

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 099**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/744** (2015.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 35/741** (2015.01)  
**A61K 36/06** (2006.01)  
**C12R 1/25** (2006.01)  
**C12R 1/46** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/FR2013/053071**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096641**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13818298 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2931924**

54 Título: **Método para prevenir y/o tratar las infecciones, colonizaciones o enfermedades relacionadas con Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecium, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, Bacteroides fragilis, Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes, Candida albicans y/o 5 Malassezia furfur**

30 Prioridad:

**17.12.2012 FR 1262128**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.12.2017**

73 Titular/es:

**URGO RECHERCHE INNOVATION ET DÉVELOPPEMENT (100.0%)  
 42, rue de Longvic  
 21300 Chenove, FR**

72 Inventor/es:

**DESROCHE, NICOLAS;  
 ARBAULT, PATRICE;  
 GUZZO, JEAN;  
 RODRIGUES, SANDRA;  
 LAURENSOU, CHRISTELLE;  
 MERY, SYLVAIN y  
 APERT, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 645 099 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

Método para prevenir y/o tratar las infecciones, colonizaciones o enfermedades relacionadas con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* y/o *Malassezia furfur*

## Sector de la técnica

La presente invención se refiere a bacterias de acuerdo con la invención que tienen actividades antagonistas (llamadas "bacterias antagonistas de acuerdo con la invención" en lo sucesivo) de bacterias o levaduras patógenas pertenecientes a los géneros y especies *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* y/o *Malassezia furfur* y a su uso como principio activo o en un dispositivo médico, principalmente en el tratamiento y/o la prevención de la colonización y/o infecciones relacionadas con estas bacterias o levaduras patógenas. Las bacterias de acuerdo con la invención, antagonistas de las bacterias o levaduras patógenas se seleccionaron por sus capacidades para inhibir la adhesión y el desarrollo y/o la proliferación de las bacterias y levaduras patógenas y estabilizar y/o regular de este modo el ecosistema. La invención se refiere a productos sanitarios que contienen una o más cepas antagonistas de acuerdo con la invención, no patógenas, destinadas a la prevención o al tratamiento de las infecciones o colonizaciones en la piel, heridas, mucosas y faneras.

## Estado de la técnica

*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son origen de una serie de patologías tales como las infecciones de la piel y de las mucosas, las infecciones de heridas, en particular las heridas crónicas (úlceras, heridas diabéticas), las quemaduras y las heridas quirúrgicas. Estas especies bacterianas se conocen sobre todo por ser la causa del retraso en la cicatrización. También se implican en otras patologías tales como las infecciones gastrointestinales, urinarias y pulmonares, otitis o sinusitis.

*Pseudomonas aeruginosa*, conocida de otro modo con el nombre de bacilo piocianico, puede, en algunas condiciones, ser patógena. Esta bacteria muy resistente - con otras bacterias gramnegativas - se implica cada vez con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales. Esta cepa tiene la capacidad de organizarse en biopelículas, lo que la hace aún más resistente a los antibióticos. Es una de las bacterias más difíciles de tratar clínicamente. La tasa de mortalidad alcanza el 50 % en pacientes vulnerables (inmunodeprimidos). Es un germen ubicuo, muy resistente a numerosos antisépticos, frecuente en el medio hospitalario y que provoca la aparición (debido a su resistencia a los antibióticos) de auténticas cepas de hospital. Las formas de patología que genera son diversas: infección ocular, infección de las heridas (sobre todo quemaduras y heridas de operación), infección urinaria (sobre todo después de intubaciones), infecciones gastrointestinales y pulmonares (por ejemplo después de una broncoscopia), meningitis por inoculación, septicemias como estadio terminal de infecciones graves o complicación en enfermos sometidos a un tratamiento inmunosupresor, leucemias, etc.... Induce con facilidad infecciones sistémicas en los inmunodeprimidos (por quimioterapia o por SIDA) y en las víctimas de quemaduras y de fibrosis quística.

*Staphylococcus aureus* es la especie más patógena del género *Staphylococcus*. Es responsable de intoxicaciones alimentarias, infecciones localizadas supurativas, y en algunos casos extremos, de septicemias físicas (trasplante, prótesis cardiacas). La especie demuestra ser un patógeno oportunista en ciertos lugares o en ciertas circunstancias. Es un germen ubicuo que posee una buena resistencia a los mecanismos de purificación naturales. *S. aureus* también se encuentra en la flora comensal (15 al 30 % de los individuos sanos en las fosas nasales y la garganta, también se puede encontrar en pequeñas cantidades en el aparato digestivo y a menudo en el perineo).

*S. aureus* posee poderes patógenos, principalmente un poder invasivo, una capacidad para multiplicarse y propagarse en el organismo, así como un poder tóxico. *S. aureus* posee una gran capacidad para desarrollar mutantes resistentes a los antibióticos (a modo de ejemplo, se puede citar el *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina o SARM para *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, que es una de las causas principales de infecciones nosocomiales). Por lo tanto, comparte con el bacilo piocianico el primer papel en las infecciones de origen hospitalario.

Estas bacterias y levaduras patógenas tienen la capacidad de adherirse a superficies y especialmente en los tejidos epiteliales y desarrollarse en forma de biopelículas en huéspedes sanos o inmunodeprimidos. Las biopelículas se definen como conjuntos complejos de microorganismos (o comunidades microbianas) que se adhieren a una superficie biótica (tejidos vivos, piel, etc.) o abiótica (material inerte como sílica o acero) y atrapados en una matriz de polímeros orgánicos (Costerton *et al.*, 1999, Dunne, 2002). Estas biopelículas pueden ser de este modo mono-específicas, es decir compuestas de una sola especie bacteriana o de levadura, o mezcladas cuando se componen de varias especies bacterianas o de levaduras.

El tratamiento actual de las infecciones relacionadas con la presencia de especies bacterianas patógenas es el uso de antibióticos (penicilina, cefalosporina). Sin embargo, el uso de este enfoque presenta una serie de inconvenientes:

- 5 - estos antibióticos suelen presentar un espectro de acción significativo y pueden ser la causa del desequilibrio en la flora comensal, pueden conducir posteriormente a una colonización por gérmenes patógenos;
- las bacterias son capaces de adquirir capacidades de resistencia a estos antibióticos;
- la resistencia de las bacterias en forma de biopelículas aumenta considerablemente en comparación con bacterias solas, también llamadas células planctónicas.

10 Frente a los problemas de resistencia múltiple de los gérmenes patógenos a los antibióticos, existe una necesidad urgente de encontrar una alternativa a este tipo de tratamiento.

15 Una solución propuesta para prevenir o tratar las infecciones de origen bacteriano o de levadura es el uso de cepas bacterianas antagonistas de especies patógenas. Se habla entonces de bacterioterapia. Estas cepas antagonistas son capaces, por su metabolismo, de producir moléculas antimicrobianas y/o de interferir con la adhesión de bacterias y levaduras patógenas y/o de perturbar la comunicación celular entre las bacterias y levaduras patógenas y/o de poseer actividades angiogénicas. También pueden controlar la inflamación (propiedades inmunomoduladoras). Estas bacterias forman una biopelícula positiva en la superficie de la piel, heridas, mucosas o faneras, que pueden instalarse temporalmente y limitar la implantación de bacterias y levaduras patógenas.

Esto es particularmente interesante cuando la infección y/o la colonización se sitúan a nivel de la piel y/o de una herida.

25 Estas cepas antagonistas pertenecen en general a la familia de las bacterias lácticas. Estas cepas se aislaron a partir de diferentes matrices y principalmente a partir de las heces. Las actividades de estas cepas son ampliamente usadas para la prevención y el tratamiento de trastornos de la mucosa intestinal; se habla entonces de bacterias probióticas. Asimismo se han descrito otras aplicaciones de la mucosa otorrinolaringológica y de la mucosa urogenital. A modo de ejemplo, se puede citar la patente EP 871 503 que trata sobre una capa o toalla higiénica que comprende microorganismos seleccionados entre los géneros *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* o *Lactococcus lactis* que poseen propiedades antagonistas que les permitan combatir contra las cepas de microorganismos indeseables presentes o que se forman en el artículo absorbente o en la zona urogenital. La solicitud de patente WO 99/53932 trata sobre una composición para el tratamiento de otitis que comprende microorganismos seleccionados entre *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*.

35 El solicitante está particularmente interesado en las cepas antagonistas de las cepas patógenas *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

#### 40 **Objeto de la invención**

Uno de los objetos de la presente invención también consiste potencialmente en crear una biopelícula positiva transitoria en la superficie de la piel, faneras, mucosas y/o heridas, que impida o limite la implantación de patógenos y su proliferación.

45 Las bacterias antagonistas de acuerdo con la presente invención son particularmente interesantes para su aplicación en las patologías que implican las especies patógenas *S. aureus* y *P. aeruginosa* tales como las infecciones gastrointestinales, urinarias y pulmonares, otitis o sinusitis, las heridas o que implican una colonización de heridas, piel, faneras o mucosas.

