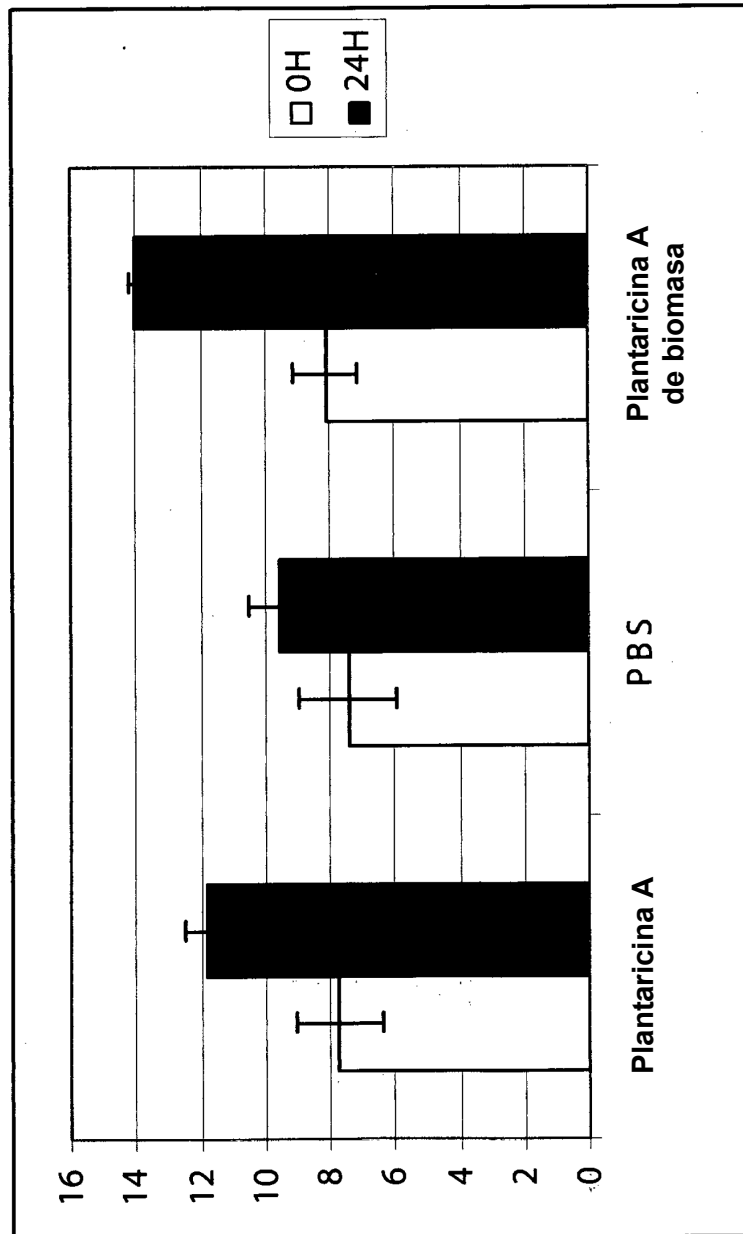
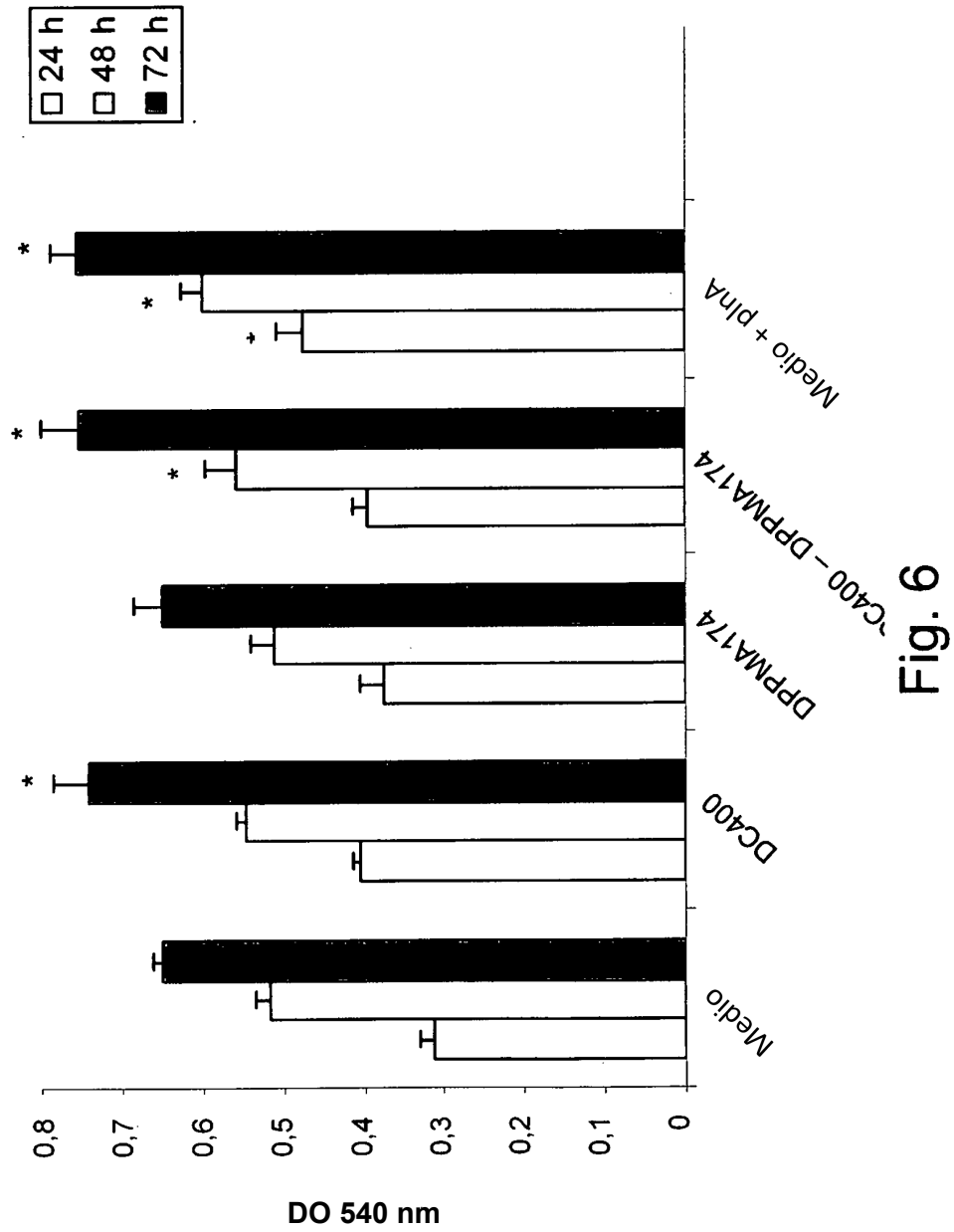
