

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 775**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012 PCT/EP2012/059213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12726756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2710115**

54 Título: **Nuevas bacterias del ácido láctico y composiciones que las contienen contra los resfriados bacterianos**

30 Prioridad:

**16.05.2011 EP 11166203**

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

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**BELANO MEDICAL AG (100.0%)  
Neuendorfstrasse 16b  
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**LANG, CHRISTINE;  
RAAB, ANDREAS y  
BOLOTINA, NATALIA**

74 Agente/Representante:

**GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando**

ES 2 660 775 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

Nuevas bacterias del ácido láctico y composiciones que las contienen contra los resfriados bacterianos

5 La presente invención se refiere a un microorganismo del orden de las bacterias del ácido láctico o en las que el microorganismo puede coagregarse con *Streptococcus pyogenes*. Además, la invención se refiere a composiciones que contienen estas bacterias del ácido láctico o su lisado celular, en particular, para su uso en la higiene personal y en el tratamiento de enfermedades. En particular, la presente invención se refiere al uso de nuevas bacterias del ácido láctico y/o las composiciones que las contienen para el tratamiento y/o la prevención de todas las enfermedades que pueden estar causadas por *Streptococcus pyogenes*.

Además, el desarrollo descrito en el presente documento es un innovador producto biológico en forma de microorganismos GRAS y/o bacterias del ácido láctico, que se puede usar como un aditivo antimicrobiano con una acción específica para la prevención y el tratamiento local de inflamaciones en la zona de la boca y de la garganta, es decir, en el espacio orofaríngeo, y para infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel.

Además, la presente invención se refiere al uso de la bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la invención, en composiciones o productos farmacéuticos o productos médicos (higiene oral), por ejemplo, en forma de pulverizados, enjuagues bucales o como grageas o comprimidos para la garganta, pastillas, píldoras recubiertas, aerosoles, pastas de dientes, zumos, jarabes o como un aditivo para alimentos y/o como complementos alimentarios.

## Antecedentes

25 La mayoría de las personas han tenido dolor de garganta o amigdalitis (faringitis) alguna vez. Estas enfermedades pueden tener causas víricas y bacterianas. Aproximadamente el 20-30 % de los casos de dolor de garganta y amigdalitis son de origen bacteriano. En cualquier caso, esto implica una infección por *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes* es una de las bacterias patógenas humanas más comunes. La faringitis bacteriana se transmite por una infección de gotitas. Los niños y adolescentes con edades comprendidas entre los 5 y 15 años son el grupo más comúnmente afectado por esta infección, pero los ancianos también están en riesgo de infección en condiciones de hacinamiento humano (Bisno, 1995). El número de infecciones por *S. pyogenes* en Estados Unidos se estima en 10 millones al año (Kilian, 2002). Los costes asociados se estiman en aprox. mil millones de dólares anuales en Estados Unidos (Reid *et al.*, 2001). El número de casos de faringitis estreptocócica aguda en Alemania se estima entre 1 y 1,5 millones al año. Solo una parte de las infecciones tiene un curso clínicamente manifiesto, es decir, el reservorio de patógenos transmitidos es mayor.

*Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A, también conocido como GAS) es un patógeno humano que pertenece a los cocos Gram-positivos que forman cadenas largas. Al igual que muchos otros patógenos, los estreptococos también tienen la capacidad de expresar múltiples factores de virulencia. La primera etapa en el curso de la patogénesis de *Streptococcus pyogenes* es la adhesión de las bacterias a la superficie de las células hospedadoras. De acuerdo con un modelo ampliamente aceptado, la adhesión tiene lugar en dos etapas: la primera etapa consiste en una interacción débil, relativamente inespecífica con la superficie de las células humanas, que da lugar inmediatamente a una interacción específica de tejido con una alta afinidad (Hasty *et al.* 1992; Courtney *et al.* 1999; Cunningham 2000). Ya en 1976, Beachey *et al.* fueron capaces de identificar el ácido lipoteicoico (LTA) como una molécula que media la adhesión inicial a nivel bacteriano. A nivel epitelial, la fibronectina se ha identificado como el receptor para el LTA (Simpson y Beachey, 1983). Se han identificado al menos otras 11 estructuras en la superficie bacteriana que confieren unión a las células epiteliales durante la segunda etapa de adhesión. La segunda etapa en la patogénesis debida a *Streptococcus pyogenes* es la invasión de las bacterias en las células epiteliales del hospedador (LaPenta *et al.*, 1994). LaPenta y colaboradores han demostrado que el GAS puede infectar células epiteliales humanas con frecuencias que a veces son superiores a las de los patógenos humanos intracelulares tradicionales como *Salmonella* o *Listeria*.