50 Las bacterias antagonistas de acuerdo con la presente invención son particularmente interesantes para su aplicación en diversos tipos de heridas (crónicas, agudas, quemaduras), pero también en las afecciones cutáneas (tales como, por ejemplo, foliculitis, impétigo, eczema, forúnculos, ántrax, panadizos, atopias, perleches, sobreinfecciones de lesiones relacionadas con virus tales como herpes o varicela).

55 De hecho, una herida es una lesión consecutiva a un traumatismo, lo que resulta en la pérdida cutánea o una apertura en la piel. En respuesta a la formación de una herida, se lleva a cabo el proceso de cicatrización.

60 La cicatrización natural de una herida tiene lugar principalmente de acuerdo con tres fases sucesivas, cada una de las fases se caracteriza por actividades celulares específicas que promueven el proceso de reparación de acuerdo con secuencias cronológicas precisas: la fase inflamatoria, la fase de granulación (o fase proliferativa) y la fase de formación de una cicatriz. La rapidez y la calidad de la cicatrización de una herida dependen del estado general del organismo alcanzado, etiología de la herida, estado y ubicación de la herida, aparición o no de una infección, así como de factores genéticos de predisposición o no a trastornos de cicatrización. La piel desgarrada o cortada ya no puede desempeñar su papel como barrera contra los microbios que pueden penetrar así pues en el organismo provocando una infección.

65

Las bacterias y las levaduras están inevitablemente presentes en las heridas, se trata de una colonización natural.

De acuerdo con la cantidad de bacterias y/o levaduras, las especies bacterianas y/o de levadura presentes y la respuesta del organismo, la distinción se hace entre la colonización, la infección local y la infección.

5 La colonización es la presencia de una cierta cantidad de bacterias y/o levaduras en la herida sin que ésta última no implique una respuesta inflamatoria. Tras la multiplicación de gérmenes en la herida, su adherencia a las células epiteliales, se establece un equilibrio entre el paciente y su flora microbiana. Los gérmenes permanecen en la superficie de la herida y se adhieren para formar una biopelícula. En el plano cuantitativo, la colonización se  
10 caracteriza por una cantidad de gérmenes inferior a  $10^5$  bacterias/mm<sup>3</sup>. Si la cantidad de bacterias y/o levaduras supera esa cifra, algunos autores sugieren la colonización crítica, después de la infección superficial estrictamente local en presencia de una colonización bacteriana y/o de levaduras importante. Esta presencia significativa de bacterias y/o levaduras daña el correcto desarrollo del proceso cicatricial e induce un retardo en la cicatrización.

15 Se habla de infección cuando la presencia de gérmenes bacterianos y/o de levaduras provoca una respuesta inflamatoria local y la aparición de signos generales con signos clínicos que se traducen en la invasión tisular por los gérmenes presentes (gran cantidad de gérmenes presentes, virulencia bacteriana, disminución de los mecanismos de defensa inmunitaria del paciente). La infección se caracteriza por los signos clínicos localregionales y generales.

20 Esto puede conducir a la extensión de la herida con la exposición de las estructuras anatómicas subyacentes como los ligamentos o los huesos.

25 La colonización bacteriana no requiere planteamientos terapéuticos particulares, mientras que una infección exige el establecimiento de tratamientos antibacterianos locales y generales. La infección es por lo general el factor determinante en la no cicatrización o el retraso en la cicatrización de heridas, directamente o indirectamente. Cualquier contaminación bacteriana y/o por levaduras de una herida determina la inflamación.

30 Esto puede ser beneficioso en caso de contaminación moderada (inevitable en caso de una herida abierta), pero se vuelve perjudicial en caso de infección de la herida que resulta en un retraso en la cicatrización.

35 Así, la complicación inmediata de la cicatrización es ante todo la infección que impide que el inicio del proceso de cicatrización se establezca; se considera una herida como infectada cuando la cantidad de bacterias y/o levaduras presentes en la herida dificulta el proceso de cicatrización o empeora la herida.

40 En este caso, la cicatrización, denominada de segunda intención, necesita por lo general el uso de medicamentos dermatológicos y herramientas quirúrgicas (bisturí, cureta, etc.). En el caso de una úlcera de pierna, por ejemplo, es necesario desinfectar en primer lugar la herida con antisépticos (tales como clorhexidina o hexamidina) y a continuación, efectuar una limpieza, que consiste en eliminar los restos y el exceso de secreción, ya sea por la intervención quirúrgica o por medicamentos proteolíticos, es decir, cuyo objetivo es destruir los colgajos de piel muerta que contaminan la herida. Entre los activos usados habitualmente para tratar las infecciones de las heridas, también se puede mencionar la plata, cobre, octenidina, yodo, PHMB (polihexametileno biguanida), miel.

45 Sin embargo, los antibacterianos y/o antisépticos no se recomiendan en las heridas. La eficacia de estos activos, en vista de su mecanismo de acción, es efímera, son inactivados por las sustancias orgánicas, pueden ser citotóxicos frente a los elementos celulares, tienen un amplio espectro, por consiguiente, no solo atacarán las bacterias patógenas sino que también deteriorarán la flora comensal. Además, un número de cepas bacterianas ha desarrollado resistencia a los antisépticos/antibacterianos.

50 Por tanto, existe una necesidad de disponer activos eficaces en el tratamiento y/o la prevención de infecciones o colonizaciones de heridas por bacterias y/o levaduras que sea eficaz, fácil de usar y no invasivo.

55 Una solución propuesta para prevenir o tratar infecciones o colonizaciones de origen bacteriano y/o debido a las levaduras en la piel, heridas, mucosas y faneras, es el uso de cepas bacterianas antagonistas de cepas patógenas. Estas cepas son capaces, por su metabolismo, de producir moléculas antimicrobianas y/o de interferir con la adhesión de bacterias y/o levaduras patógenas. Estas bacterias también pueden formar una biopelícula positiva en la superficie de la piel, heridas, mucosas o faneras, que pueden instalarse temporalmente y limitar la implantación de bacterias y/o levaduras patógenas.

60 Estas cepas antagonistas pertenecen generalmente a la familia de las bacterias lácticas y/o se han aislado de la flora comensal de las mucosas de los seres humanos. Las actividades de estas cepas se usan ampliamente para la prevención y tratamiento de trastornos en la mucosa intestinal, mucosa ORL y mucosa vaginal. Tales cepas se describen en los documentos WO 96/38159, WO 00/61201, EP 1 140 226, EP 1 461 012 y WO 2006/013441.

65 El efecto antagonista de las cepas se debe a diferentes mecanismos tales como:

- competencia nutricional para sustratos carbonados y/o nitrogenados;
- producción de moléculas antimicrobianas tales como ácido láctico, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), moléculas reductoras, bacteriocinas;
- 5     ▪ competencia de adhesión para los sitios de fijación en las mucosas (efecto barrera);
- producción de biotensioactivos;
- inhibición o perturbación de la comunicación celular entre las diferentes especies bacterianas;
- actividades inmunomoduladoras que permiten la estimulación de la inmunidad local y sistémica.

10 Las aplicaciones que implementan cepas probióticas en la piel y heridas recurren generalmente a una de las actividades descritas previamente.

Se puede citar las aplicaciones que se refieren a los efectos angiogénicos de cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* CACT 4356 y CACT 43121 y *Bacillus polyfermenticus* en la piel y la mucosa intestinal (Halper *et al.*, 2003, Im *et al.*, 2009). Las cepas probióticas de *Bifidobacterium longum* router, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116, *Lactobacillus johnsonii* La1 y *Vitreoscilla filiformis*, en formas tópicas, también se usaron para regular los fenómenos de inflamación y alteraciones en la piel (Gueniche *et al.*, 2006, Gueniche *et al.*, 2008a, Gueniche *et al.*, 2008b, Gueniche *et al.*, 2008c, Gueniche *et al.*, 2008d, Gueniche *et al.*, 2009, Gueniche *et al.*, 2010). En el contexto de estas aplicaciones, los autores destacan el poder inmunomodulador de las cepas. Tales cepas se describen en las solicitudes de patente EP 1 593 382 y WO 2006/037922.

El uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum* CACT 10241 se ha descrito para limitar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y la formación de biopelículas por esta cepa liberando moléculas de señalización que perturban la comunicación celular (o "percepción de quorum"). La aplicación directa de un trozo de gasa empapada con un cultivo de esta cepa, en modelos de quemaduras en ratas y en quemaduras en humanos, ha permitido demostrado su eficacia (Peral *et al.*, 2009, Valdez *et al.* 2005). El poder inmunomodulador de esta cepa frente a los neutrófilos y leucocitos también se ha explotado para tratar heridas crónicas (heridas diabéticas, úlceras venosas) y para reducir la inflamación causada por *P. aeruginosa* (Peral *et al.*, 2010, Ramos *et al.*, 2010, Ramos *et al.*, 2012). Una formulación de esta cepa en una película de alginato se ha descrito por Brachkova *et al.* (Brachkova *et al.*, 2011) para la prevención de infecciones de quemaduras por *P. aeruginosa*.