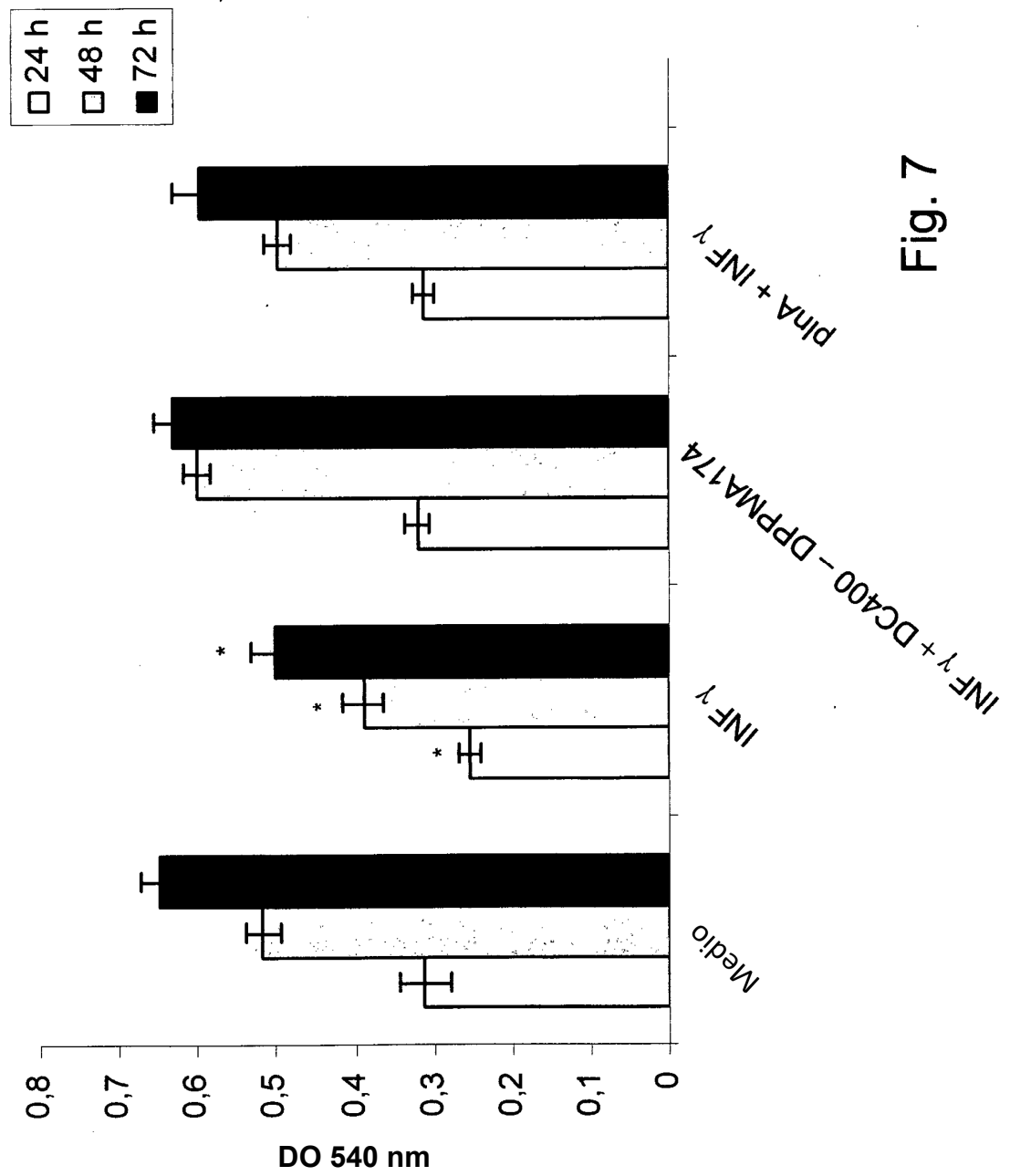