Las bacterias patógenas de dentro de una célula hospedadora tienen un alto potencial de replicación, lo que puede dar lugar a una infección aguda. La supervivencia en estado latente puede conducir a la aparición renovada de infecciones bacterianas de las membranas mucosas y el epitelio, lo que puede explicar las infecciones recurrentes de la mucosa orofaríngea. La angina en particular es una infección recurrente que suele estar causada por GAS en los niños.

*Streptococcus pyogenes* es el agente etiológico de muchas enfermedades agudas como la faringitis, la escarlatina, el impétigo y la celulitis. Las infecciones toxigénicas invasivas, como la fascitis necrosante, la miositis y el síndrome de shock tóxico inducido por *Streptococcus*, así como el desarrollo de secuelas inmunomediadas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis, están causadas por *Streptococcus pyogenes*.

Se estima que entre el 5 % y el 15 % de la población, en general, son portadores de esta bacteria (en general, en la garganta) sin ningún signo de enfermedad. Como componente de la flora normal, *Streptococcus pyogenes* puede causar una infección cuando el sistema inmunitario se debilita. La colonización del tejido (por ejemplo, el tracto

respiratorio o la piel) con *Streptococcus pyogenes* sigue al brote de la enfermedad, asociada con los síntomas relevantes tales como garganta irritada, dolor de garganta y dificultad para tragar.

5 Además, las infecciones por *Streptococcus pyogenes* pueden provocar complicaciones debido a la propagación de la infección por las vías respiratorias inferiores (otitis media, sinusitis, neumonía) o por el torrente circulatorio, así como a meningitis e infecciones de los huesos (osteomielitis) y de las articulaciones (artritis).

10 Un elemento en la colonización es la adhesión bacteriana a la superficie celular y/o a la superficie de las mucosas. La bacteria tiene un gran repertorio de adhesiones que median la unión a las superficies celulares (por ejemplo, la proteína M, proteína de unión a fibronectina, LTA, proteína de unión al colágeno). La interacción, es decir, la unión a las superficies celulares, desempeña un papel inicial en la colonización de las células hospedadoras, así como en la patogénesis de *Streptococcus pyogenes*.

15 Por consiguiente, el uso precoz de agentes terapéuticos para la prevención y el tratamiento es de crucial importancia para reducir el recuento de microbios de GAS total y para prevenir de manera eficaz la unión, es decir, la invasión de *Streptococcus pyogenes*.

20 Los agentes terapéuticos capaces de aliviar los síntomas causados por *Streptococcus pyogenes* en la zona de la garganta se han descrito en la técnica anterior.

### Técnica anterior

25 El tratamiento convencional de una enfermedad aguda es administrar antibióticos. Debido a la mayor incidencia de resistencia a la penicilina desde mediados de la década de los 80 del siglo pasado, entre otras razones, esta enfermedad ha vuelto a avanzar en los países industriales en las últimas décadas (Kaplan, 1991; Musser y Krause, 1998). No hay prevención porque, hasta la fecha, no se ha desarrollado una vacuna que funcione. Esto se debe a la diversidad del antígeno principal usado, la proteína M de la pared celular bacteriana y la reactividad cruzada inmunológica de los otros candidatos antigénicos con las proteínas humanas.

30 Se ha demostrado que, en general, la infección disminuye en la mayoría de los pacientes, a pesar del tratamiento con antibióticos (en general, penicilina o eritromicina), que pueden tener efectos secundarios masivos.