Una cepa de *Lactobacillus fermentum* RC-14 ha demostrado notables capacidades para inhibir la adhesión de *Staphylococcus aureus* y limitar las infecciones relacionadas con este germen en implantes quirúrgicos (Gan *et al.*, 2002). Este efecto antimicrobiano se ha atribuido a la liberación de un biotensioactivo.

La eficacia de varias cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aisladas a partir de diferentes fuentes en la prevención y tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, también se demostró en un estudio de H. Sikorska *et al.*, 2013.

40 Se puso de relieve la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnes* por cepas de *Lactobacillus reuteri* (CCCT 3594, CCCT 3678 y CCCT 3679) (Kang *et al.*, 2012).

Se ha demostrado el efecto de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus* sp. HY 449 contra las bacterias inflamatorias de la piel tales como *Staphylococcus epidermidis* CACT 12228, *Staphylococcus aureus* CACT 65389, *Streptococcus pyogenes* CACT 21059 y *Propionibacterium acnes* CACT 6919 (Ho *et al.*, 2006).

Ya se han descrito vendajes o tejidos que recurren a la aplicación de cepas probióticas (bacterias lácticas y *Bacillus coagulans*) (documentos US 7.025.974 y WO 2008/074331). La eficacia de estas formulaciones se basa exclusivamente en el uso de cepas bacterianas capaces de producir ácido láctico como principal agente antimicrobiano con amplio espectro.

La presente invención tiene por objeto proporcionar nuevos activos a base de bacterias antagónicas de acuerdo con la invención de bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y/o *Pseudomonas aeruginosa*, que son eficaces en el tratamiento y/o la prevención de la colonización y/o infecciones relacionadas con esas bacterias patógenas, en particular en la piel, heridas, mucosas y faneras. Además, estos activos pueden administrarse directamente en contacto con la piel, herida, mucosas y faneras o pueden incorporarse con facilidad en las composiciones, en particular en composiciones adecuadas para aplicación tópica, y son no invasivos.

De forma innovadora, las bacterias antagonistas de acuerdo con la invención se seleccionaron previamente en base a varios criterios: (i) su capacidad para inhibir el crecimiento de gérmenes patógenos que son *S. aureus* y *P. aeruginosa*, (ii) su capacidad para adherirse y formar una biopelícula positiva en colágeno y en la epidermis, (iii) su capacidad para limitar la adhesión de gérmenes patógenos en matrices que contienen colágeno y (iv) su capacidad para limitar la reacción inflamatoria (producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos).

65 Estas bacterias de acuerdo con la invención son capaces de desarrollar un efecto barrera en la piel, herida, mucosas, faneras y prevenir y limitar así el riesgo de colonización e infección.

Los inventores están particularmente interesados en seleccionar cepas antagonistas principalmente de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que son las especies patógenas implicadas en su mayoría en las infecciones, principalmente en las infecciones nosocomiales.

5 De manera complementaria, los inventores seleccionaron cepas bacterianas de acuerdo con la invención que, además de inhibir las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, inhiben el desarrollo de otras especies patógenas tales como *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. Estos gérmenes están especialmente implicados en las infecciones de heridas y de la piel.

*Propionibacterium acnes* es un bacilo grampositivo anaerobio, de crecimiento relativamente lento y presente normalmente en la piel, cabello y mucosas. Es el responsable del acné.

15 La bacteria está ampliamente presente en la flora cutánea en la mayor parte de adultos sanos, pero también es responsable de las infecciones post-operatorias, especialmente en caso de presencia de implantes, potencialmente graves: infecciones del sistema nervioso central, endoftalmias, endocarditis, infecciones de la esfera ORL y pulmonar, espondilitis, peritonitis e infecciones osteoarticulares.

20 El *Staphylococcus epidermidis* es un comensal de la piel en prácticamente el 100 % de los seres humano; sus propiedades lipolíticas le permiten prosperar en el sebo. Es normalmente inofensivo, pero provoca verdaderas infecciones en pacientes cuyo sistema inmunitario está comprometido o pacientes que tienen catéteres, prótesis. Puede causar infecciones dermatológicas e infecciones nasales como sinusitis o infecciones urinarias en las mujeres y rara vez en los hombres. Estas bacterias tienen la capacidad de producir las biopelículas que les permiten adherirse a las superficies de las prótesis médicas.

30 *Candida albicans* se manifiesta de forma diferente en función de su ubicación. En pacientes inmunocompetentes (es decir, cuyo sistema de defensa es eficaz, a diferencia de los inmunodeprimidos), aparece en forma de muguet en la boca, enrojecimiento y prurito en la piel, esencialmente en los pliegues, zonas cálidas y húmedas favorables para el desarrollo de la levadura, pequeñas inflamaciones locales genitales como uretritis en el hombre o vulvovaginitis con pérdidas blanquecinas y prurito en las mujeres.

35 *Malassezia furfur* es una levadura implicada principalmente en la dermatitis seborreica que es una dermatosis inflamatoria cutánea frecuente (observada en 3 % a 5 % de la población). Se presenta en forma de placas rojas, cubiertas de escamas de grasa y amarillentas, más o menos pruriginosas, predominante en las zonas ricas en glándulas sebáceas, las zonas seborreicas. Por otra parte, la topografía de las lesiones es evocadora: hendidura entre la nariz y los labios, raíz de las cejas, cuero cabelludo, alas de la nariz, pliegues de los pabellones, concha de los oídos, conductos auditivos externos. En el cuero cabelludo, el ataque frecuente se traduce en un estado pelicular más o menos seborreico. En el tronco, se puede observar dos zonas frecuentes en los seres humanos: el esternón y la región entre los dos omóplatos.

45 Se encuentra tanto en adultos como en lactantes (menos de 3 meses), se distingue por las clásicas "costras lácteas" en el cuero cabelludo y un sarpullido del pañal. En los adultos, esta patología se observa sobre todo en los sujetos de edades comprendidas entre 20 y 40 años. Los hombres se ven con frecuencia más afectados que las mujeres. En las mujeres, el desarrollo se observa más particularmente en el momento de la menopausia. La patología de origen inflamatorio, multifactorial no es contagiosa y puede evolucionar a brotes generalmente desencadenados por el estrés o la contaminación y la falta de sol.

50 La causa es desconocida, pero un hongo microscópico puede desempeñar un papel en un campo inmunoalérgico particular.

55 La pitiriasis versicolor es una micosis superficial, relacionada con la proliferación en la piel de *Malassezia furfur*. Esta levadura vive normalmente en la superficie de la piel, pero en algunas situaciones, se multiplica a gran velocidad y hace que esas pequeñas manchas sean de color marrón o estén descoloridas.

Este hongo le gusta particularmente las pieles grasas, se asienta en el tórax, aunque también en el cuello y los hombros, en la parte superior de la espalda y las extremidades superiores, rara vez en las extremidades inferiores.

60 La presente invención tiene así pues por objeto una bacteria seleccionada entre las cepas de *Lactobacillus saniviri* también designado en la presente solicitud por F3C5p (registrado el 12 de julio de 2012 en la CNCM con el n.º I-4654 en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, designada en lo sucesivo "CNCM"), *Lactobacillus salivarius* designado también en la presente solicitud por F50C2p, F52C3p y F41C3p (registrado respectivamente con los n.º CNCM I-4651, CNCM I-4652 y CNCM I-4653 en la CNCM), *Streptococcus mitis* también designado en la presente solicitud por F3C2v (registrado el 12 de julio de 2012 con el n.º CNCM I-4654 en la CNCM) y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* también designado en la presente solicitud por L1C1 (registrado el 12 de julio de 2012 con el n.º CNCM I-4655 en la

CNCM). Estas bacterias se llaman "bacterias de acuerdo con la invención" en la presente solicitud.

La presente invención también tiene por objeto una bacteria de acuerdo con la invención para su uso como inmunomodulador.

5 La presente invención también tiene por objeto el uso de una bacteria tal de acuerdo con la invención como principio activo o como dispositivo médico o como cosmético o como suplemento alimenticio. La bacteria de acuerdo con la invención también se puede usar como principio activo en un medicamento, dispositivo médico, cosmético o suplemento alimenticio.

10 La presente invención también proporciona una bacteria de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la colonización y/o infecciones relacionadas con al menos una bacteria o una levadura seleccionada entre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecium*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *B. fragiles*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

15 Preferentemente, la presente invención contempla una bacteria de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la colonización y/o infecciones relacionadas con *P. aeruginosa* y/o *S. aureus*.

20 La presente invención trata más particularmente sobre el tratamiento y/o la prevención por las bacterias de acuerdo con la invención de la colonización y/o infecciones de heridas y de la piel por las bacterias o las levaduras patógenas.

El término "tratamiento" o "tratar" una infección o una colonización significa disminuir y/o inhibir el desarrollo de esta infección o colonización.

25 El término "prevención" o "prevenir" una infección o colonización significa disminuir y/o prevenir la aparición de síntomas de infección o colonización.