Fig. 5





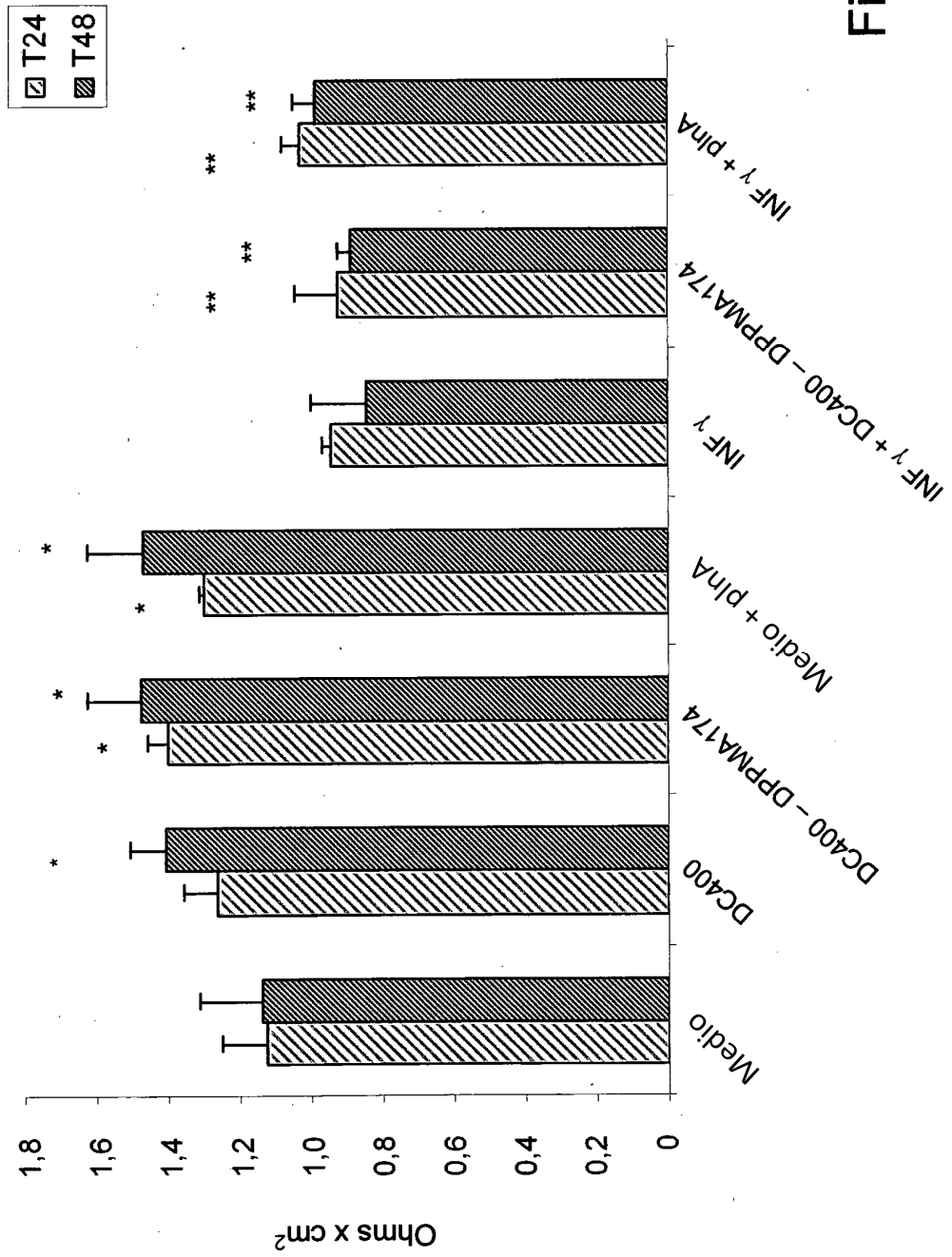


Fig. 8

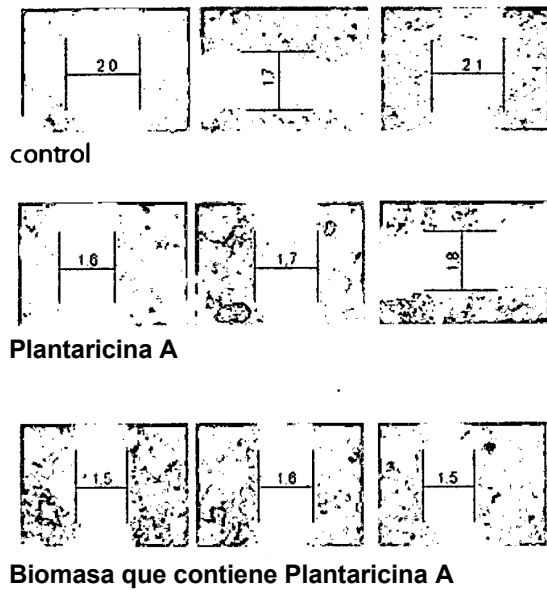