35 Los preparados actualmente disponibles en el mercado incluyen esencialmente grageas, comprimidos, enjuagues de garganta y pulverizados para la garganta, en algunos casos, mezclados con anestésicos locales (lidocaína, benzocaína), que provocan síntomas breves de alivio en la zona de la garganta, pero estos preparados no matan a *Streptococcus pyogenes*.

40 Las bacterias del ácido láctico, en general, se usan como bacterias probióticas para la protección contra enfermedades gastrointestinales causadas por patógenos, porque, con frecuencia, también producen sustancias antibacterianas además del ácido láctico. Los lactobacilos (bacterias del ácido láctico) son bacterias Gram-positivas de anaeróbicas a aerotolerantes que son capaces de metabolizar el azúcar en ácido láctico (fermentación del ácido láctico). Estas incluyen las familias *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. Se considera que son apatógenas, y se usan como bacterias probióticas, en general, para mejorar la flora gastrointestinal y en el tratamiento de los síntomas gastrointestinales. Los lactobacilos son importantes, en particular, para la industria alimentaria, en la que desempeñan un papel importante en el campo de los "alimentos funcionales". En el pasado, la especie *Bifidobacterium bifidum* se clasificó con los lactobacilos (*Lactobacillus bifidum*), pero, de acuerdo con los conocimientos actuales, esta especie no está estrechamente relacionada filogenéticamente con ese orden. Sin embargo, todavía se considera que es una bacteria del ácido láctico con respecto al metabolismo. Las bacterias del ácido láctico también son extremadamente importantes en la industria alimentaria, porque se usan para producir productos lácteos, pero también pueden aparecer como plagas (por ejemplo, en una cervecería). Las bacterias del ácido láctico se clasifican como apatógenas.

50 En la técnica anterior, se ha descrito el uso de bacterias probióticas para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, el documento WO 2010/130563 desvela el uso de bacterias probióticas para agentes de lavado de vajillas, reduciendo de este modo las consecuencias negativas del lavado manual de la vajilla para la piel. Además, estas bacterias tienen un efecto protector sobre la piel.

60 El uso de dichos microorganismos en agentes cosméticos para el tratamiento de la piel ya es conocido. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.790.434 describe el uso de dichos microorganismos en agentes cosméticos para el tratamiento de la piel en combinación con un extracto de matriz extracelular vegetal para contrarrestar el daño producido en la piel causado por la radiación UV. Sin embargo, en dicho documento, no se describe el uso de estos microorganismos en detergentes y agentes de limpieza.

65 Además, también se conoce el uso de ciertas especies de *Bacillus* en agentes de limpieza sanitaria. Por lo tanto el documento WO97/25865 describe el uso de especies de *Bacillus* en agentes de limpieza con fines sanitarios, en el que se supone que deben prevenir la reproducción de patógenos y degradar la suciedad orgánica. Los usos

desvelados suelen incluir bacterias inactivadas en forma de esporas. Las esporas se reactivan mediante sustratos y no deben reproducirse debido a defectos genéticos. Sin embargo, la desventaja en este caso es que no se puede descartar la reproducción y/o la mutación de las bacterias por completo, por lo que sigue existiendo un riesgo residual de que las bacterias también puedan reproducirse de manera incontrolada.

5 Entretanto, se ha descrito una forma farmacéutica oral de bacterias probióticas en el documento WO 2005/117921, en el que la forma farmacéutica contiene al menos un género de microorganismos probióticos, en el que la forma farmacéutica y/o las bacterias se proporciona/n con un recubrimiento que contiene éter de celulosa.

10 Los experimentos *in vitro* han demostrado que unas cuantas cepas de *Lactobacillus* son capaces de prevenir la unión de GAS a estirpes celulares humanas. Las cepas de *Lactobacillus* compiten con GAS por estructuras superficiales en las células y evitan así que GAS invada las células hospedadoras. La adhesión de *Streptococcus pyogenes* a la célula hospedadora es la primera etapa de la patogénesis, y el proceso de invasión de las células hospedadoras tiene lugar en muy poco tiempo, por lo que este método se considera una desventaja en el  
15 tratamiento de las infecciones por GAS. La coagregación de células planctónicas de *Streptococcus pyogenes* sería deseable en este caso antes de que tuviera lugar la unión a la superficie celular y se pudiera inducir una respuesta inmune.