30 Por "infección o colonización de heridas", se entiende una infección o colonización seleccionada entre úlceras del pie diabético, úlceras de la pierna de origen arterial, úlceras de la pierna de origen venoso, escaras, panadizos, infecciones relacionadas con heridas agudas, infecciones relacionadas con heridas traumáticas, tales como las heridas por sección, heridas penetrantes, heridas por agentes térmicos o cáusticos y quemaduras; y las infecciones relacionadas con las heridas post-operatorias, tales como heridas suturadas simples de una incisión quirúrgica, heridas suturadas complejas después de la escisión cutánea, dermoabrasiones quirúrgicas y heridas no suturables que necesitan una cicatrización por segunda intención.

35 La bacteria de acuerdo con la invención se puede incorporar en una composición, como por ejemplo un dispositivo médico. Por dispositivo médico, se entiende en el sentido de la presente invención las prótesis, catéteres, vendas, bolsas de ostomía, campos quirúrgicos, sondas urinarias, sondas endotraqueales, drenajes transtimpánicos, cintas, bandas de contención, implantes ortopédicos y mamarios, lentes de contacto, dispositivos intrauterinos o materiales de sutura.

45 La presente invención también tiene por objeto una composición que comprende al menos una bacteria de acuerdo con la invención. Dicha composición comprende, en un medio aceptable, al menos una bacteria de acuerdo con la invención. Por medio aceptable, se entiende un medio compatible con la piel, herida, mucosas y faneras.

La composición de acuerdo con la invención, o la bacteria de acuerdo con la invención, se puede administrar por vía tópica, oral o parenteral.

50 Preferentemente, una composición de este tipo o una bacteria tal de acuerdo con la invención es adecuada para una aplicación tópica en la piel, herida, faneras o mucosas como la mucosa rinofaríngea, urogenital, digestiva o respiratoria. La composición se puede aplicar directamente a la piel, herida o mucosas.

Por aplicación tópica, se entiende una aplicación a la piel, herida, mucosas y/o faneras.

55 La composición de acuerdo con la invención comprende preferentemente  $10^3$  a  $10^{12}$  bacterias de acuerdo con la invención, preferentemente  $10^6$  a  $10^{11}$ .

60 La composición tópica puede presentarse en forma líquida, pastosa o sólida, y más particularmente en forma de ungüento, crema, leche, pomada, polvo, tampón empapado, limpiador sin jabón, toallitas, solución, gel, pulverizador, espuma, suspensión, loción, barrita, champú o base limpiadora. También puede presentarse en forma de suspensión de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas o de microcápsulas o de parches poliméricos y de hidrogel que permiten una liberación controlada. Esta composición para aplicación tópica puede presentarse en forma anhidra, en forma acuosa o en forma de emulsión.

65 La composición parenteral puede presentarse en forma de una solución para inyección subcutánea (solución

inyectable).

La composición oral puede presentarse en forma de una solución, polvo, cápsula, comprimido, o puede incorporarse en un producto alimenticio tal como un producto lácteo.

5 La bacteria de acuerdo con la invención puede incorporarse en la composición en forma de célula inactivada, en particular, inactivada por calor, por rayos UV o por cualquier otro proceso. También se puede incorporar en forma de célula viva, encapsulada o no, inmovilizada o no, liofilizada o no, o en forma de extracto celular. También puede tratarse de un lisado celular o cualquier otro tipo de presentación conocido por el experto en la materia.

10 Preferentemente, las bacterias antagonistas usadas en el contexto de la presente invención, o una formulación galénica que las contiene, se aplicarán directamente en la herida ya sea en forma de composición tópica o se incorporarán en una matriz sintética o no que entra en la composición de un vendaje.

15 En este modo de realización, las bacterias de acuerdo con la invención se formulan en un vendaje, o se formulan en una composición que en sí misma se incluye en un vendaje o se puede incluir en el momento de la aplicación del vendaje. El vendaje de acuerdo con la invención comprende por lo tanto al menos una bacteria de acuerdo con la invención o al menos una composición de acuerdo con la invención.

20 Las bacterias antagonistas de acuerdo con la invención o las composiciones de acuerdo con la invención que las contienen se podrán incorporar en un elemento cualquiera de la estructura de un vendaje, siempre que dichas bacterias de acuerdo con la invención puedan entrar directamente o indirectamente en contacto con la superficie de la herida.

25 Preferentemente y con el fin de favorecer una acción rápida, la bacteria de acuerdo con la invención (o una composición de acuerdo con la invención que la contiene) se incorporará en la capa del vendaje que se pondrá en contacto con la herida, o se depositará sobre la superficie del vendaje que se pondrá en contacto con la herida. Ventajosamente, la bacteria de acuerdo con la invención (o una composición de acuerdo con la invención que la contiene) se podrá depositar por lo tanto de forma continua o discontinua en la superficie destinada a entrar en  
30 contacto con la herida:

- en forma líquida, por ejemplo por vaporización de una solución o suspensión que la contiene;
- en forma sólida, por ejemplo por tamizado de un polvo que la contiene.

35 Por vendaje, se entiende indicar, en el sentido de la presente solicitud, todos los tipos de vendajes usados para el tratamiento de las heridas. Normalmente, un vendaje comprende al menos una capa o matriz, adhesiva o no.

40 La capa o superficie que entra en contacto con la herida podrá fabricarse de cualquier material o combinación de materiales usados habitualmente para este fin en el campo de los vendajes. Entre estos materiales, se puede citar las espumas absorbentes, en particular espumas hidrófilas a base de poliuretano; materiales textiles, en particular no tejidos a base de fibras absorbentes o superabsorbentes; hidrogeles; o una combinación de estos materiales; un material adhesivo absorbente o no; una estructura de interfaz adherente o no.

45 En general, se podrá jugar con la galénica o la estructura del vendaje para obtener un perfil de liberación específico de la bacteria de acuerdo con la invención, rápida o retardada, según sea apropiado.

Por lo tanto, la bacteria de acuerdo con la invención (o una composición de acuerdo con la invención que la contiene) podrá incorporarse en cualquier tipo de vendaje existente tal como, sin que estos ejemplos sean limitantes:

- 50
- los alginatos tales como, a modo de ejemplo, los productos comercializados bajo las denominaciones Urgosorb® por los Laboratorios URGO o Melgisorb® por Mölnlycke;
  - los hidrocélulas tales como, a modo de ejemplo, los productos comercializados bajo las denominaciones Urgotul Absorb® por los Laboratorios URGO o Tielle por Systagenix;
  - 55 - los vendajes hidrocóloides tales como, a modo de ejemplo, los productos comercializados bajo las denominaciones Algoplaque® por los Laboratorios URGO y Comfeel® por la sociedad Coloplast;
  - los hidrogeles tales como, a modo de ejemplo, los productos comercializados bajo las denominaciones Urgo Hydrogel® por los Laboratorios URGO e Intrasite Gel® por Smith & Nephew.
  - Los vendajes líquidos tales como, a modo de ejemplo, los productos comercializados bajo las denominaciones Urgo Crevasses por los Laboratorios URGO o Nexcare® por 3M.

60 Por supuesto, se adaptará la cantidad de bacterias de acuerdo con la invención usada en la formulación galénica o en el vendaje en función de la cinética deseada así como limitaciones específicas relacionadas con su naturaleza, solubilidad, resistencia al calor, etc.

65 En el contexto de su uso en un elemento de vendaje, la bacteria o bacterias de acuerdo con la invención se incorporarán en una cantidad tal que la cantidad de bacterias de acuerdo con la invención liberadas en los exudados

de la herida se comprende 0,001 g/l y 50 g/l, y preferentemente entre 0,01 y 10 g/l.

De acuerdo con la galénica seleccionada, la aplicación del vendaje podrá necesitar una imbibición o hidratación previa del vendaje con una solución, como por ejemplo suero fisiológico, para activar las bacterias antagonistas de acuerdo con la invención.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender una o más cepas antagonistas de acuerdo con la invención asociadas o no a al menos un compuesto seleccionado entre probióticos, prebióticos y levaduras. Entre los prebióticos se puede citar, a modo de ejemplo, los fructanos tales como inulina, fructo-oligosidos o los transgalactooligosacáridos, o azúcares de cadena larga o de cadena ramificada.

La bacteria de acuerdo con la invención también puede asociarse con agentes activos particulares seleccionados entre agentes anti-fúngicos, calmantes, antiinflamatorios, agentes que favorecen la cicatrización, agentes hidratantes, agentes queratolíticos, agentes reestructurantes y anestésicos.