Fig. 9

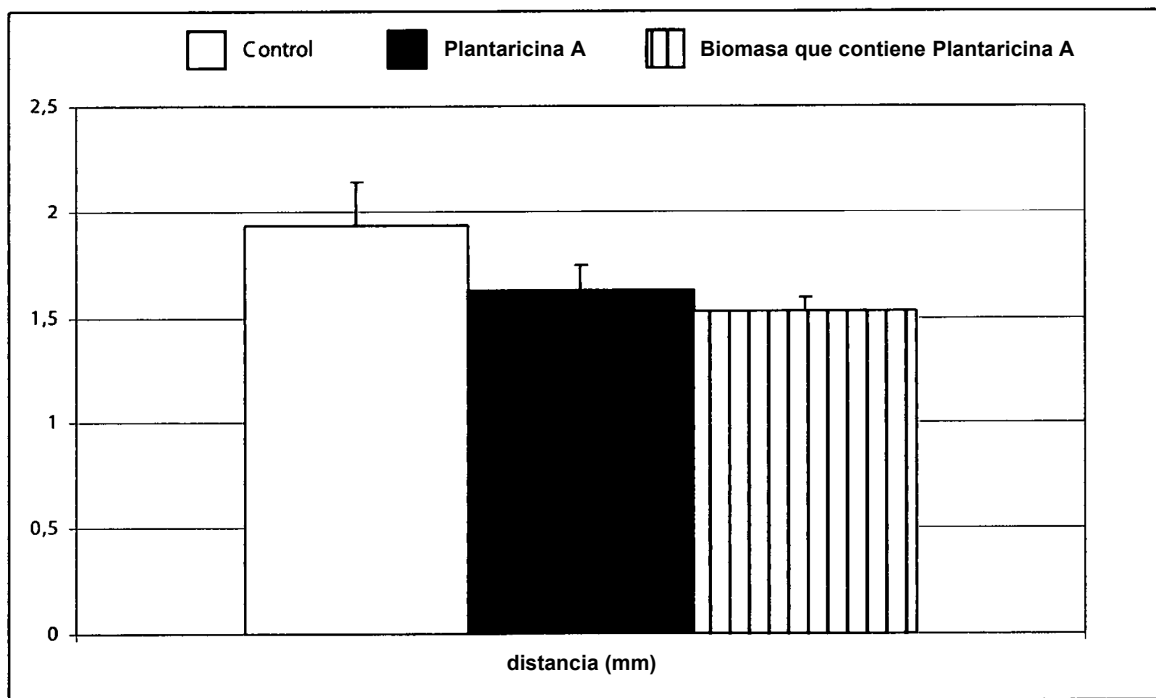


Fig. 10

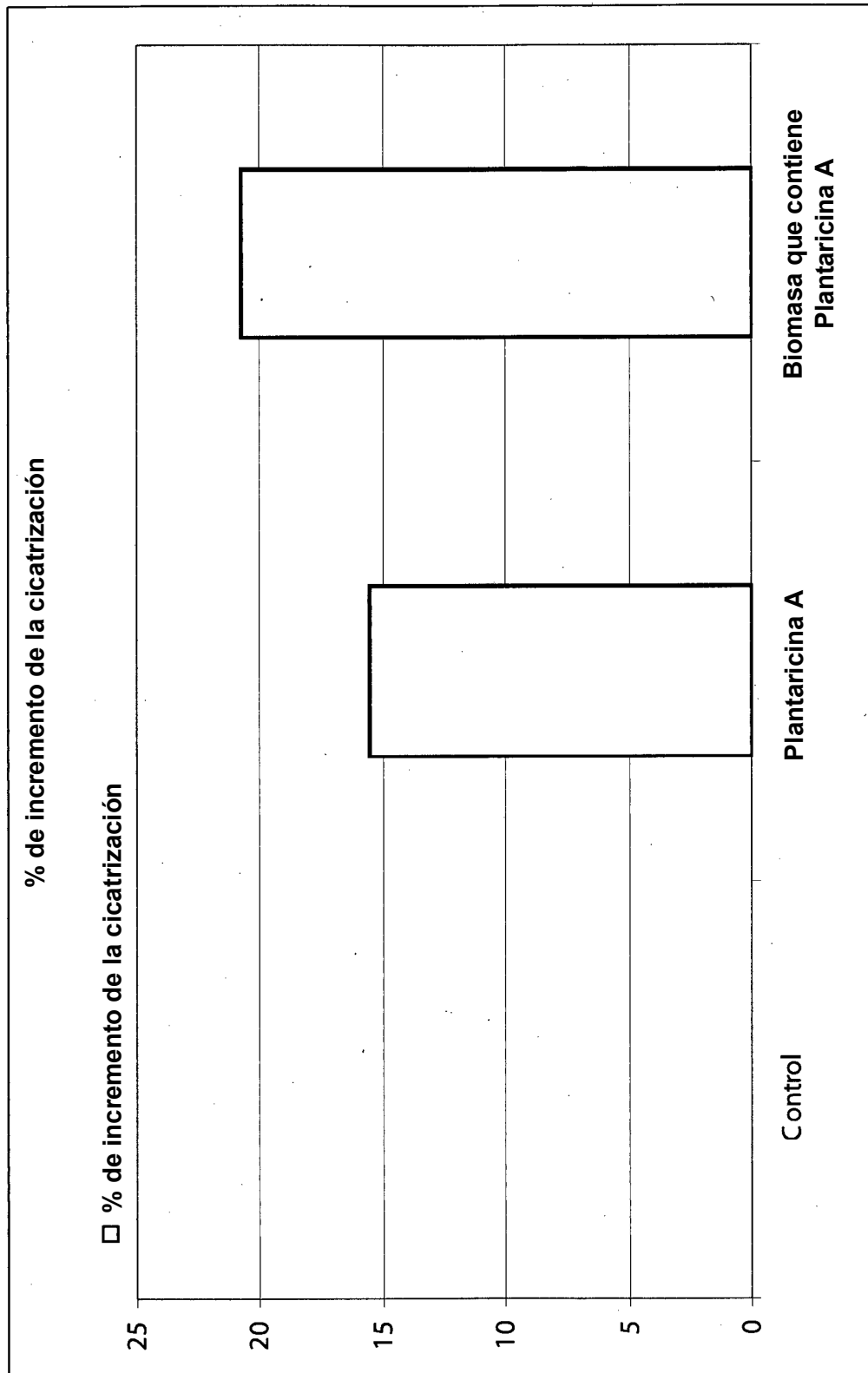


Fig. 11

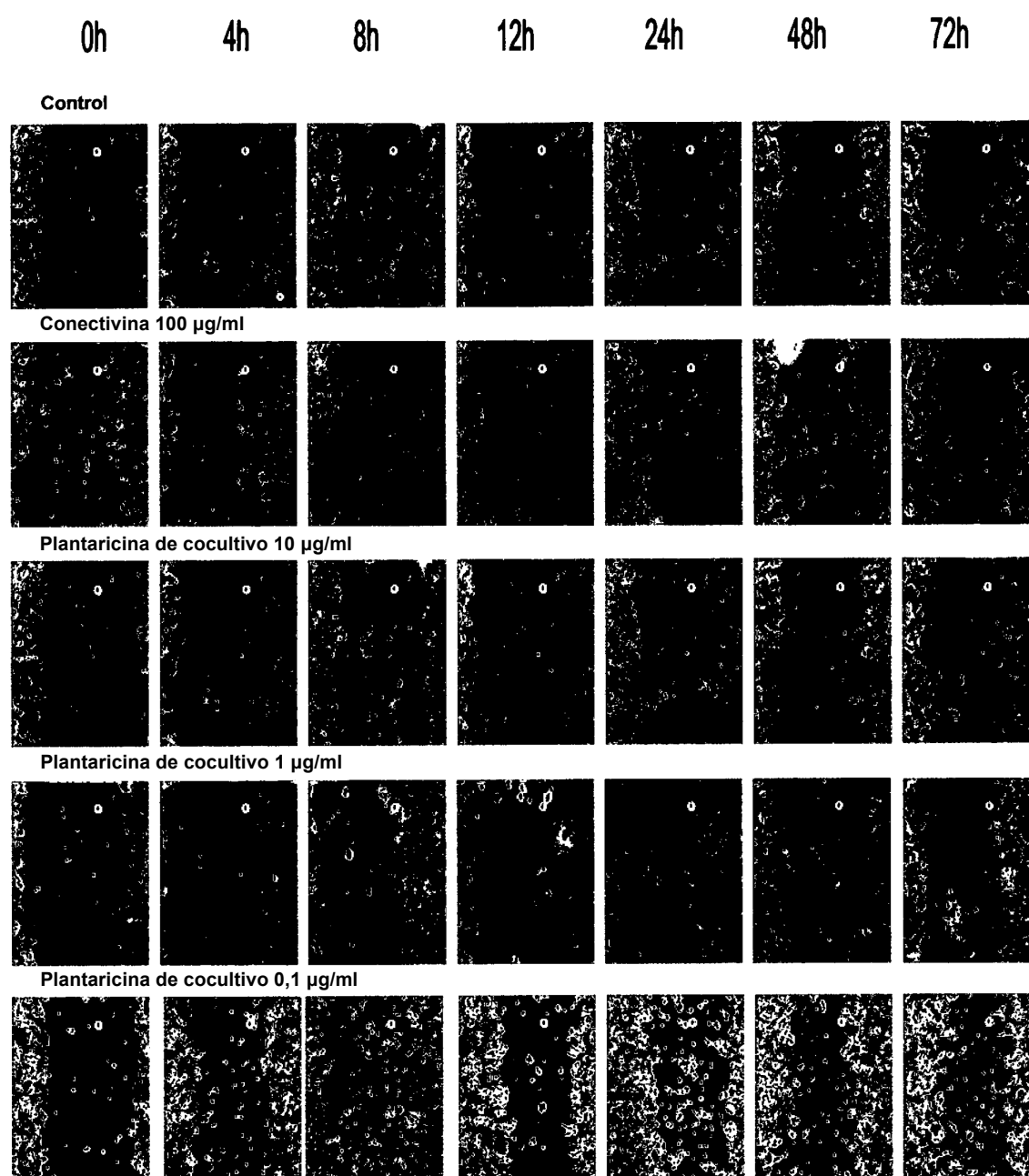


Fig. 12 a

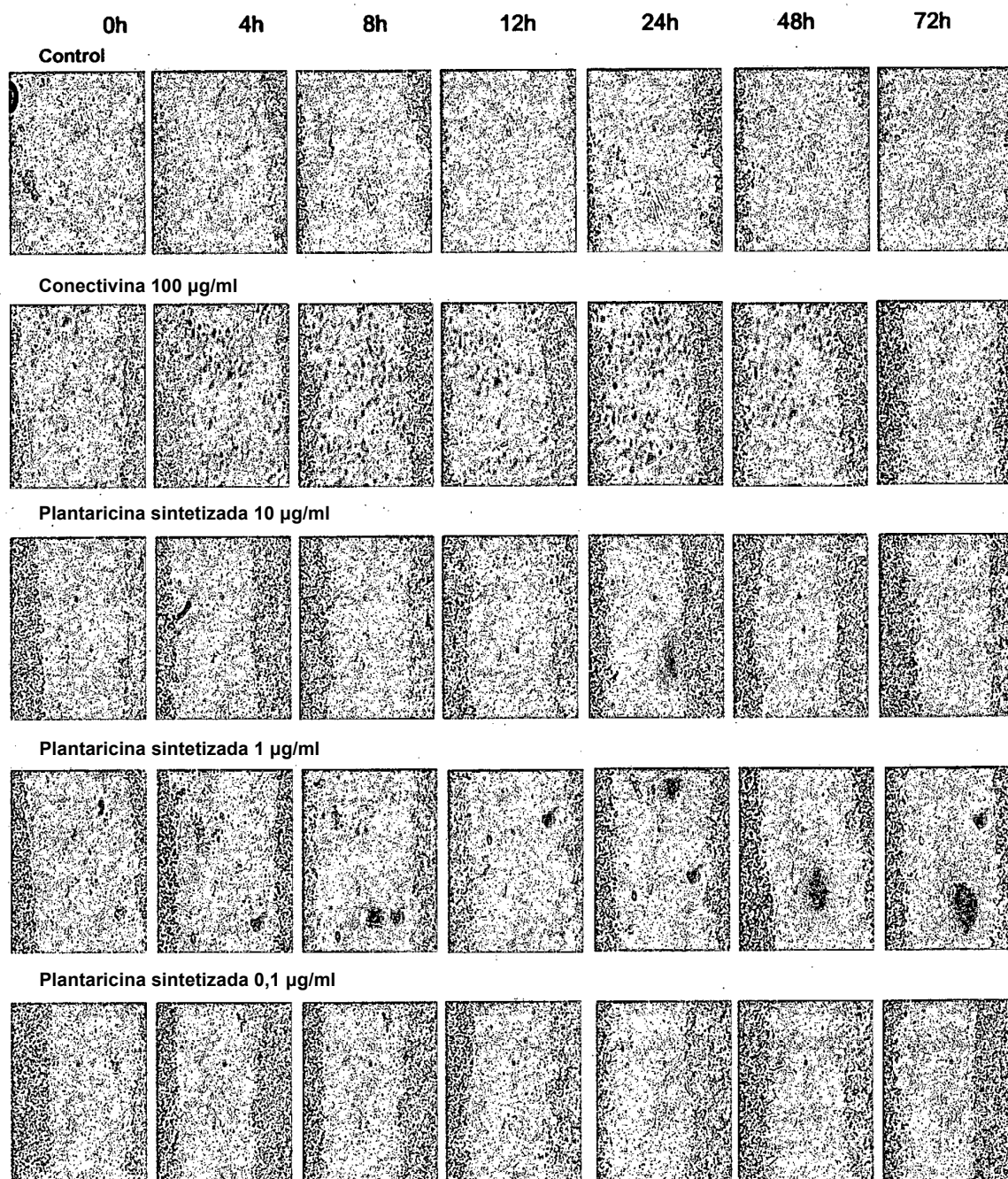