En particular, los activos que pueden introducirse en la composición de acuerdo con la invención pueden seleccionarse entre:

- los antifúngicos tales como polieno, nistatina, anfotericina B, natamicina, imidazoles (miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tiabendazol, tioconazol), triazoles (fluconazol, itraconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol), alilaminas, terbinafina, amorolfina, naftifina o butenafina;
- la flucitósina (antimetabolito), griseofulvina, caspofungina o micafungina;
- los calmantes tales como paracetamol, codeína, dextropropoxifeno, tramadol, morfina y sus derivados, corticoides y sus derivados;
- los antiinflamatorios tales como glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos, aspirina, ibuprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, diclofenaco, aceclofenaco, ketorolac, meloxicam, piroxicam, tenoxicam, naproxeno, indometacina, naproxcinod, nimesulida, celecoxib, etoricoxib, parecoxib, rofecoxib, valdecoxib, fenilbutazona, ácido niflúmico o ácido mefenámico;
- los activos que favorecen la cicatrización, tales como retinol, vitamina A, vitamina E, N-acetil-hidroxi prolina, extractos de *Centella Asiatica*, papaína, siliconas, aceites esenciales de tomillo, niaouli, romero y salvia, ácido hialurónico, oligosacáridos polisulfatados sintéticos con 1 a 4 unidades osas tales como sal de potasio de sacarosa octasulfatada, sal de plata de sacarosa octasulfatada o sucralfato o alantoína;
- los agentes hidratantes tales como ácido hialurónico, urea, glicerol, ácidos grasos, moduladores de acuaporinas, aceites vegetales, quitosano, ciertas azúcares incluyendo sorbitol, mantequillas y ceras;
- los agentes queratolíticos tales como ácido salicílico, salicilato de cinc, ácido ascórbico, ácidos alfa hidroxilados (ácido glicólico, láctico, málico, cítrico, tartárico), extractos de arce plateado, guindo, tamarindo, urea, retinoide tópico Kératoline® (Sederma), proteasas que se obtienen por fermentación de *Bacillus subtilis* o el producto Linked-Papain® (SACI-CFPA);
- los activos reestructurantes (por ejemplo reestructurantes de faneras) tales como derivados de sílice, vitamina E, manzanilla, calcio, extracto de cola de caballo, o lipéster de seda;
- los anestésicos tales como benzocaína, lidocaína, dibucaína, clorhidrato de pramoxina, bupivacaína, mepivacaína, prilocaína o etidocaína.

### Descripción de las figuras

Se darán a continuación, a modo de ilustración y sin carácter limitativo alguno, varios ejemplos del uso de las bacterias de acuerdo con la invención, que permiten demostrar las actividades antibacterianas de cepas antagonistas de acuerdo con la invención.

La figura 1 representa los halos de inhibición observados después de poner en contacto las bacterias de acuerdo con la invención con bacterias patógenas en medio gel de agar después de 48 horas de incubación.

La figura 2 representa un halo de inhibición formado después del contacto con las bacterias de acuerdo con la invención, incorporadas en un vendaje, con bacterias patógenas en medio de gel agar después de 48 horas de incubación.

La figura 3 representa la capacidad de las bacterias de acuerdo con la invención para adherirse a las epidermis reconstituidas (cantidad de bacterias adheridas UFC/cm<sup>2</sup>).

La figura 4 representa los resultados de ensayos de competencia de adhesión sobre las superficies de colágeno de las bacterias de acuerdo con la invención frente a *S. aureus* (cantidad de *S. aureus* adherida después de 24 h de incubación (UFC/cm<sup>2</sup>)).

La figura 5 representa los resultados de los ensayos de exclusión sobre las superficies de colágeno de las bacterias de acuerdo con la invención frente a *S. aureus* (cantidad de *S. aureus* después de 24 h de incubación (UFC/cm<sup>2</sup>)).

La figura 6 representa los resultados de los ensayos de competencia de adhesión sobre las superficies de colágeno de las bacterias de acuerdo con la invención frente a *P. aeruginosa* (cantidad de *P. aeruginosa* adherida después de 24 h de incubación (UFC/cm<sup>2</sup>)).

La figura 7 representa los resultados de los ensayos de exclusión sobre las superficies de colágeno de las

bacterias de acuerdo con la invención frente a *P. aeruginosa* (cantidad de *P. aeruginosa* después de 24 h de incubación (UFC/cm<sup>2</sup>)).

Las figuras 8a y 8b representan la cantidad de TNF- $\alpha$  liberado (pg/ml) por los macrófagos después de 3,5 horas de contacto con las bacterias de acuerdo con la invención, con o sin estimulación por LPS de *E. coli* 0127: B8.

5

#### Descripción detallada de la invención

**EJEMPLO 1: Actividades antimicrobianas de las cepas de bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p (CNCM I-4650), *Lactobacillus salivarius* F50C2p (CNCM I-4651), *Lactobacillus salivarius* F52C3p (CNCM I-4652), *Lactobacillus salivarius* F41C3p (CNCM I-4653), *Streptococcus mitis* F3C2v (CNCM I-4654) y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 (CNCM I-4655)**

10

Las bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p (CNCM I-4650), *Lactobacillus salivarius* F50C2p, F52C3p y F41C3p (respectivamente CNCM I-4651, CNCM I-4652 y CNCM I-4653), *Streptococcus mitis* F3C2v (CNCM I-4654) y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 (CNCM I-4655) se cultivaron en medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 16 horas a 37 °C y en condiciones anaerobias. Se depositaron gotas de 10  $\mu$ l de estos cultivos en la superficie de los medios de gel de agar de soja triptica (AST) previamente sembrados en la masa con 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) CACT 43300 o *Pseudomonas aeruginosa* CACT 9027 o *Bacteroides fragilis* CACT 23745 o *Enterobacter cloacae* CIP 105132 o *Enterococcus faecium* CACT 700221 o *Proteus mirabilis* CIP 107283 o *Streptococcus pyogenes* CACT 19615 o *Staphylococcus epidermidis* CACT 14990 o *Propionibacterium acnes* CACT 6919 o *Candida albicans* CACT 10231 o *Malassezia furfur* CACT 14521 por ml de medio de gel de agar. Un control negativo se realizó depositando 10  $\mu$ l de medio MRS estéril.

15

20

Las placas se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C durante 24 y 48 horas. Después de la incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados alrededor de las gotas (en mm).

25

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 1.

El signo "-" indica ausencia de halo de inhibición, un signo "+" indica un halo de inhibición de diámetro inferior a 1 mm, un signo "++" indica un halo de inhibición de diámetro comprendido entre 1 mm y 3 mm y un signo "+++" indica un halo de inhibición de diámetro superior a 3 mm. Ningún halo de inhibición se puso de relieve con el control negativo. Los halos de inhibición se observaron con las 3 cepas de bacterias ensayadas (cf. Figura 1).

30

**Tabla 1:** Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de las cepas *Lactobacillus saniviri* F3C5p (CNCM I-4650), *Lactobacillus salivarius* F50C2p (CNCM I-4651), *Lactobacillus salivarius* F52C3p (CNCM I-4652), *Lactobacillus salivarius* F41C3p (CNCM I-4653), *Streptococcus mitis* F3C2v (CNCM I-4654) y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 (CNCM I-4655)

Cepas	<i>S. aureus</i> P. aeruginosa	<i>B. fragilis</i> E. cloacae	<i>P. mirabilis</i> E. faecium	<i>S. pyogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Malassezia furfur</i>
	CACT 4300	CACT 9027	CIP105132 CIP 107283	CACT 700221	CACT 19615	CACT 6919	CACT 10231	CACT 14521
<i>L. saniviri</i> F3C5p (CNCM I-4650)	+++	+	+++	++	+++	+++	+	+++
<i>L. salivarius</i> s F50C2p (CNCM I-4651)	++	+	++	+	+++	+++	-	-
<i>L. salivarius</i> s F52C3p (CNCM I-4652)	++	++	++	++	+++	+++	-	-
<i>L. salivarius</i> s F41C3p (CNCM I-4653)	+	-	+	-	+++	+++	-	-
<i>S. mitis</i> F3C2v (CNCM I-4654)	++	-	+++	++	++	+++	-	++
<i>Lactobacillus</i> sp. L1C1 (CNCM I-4655)	+	-	++	+	+	+++	-	-

**EJEMPLO 2: Actividades antimicrobianas de las cepas de bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p (CNCM I-4650), *Lactobacillus salivarius* F50C2p (CNCM I-4651), *Lactobacillus salivarius* F52C3p (CNCM I-4652), *Lactobacillus salivarius* F41C3p (CNCM I-4653), *Streptococcus mitis* F3C2v (CNCM I-4654) y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 (CNCM I-4655) después de la incorporación en un vendaje**

5 Las bacterias F3C5p, F50C2p, F52C3p, F41C3p, F3C2v y L1C1 se cultivaron en medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 16 horas a 37 °C y en condiciones anaerobias. Pedazos de vendajes (1 cm x 1 cm) compuestos de espuma de poliuretano y de una trama lípido-coloide se empaparon con 500 µl de cultivo de bacterias de acuerdo con la invención (concentración comprendida entre 10<sup>9</sup> y 10<sup>10</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>) y se depositaron en la superficie de los  
10 medios de gel de agar de soja tríptica (AST) previamente sembrados en la masa con 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células de *Staphylococcus aureus* SARM CACT 43300 o *Pseudomonas aeruginosa* CACT 9027. Un control negativo se realizó depositando 500 µl de medio MRS estéril.

15 Las placas se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C durante 24 y 48 horas. Después de la incubación, la actividad antimicrobiana se puso de manifiesto por la presencia de un halo de inhibición. Después de la incubación, los halos de inhibición son visibles alrededor de los vendajes empapados con bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3p, *Lactobacillus salivarius* F41C3p, *Streptococcus mitis* F3C2v y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 (cf. figura 2). Ningún halo de inhibición es visible alrededor de los vendajes empapados con medio MRS.

20 **EJEMPLO 3: Capacidades de las cepas de acuerdo con la invención para adherirse a colágeno**

Se llevaron a cabo ensayos de adhesión de las bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3p, *Lactobacillus salivarius* F41C3p, *Streptococcus mitis* F3C2v y  
25 *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 sobre las epidermis reconstituidas de tipo Episkin (SkinEthic) (1,07 cm<sup>2</sup>) de 13 días. Los insertos que contienen las epidermis se colocaron en una placa de 12 pocillos con 2 ml de medio de mantenimiento y se incubaron durante 24 horas a 35 °C ± 2 °C con el fin de regenerar las epidermis.

30 Después de la incubación, el medio de mantenimiento se retiró y se añadieron 2 ml de medio MRS. Un medio que simula los exudados de heridas, denominado fluido de herida simulado (50/50 vol/vol) (descrito en Werthén *et al*, 2010) se inoculó a continuación con las bacterias de acuerdo con la invención (concentración de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>). Después de 24 h de incubación, las bacterias no adheridas se eliminaron por lavado con suero fisiológico. La epidermis se separó de los insertos con un escalpelo y se introdujo en un recipiente estéril que contiene 9 ml de medio MRS. Las bacterias adheridas se desprendieron por acción mecánica (baños-ultrasonidos) y  
35 se contaron por extensión en placa sobre medio de gel de agar.

Las bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3p, *Lactobacillus salivarius* F41C3p, *Streptococcus mitis* F3C2v y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 son capaces de adherirse a la epidermis y persistir durante 24 horas. La cepa *Lactobacillus saniviri* F3C5p presenta la capacidad de adhesión más importante (Cf. figura 3).

40 **EJEMPLO 4: Efecto barrera - inhibición de la adhesión de patógenos en una superficie de colágeno**

Se evaluó la capacidad de las cepas de las bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3p, *Lactobacillus salivarius* F41C3p, *Streptococcus mitis* F3C2v y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 para limitar y/o inhibir la adhesión de especies patógenas (*S. aureus* SARM CACT 43300 o *P. aeruginosa* CACT 9027) en matrices que contienen colágeno. Los ensayos se realizaron en microplacas de 24 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I (BD Biocoat™ Colágeno I).

50 Las bacterias patógenas se cultivaron durante 16 horas a 37 °C en un medio de caldo de soja tríptica (CST). Después de la incubación, los cultivos se diluyeron en medio CST a concentraciones de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> o 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. Las bacterias *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3p, *Lactobacillus salivarius* F41C3p, *Streptococcus mitis* F3C2v y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* L1C1 se cultivaron en medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 16 horas a  
55 37 °C y en condiciones anaerobias.

Para los ensayos de competencia de adhesión, las bacterias F3C5p, F50C2p y F52C3p y la bacteria patógena (*S. aureus* o *P. aeruginosa*) se añadieron simultáneamente a una concentración respectiva de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> y 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> o 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> o 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> para la bacteria patógena. Las bacterias F41C3p, y F3C2v y L1C1 y la bacteria patógena (*S. aureus* o *P. aeruginosa*) se añadieron simultáneamente a una concentración respectiva de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> y 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>.

65 Para los ensayos de exclusión, las bacterias F3C5p, y F50C2p F52C3p se introdujeron en los pocillos a una concentración de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la adhesión, los pocillos se lavaron con suero fisiológico y la cepa patógena (*S. aureus* o *P. aeruginosa*) se introdujo en los pocillos a concentraciones de aproximadamente 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> o 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> o 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>.

Las bacterias F41C3p, F3C2v y L1C1 se ensayaron a una concentración de aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup> con la cepa patógena (*S. aureus* o *P. aeruginosa*) a una concentración de aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>.

5 Para cada ensayo, después de 24 horas de contacto, las bacterias patógenas se contaron específicamente en medio Baird Parker suplementado con una emulsión de yema de huevo con telurito de potasio para *S. aureus* o medio cefalosparina/fucidina/cetrimida (CFC) para *P. aeruginosa*. Después de 24 h de incubación a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , se contaron las colonias características. Un control sin tratar con las bacterias de acuerdo con la invención se llevó a cabo para cada ensayo.

10 Las bacterias F3C5p, F50C2p, F52C3p, F41C3p, F3C2v y L1C1 permiten limitar en gran medida la adhesión de *S. aureus* y la colonización del soporte recubierto con colágeno en comparación con el control no tratado para las tres concentraciones ensayadas (Cf. figuras 4 y 5).

15 Las bacterias F3C5p, F50C2p, F52C3p, F41C3p, F3C2v y L1C1 permiten limitar la adhesión de *P. aeruginosa* y la colonización del soporte recubierto con colágeno en comparación con el control sin tratar cuando la contaminación inicial es inferior a  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> (Cf. figuras 6 y 7).

#### **EJEMPLO 5: Actividades inmunomoduladoras en los macrófagos**

20 Las cepas de *Lactobacillus saniviri* F3C5p, *Lactobacillus salivarius* F50C2p, *Lactobacillus salivarius* F52C3, *Lactobacillus pentosus/plantarum* L1C1, *Lactobacillus salivarius* F41C3p y *Streptococcus mitis* F3C2v se cultivaron en medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 16 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y en condiciones anaerobias. Las bacterias se recuperaron por centrifugación y se inactivaron por ultrasonidos o por calor ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para obtener extractos bacterianos.

25 Las células monocíticas THP1 (CACT TIB-202) se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y se diferenciaron en macrófagos mediante la adición de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Después de 24 horas de cultivo, los macrófagos obtenidos se expusieron (i) solo a extractos bacterianos, (ii) a LPS de *E. coli* O127:B8, (iii) a LPS de *E. coli* O127: B8 en presencia de extracto celular. Después de 3,5 horas de contacto, la concentración en factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor* o TNF- $\alpha$ ) se midió en el sobrenadante del cultivo mediante un método de ELISA.

30 La adición de extractos bacterianos solos no indujo una liberación significativa de TNF- $\alpha$  en comparación con el control que no contiene extracto celular y por lo tanto no induce reacción pro-inflamatoria, con la excepción de la cepa L1C1 que induce una baja liberación de TNF- $\alpha$  (concentración de 121 pg/ml).

35 La estimulación de los macrófagos con LPS de *E. coli* provoca una liberación significativa de TNF- $\alpha$  en ausencia de extractos bacterianos (concentración del orden de 500 pg/ml). La adición simultánea de los extractos celulares preparados a partir de diferentes cepas bacterianas (F3C5p, F41C3p, F50C2p, F52C3p, L1C1 o F3C2v) con LPS permite reducir de manera significativa (factor de 2 a 5 veces) la liberación de TNF- $\alpha$  por los macrófagos. Estos resultados demuestran el potencial antiinflamatorio de 6 cepas de bacterias lácticas.

Las referencias citadas en la presente solicitud son las siguientes:

- 45 1 Brachkova MI, Marques P, Rocha J, Sepodes B, Duarte MA, Pinto JF (2011). *Alginate films containing Lactobacillus plantarum as wound dressing for prevention of burn infection*. *J. Hosp. Infect.* 79: 375-377
- 2 Costerton, J.W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. *Science* 284 (5418): 1318-1322
- 50 3 Gan BS, Kim J, Reid G, Cadieux P, Howard JC (2002). *Lactobacillus fermentum RC-14 inhibits Staphylococcus aureus infection of surgical implants in rats*. *J. Infect. Dis.* 185: 1369-1372
- 4 Gueniche A, Hennino A, Goujon C, Dahel K, Bastien P, Martin R, Jourdain R, Breton L (2006). *Improvement of atopic dermatitis skin symptoms by Vitreoscilla filiformis bacterial extract*. *Eur. J. Dermatol.* 16: 380-384
- 5 Gueniche A, Buetler T, Benyacoub J, Blum S (2008a). *Lactobacillus johnsonii provides a dose-dependent protection against UVR-induced immunosuppression*. *Eur. J. Dermatol.* 18: 476-477
- 55 6 Gueniche A, Cathelineau AC, Bastien P, Esdaile J, Martin R, Queille Roussel C, Breton L (2008b). *Vitreoscilla filiformis biomass improves seborrheic dermatitis*. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22: 1014-1015
- 7 Gueniche A, Dahel K, Bastien P, Martin R, Nicolas JF, Breton L (2008c). *Vitreoscilla filiformis bacterial extract to improve the efficacy of emollient used in atopic dermatitis symptoms*. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22: 746-747
- 60 8 Gueniche A, Knautt B, Schuck E, Volz T, Bastien P, Martin R, Rocken M, Breton L, Biedermann T (2008d). *Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium Vitreoscilla filiformis lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study*. *Br. J. Dermatol.* 159: 1357-1363
- 9 Gueniche A, Bastien P, Ovigne JM, Kermici M, Courchay G, Chevalier V, Breton L, Castiel-Higounenc I (2009). *Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin*. *Exp. Dermatol.* 19: e1-8