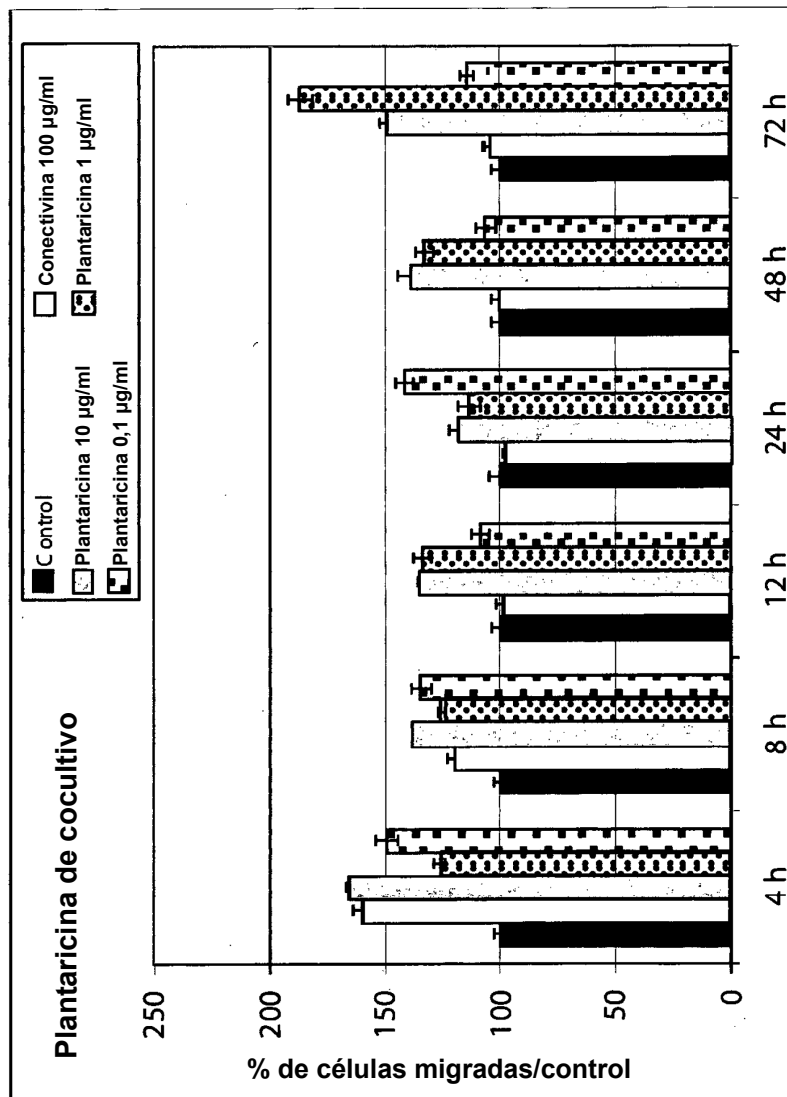
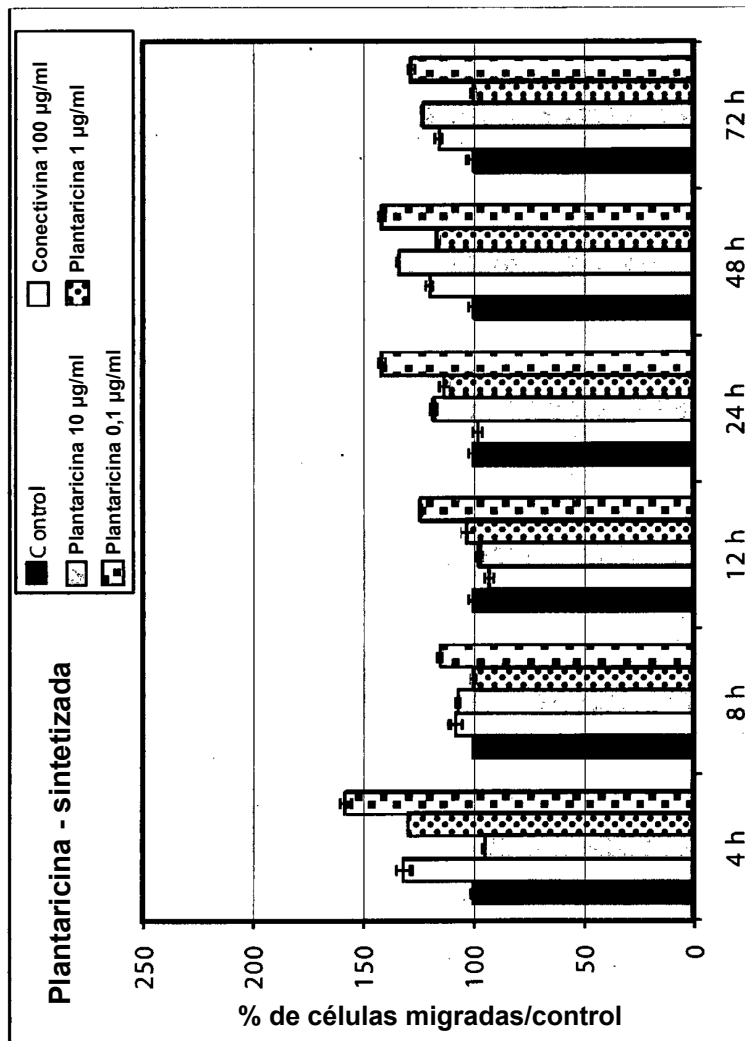


Fig. 12 b



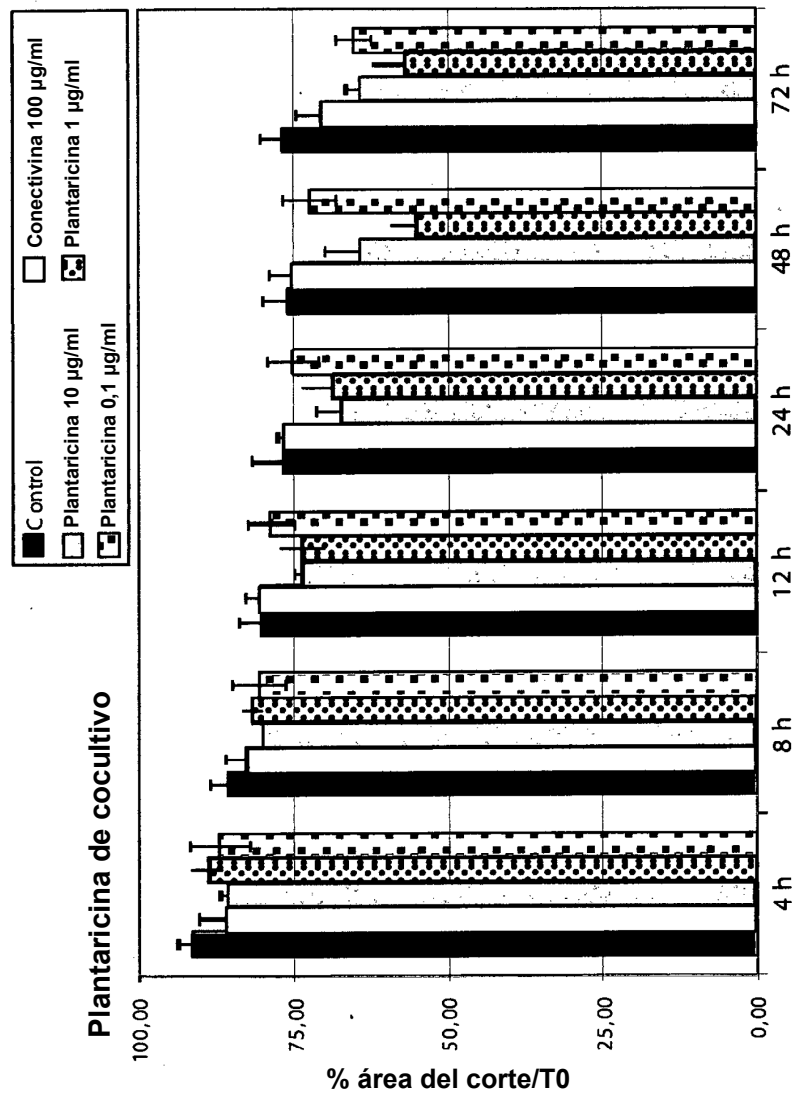
PLANTARICINA - SOBRENADANTE		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Control		100 ±2,418	100 ±3,065	100 ±3,552	100 ±4,997	100 ±3,837	100 ±3,367
Conectivina							
100 µg/ml		159,93 ±4,219	119,49 ±3,381	99,19 ±2,267	97,80 ±0,973	99,78 ±0,617	97,80 ±0,973
Plantaricina							
10 µg/ml		165,56 ±1,334	138,18 ±0,026	134,64 ±1,312	118,08 ±4,002	139,07 ±5,597	118,08 ±4,002
Plantaricina							
1 µg/ml		126,44 ±2,598	125,68 ±1,580	133,83 ±3,605	113,28 ±4,887	133,04 ±4,037	113,28 ±4,887
Plantaricina							
0,1 µg/ml		149,78 ±4,863	134,50 ±4,240	108,77 ±3,676	141,82 ±4,073	106,36 ±4,368	141,81 ±4,073

Fig. 13



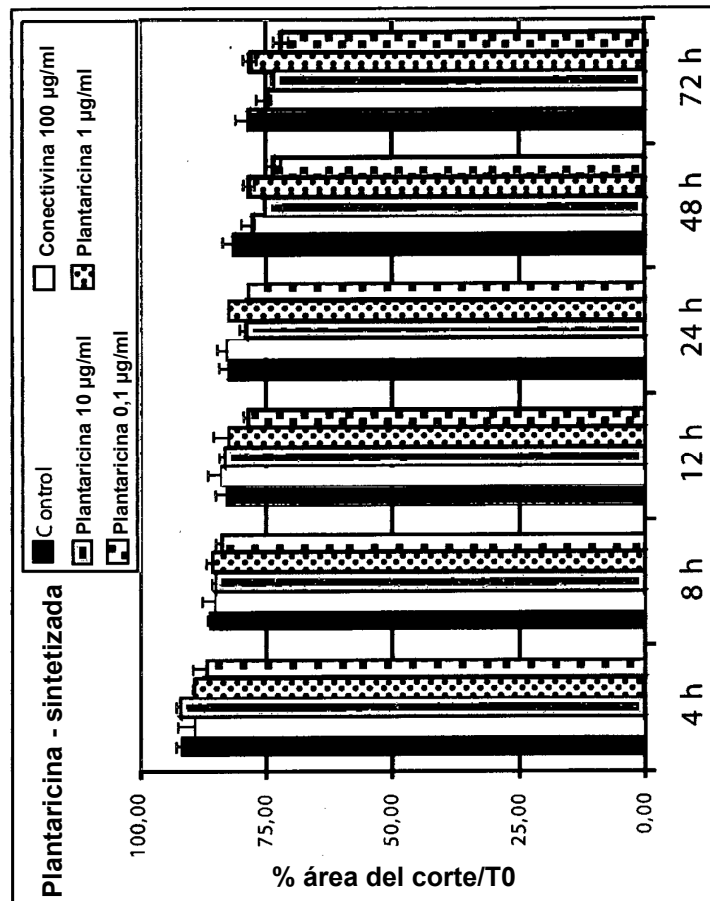
PLANTARICINA - SINTETIZADA	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Control	100 ±0,978	100 ±0,471	100 ±2,084	100 ±2,045	100 ±2,112	100 ±2,703
Conectivina 100 µg/ml	131,60 ±3,259	107,99 ±2,858	93,01 ±2,385	97,80 ±2,061	115,78 ±0,887	115,78 ±0,887
Plantaricina 10 µg/ml	95,39 ±0,711	107,24 ±0,883	97,63 ±1,209	118,08 ±1,080	123,25 ±0,670	123,25 ±0,670
Plantaricina 1 µg/ml	130,04 ±0,213	100,41 ±1,076	102,87 ±2,968	113,28 ±2,219	100,19 ±1,134	100,19 ±1,134
Plantaricina 0,1 µg/ml	158,30 ±2,546	115,55 ±1,307	124,32 ±0,629	141,82 ±1,589	128,51 ±1,499	128,51 ±1,499