- 10 Gueniche A, Benyacoub J, Philippe D, Bastien P, Kusy N, Breton L, Blum S, Castiel-Higounenc I (2010). *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11) inhibits substance P-induced skin inflammation and accelerates skin barrier function recovery in vitro. *Eur. J. Dermatol.* 20: 731-737
- 5 11 Halper J, Leshin LS, Lewis SJ, Li WI (2003). *Wound healing and angiogenic properties of supernatants from Lactobacillus cultures.* *Exp Biol Med* 228: 1329-1337
- 12 Oh S, Kim SH, Ko Y, Sim JH, Kim KS, Lee SH, Park S, Kim YJ (2006). *Effect of bacteriocin produced by Lactococcus sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria.* *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006) 1184-1190
- 10 13 Im E, Choi YJ, Kim CH, Fiocchi C, Pothoulakis C, Rhee SH (2009). *The angiogenic effect of probiotic Bacillus polyfermenticus on human intestinal microvascular endothelial cells is mediated by IL-8.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297: G999-G1008
- 14 Mi-Sun Kang MS, Oh JS, Lee SW, Lim HS, Choi NK, and Kim SM (2012). *Effect of Lactobacillus reuteri on the proliferation of Propionibacterium acnes and Staphylococcus epidermidis.* *The Journal of Microbiology* (2012) Vol. 50, n.º 1, págs. 137-142
- 15 15 Peral MC, Martinez MA, Valdez JC (2009). *Bacteriotherapy with Lactobacillus plantarum in burns.* *Int. Wound J.* 6: 73-81
- 16 Peral MC, Rachid MM, Gobbato NM, Huaman Martinez MA, Valdez JC (2010). *Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with Lactobacillus plantarum.* *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 281-286
- 20 17 Ramos AN, Gobbato N, Rachid M, Gonzalez L, Yantorno O, Valdez JC (2010). *Effect of Lactobacillus plantarum and Pseudomonas aeruginosa culture supernatants on polymorphonuclear damage and inflammatory response.* *Int. Immunopharmacol.* 10: 247-251
- 18 Sikorska H, Smoragiewicz W (2013). *Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant Staphylococcus aureus infections.* *International Journal of Antimicrobial Agents* 42 (2013) 475-481
- 25 19 Valdez JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdigon G (2005). *Interference of Lactobacillus plantarum with Pseudomonas aeruginosa in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment.* *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 472-479
- 20 Alberto N. Ramos, María E. Sesto Cabral, Diego Nosedá, Alejandra Bosch, Osvaldo M. Yantorno, Juan C. Valdez, (2012). *Antipathogenic properties of Lactobacillus plantarum on Pseudomonas aeruginosa: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds.* *Wound Rep Reg* (2012)
- 30

## REIVINDICACIONES

1. Bacteria seleccionada entre *Lactobacillus saniviri* registrado el 12 de julio de 2012 en la CNCM con el n.º 1-4650, *Lactobacillus salivarius* registrado el 12 de julio de 2012 en la CNCM con los n.º 1-4651, 1-4652 y 1-4653 respectivamente, *Streptococcus mitis* registrado el 12 de julio de 2012 con el n.º CNCM 1-4654 y *Lactobacillus pentosus* o *plantarum* registrado el 12 de julio de 2012 con el n.º CNCM 1-4655.
2. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como principio activo, dispositivo médico, cosmético o suplemento alimenticio o como principio activo en un medicamento, dispositivo médico, cosmético o suplemento alimenticio.
3. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso para prevenir y/o tratar una infección y/o una colonización relacionada con al menos una bacteria o una levadura seleccionada entre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.
4. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso para prevenir y/o tratar una infección y/o una colonización relacionada con *S. aureus* y/o *P. aeruginosa*.
5. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como inmunomodulador.
6. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** se aplica a la piel, en heridas, mucosas y/o faneras.
7. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, **caracterizada por que** la infección y/o la colonización se refiere a la piel, a una herida, particularmente a una herida seleccionada entre úlceras de pie diabético, úlceras de la pierna de origen arterial, úlceras de la pierna de origen venoso, escaras, panadizos, heridas agudas, heridas traumáticas y heridas post-operatorias.
8. Composición que comprende al menos una bacteria de acuerdo con la reivindicación 1.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada por que** comprende además al menos un compuesto seleccionado entre probióticos, prebióticos y levaduras.
10. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizada por que** comprende además al menos un activo seleccionado entre antifúngicos, analgésicos, antiinflamatorios, activos que favorecen la cicatrización, agentes hidratantes, agentes queratolíticos, activos reestructurantes y anestésicos.
11. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizada por que** se adapta para una aplicación tópica, oral o parenteral.
12. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizada por que** se presenta en forma de ungüento, crema, leche, pomada, polvo, tampón empapado, limpiador sin jabón, toallitas, solución, gel, pulverizador, espuma, suspensión, loción, barrita, champú, base limpiadora, comprimido, cápsula, producto alimenticio o solución inyectable.
13. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizada por que** la bacteria está presente en una cantidad comprendida entre  $10^3$  a  $10^{12}$  bacterias, preferentemente  $10^6$  a  $10^{11}$ .
14. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizada por que** la bacteria está presente en forma de célula inactivada, célula viva, lisado celular, encapsulada o no, inmovilizada o no, liofilizada o no.
15. Vendaje que comprende al menos una bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, o al menos una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 14.

Figura 1

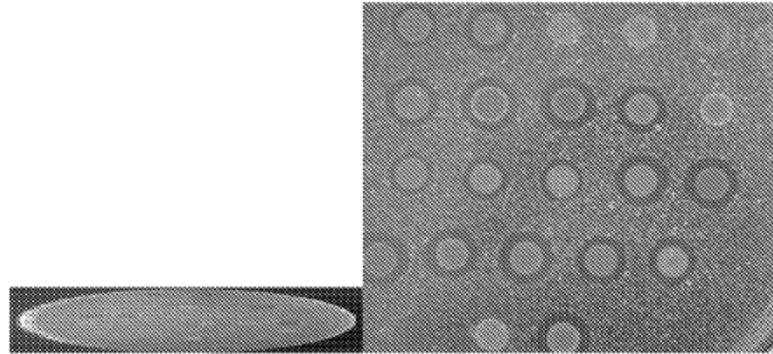
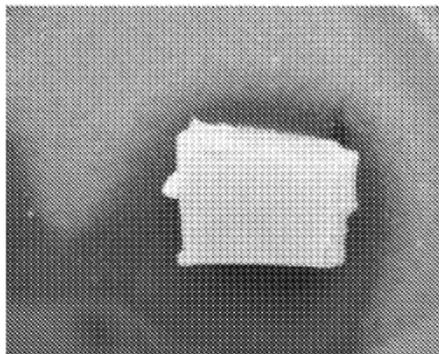
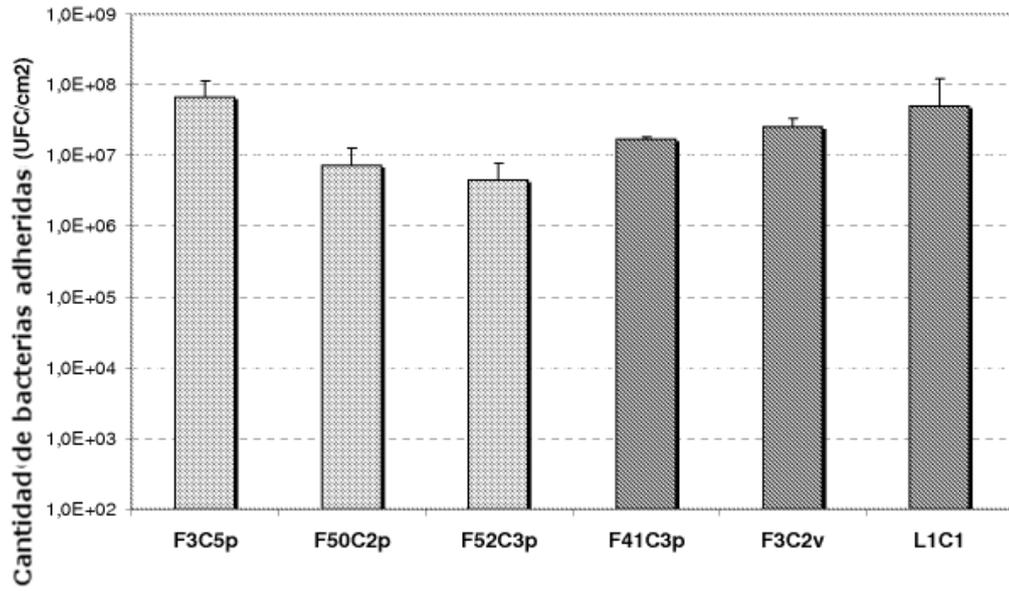


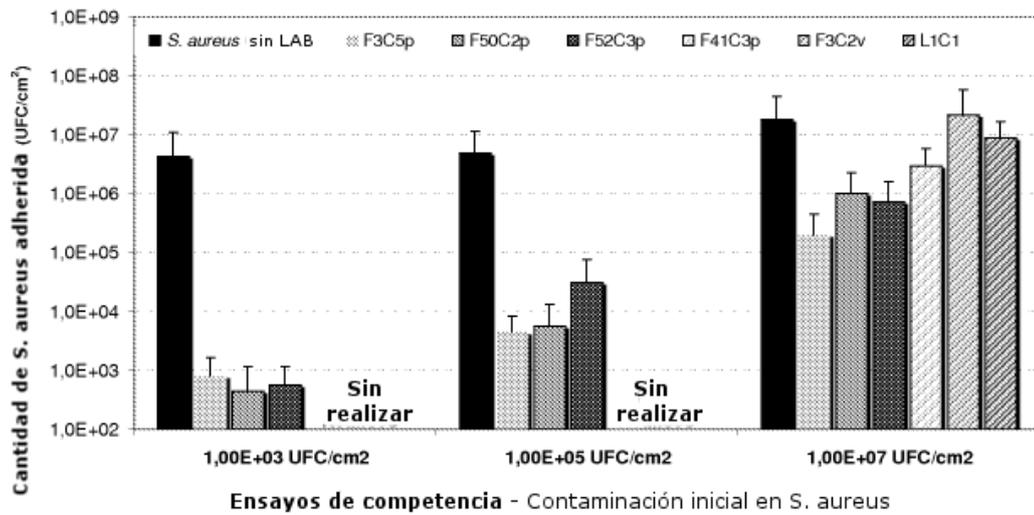
Figura 2



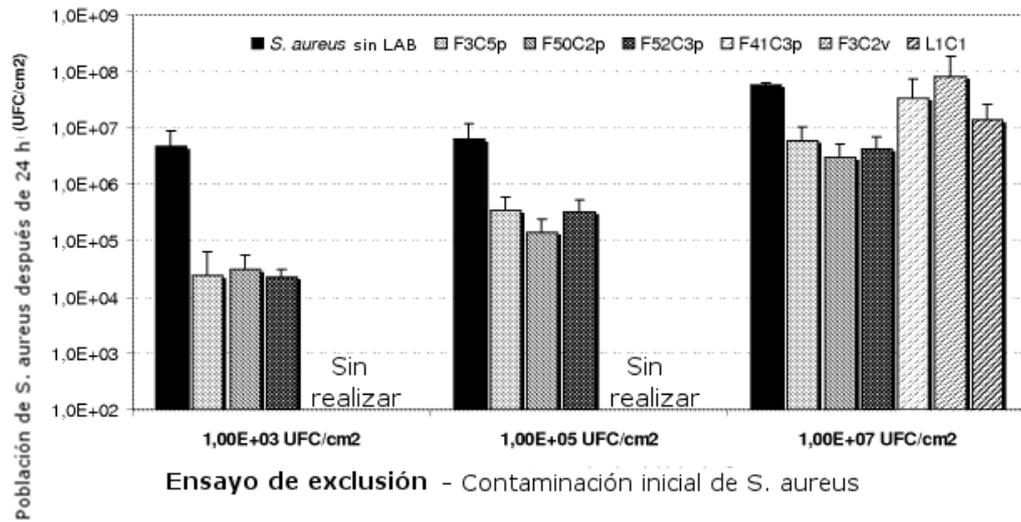
**Figura 3**



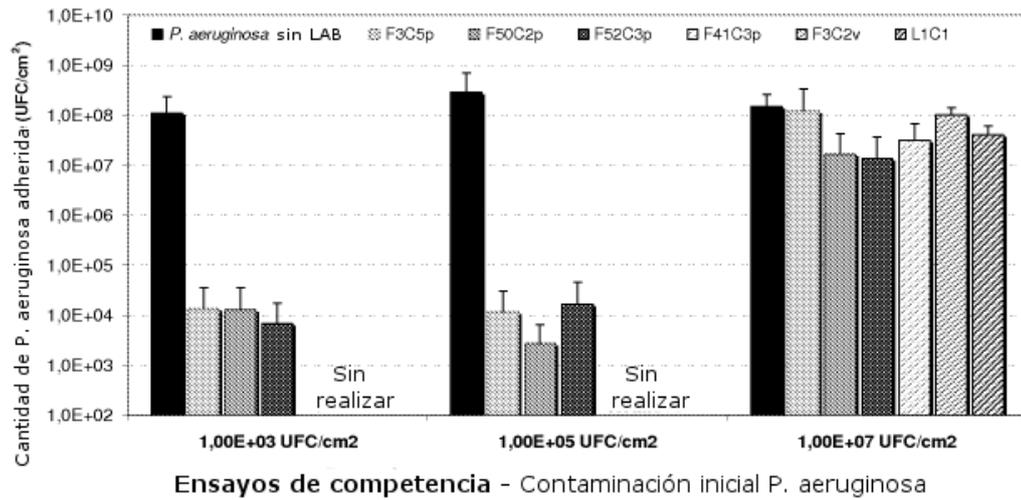
**Figura 4**



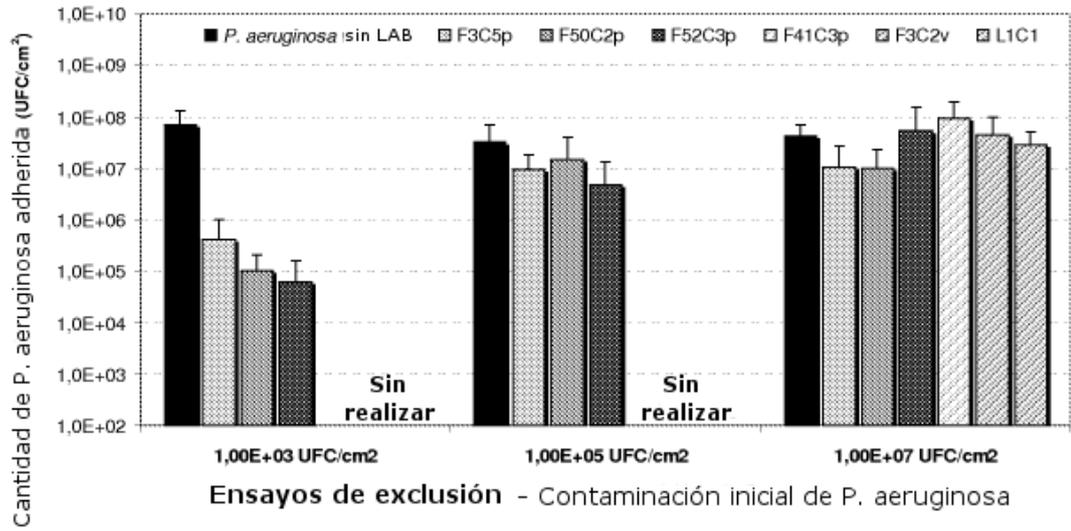
**Figura 5**



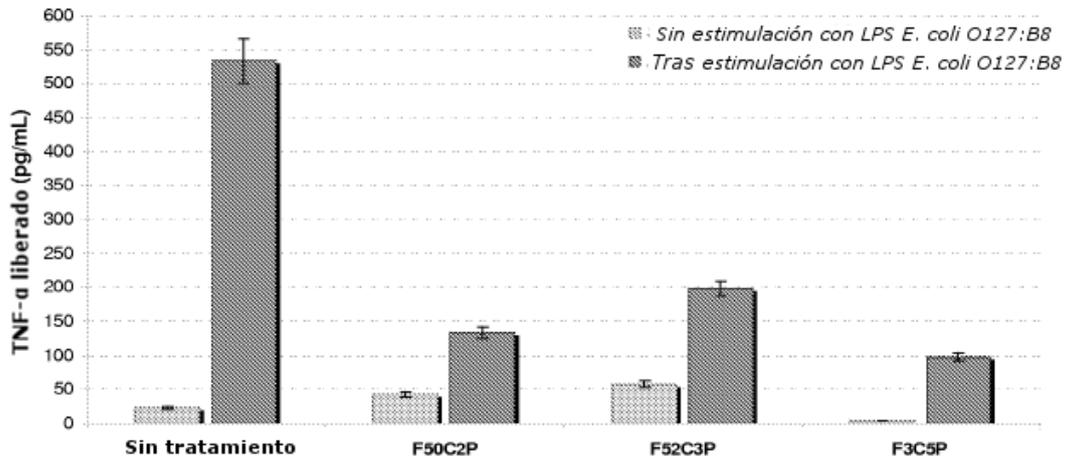
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8a**



**Figura 8b**