Fig. 14



PLANTARICINA - SOBRENADANTE	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Control	91,29 ±2,418	85,52 ±3,065	80,39 ±3,552	76,55 ±4,997	75,93 ±3,837	76,71 ±2,703
Conectivina 100 µg/ml	86,06 ±4,219	82,69 ±3,381	80,55 ±2,267	76,60 ±0,973	75,13 ±0,617	70,61 ±0,887
Plantaricina 10 µg/ml	85,58 ±1,334	79,98 ±0,026	73,59 ±1,312	67,39 ±4,002	64,13 ±5,597	63,62 ±0,670
Plantaricina 1 µg/ml	88,99 ±2,598	81,79 ±1,580	73,75 ±3,605	68,80 ±4,887	55,02 ±4,037	57,01 ±1,134
Plantaricina 0,1 µg/ml	86,95 ±4,863	80,51 ±4,240	78,67 ±3,676	75,06 ±4,073	72,38 ±4,368	55,06 ±1,499

Fig. 15



PLANTARICINA - SINTETIZADA	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Control	91,89 ±0,978	86,14 ±0,471	83,01 ±2,084	82,52 ±2,045	81,41 ±2,112	78,35 ±2,703
Conectivina 100 µg/ml	89,31 ±3,259	85,03 ±2,858	84,20 ±2,385	82,90 ±2,061	77,82 ±0,538	74,94 ±0,887
Plantaricina 10 µg/ml	92,25 ±0,711	85,13 ±0,883	83,41 ±1,209	79,36 ±1,080	75,06 ±0,518	73,32 ±0,670
Plantaricina 1 µg/ml	89,43 ±0,213	86,08 ±1,076	82,52 ±2,968	80,20 ±2,219	78,38 ±1,177	78,31 ±1,134
Plantaricina 0,1 µg/ml	87,14 ±2,546	84,00 ±1,307	78,88 ±0,629	75,21 ±1,589	73,62 ±1,464	72,18 ±1,499

Fig. 16

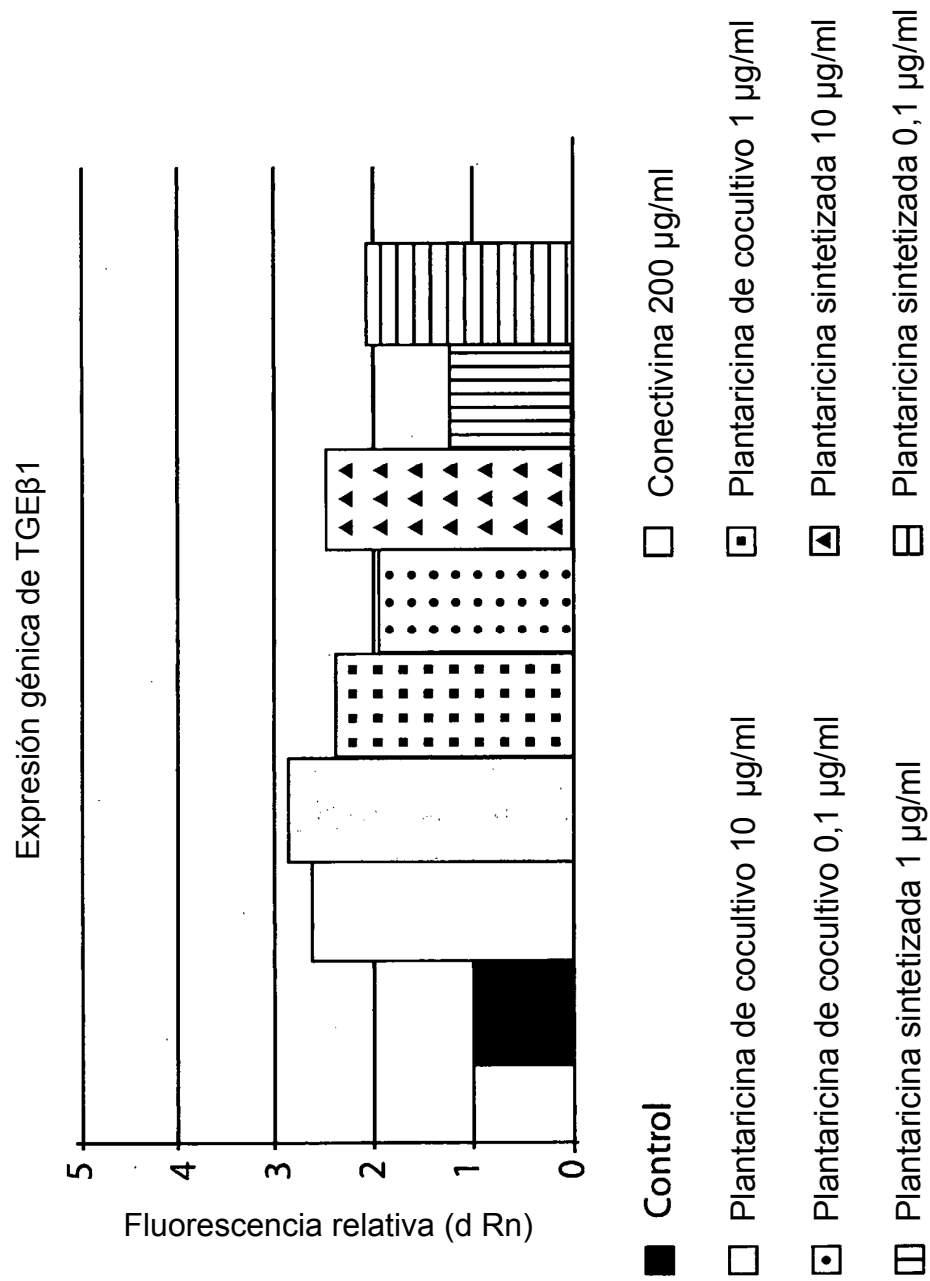


Fig. 17