20 El objeto de la presente invención es proporcionar un agente o una composición para el tratamiento y la prevención de infecciones por *Streptococcus pyogenes* que no presente los inconvenientes ni las desventajas de la técnica anterior.

### Sumario de la invención

25 Este objeto se logra mediante las reivindicaciones independientes. Las realizaciones ventajosas se derivan de las reivindicaciones dependientes.

30 En un primer aspecto, la invención se refiere a una bacteria del ácido láctico o su lisado celular para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades microbianas de la piel, membranas mucosas y/o cavidad oral, en el que la bacteria del ácido láctico puede coagregarse con al menos un microorganismo patógeno, de manera que el microorganismo patógeno sea *Streptococcus pyogenes* y la bacteria del ácido láctico se seleccione del grupo que comprende los siguientes microorganismos depositados en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, y numerados como DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973. Fue completamente sorprendente que un microorganismo que se une a *Streptococcus pyogenes* pudiera estar  
35 disponible, siendo este microorganismo una bacteria del ácido láctico.

40 También fue completamente sorprendente que, en una realización preferida con la bacteria del ácido láctico o su lisado celular, la capacidad de coagregación del microorganismo patógeno exista incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico. La capacidad de coagregación del microorganismo patógeno existe incluso a un pH entre aprox. 3 y aprox. 8. Es preferible que la bacteria del ácido láctico tenga la capacidad de inhibir la formación de una biopelícula del microorganismo patógeno. También es preferible que la bacteria del ácido láctico o su lisado celular tengan la capacidad de evitar que *Streptococcus pyogenes* se una a la fibronectina. En una realización preferida, la bacteria del ácido láctico o sus lisados celulares no tienen la capacidad de coagregarse con microorganismos comensales de la piel o las membranas mucosas.

45 La bacteria del ácido láctico se selecciona ventajosamente del grupo que comprende los siguientes microorganismos que se han depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares con los números DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos una bacteria del ácido láctico o su lisado celular. La composición puede comprender preferentemente un vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable. Es preferible que la composición esté presente en forma sólida, líquida, viscosa o en forma de aerosol. La composición está preferentemente en forma de pastas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, polvos, gránulos, perlas, pastillas, comprimidos efervescentes, grageas, comprimidos bucales,  
55 comprimidos masticables, comprimidos sublinguales, soluciones, tinturas, emulsiones, zumos, concentrados, jarabes, pulverizados, ampollas bebibles, geles, enjuagues bucales, polvos dentales, chicle, comprimidos, píldoras recubiertas o caramelos.

60 La composición puede comprender ventajosamente probióticos, antisépticos u otras sustancias antibacterianas activas y/o preferentemente también puede contener una o más de las siguientes sustancias seleccionadas entre antioxidantes, vitaminas, coenzimas, ácidos grasos, aminoácidos y cofactores.

65 En una realización preferida de la invención, la composición es una composición farmacéutica, veterinaria o cosmética, o un suplemento alimentario o una composición de suplemento alimentario. La composición contiene preferentemente uno o más espesantes, uno o más edulcorantes y/o uno o más edulcorantes artificiales, en los que el espesante se selecciona preferentemente entre éter de celulosa, polisacáridos, seleccionados del grupo que

comprende goma de xantano, gelatina, dióxido de silicio altamente dispersado, almidón, alginatos, tragacanto, agar, goma arábiga, pectina y polivinilésteres, y el edulcorante se selecciona del grupo que comprende glucosa, fructosa, sacarosa y jarabe de glucosa, sorbitol, manitol, xilitol y maltitol, sacarina, ciclamato sódico, acesulfamo K y/o aspartamo.

5 Los productos farmacéuticos preferidos en el sentido de la invención incluyen enjuagues nasales, enjuagues bucales y enjuagues dentales; soluciones para gárgaras, pulverizados nasales, pulverizados bucales, pulverizados para la garganta, gotas nasales, gotas, tinturas, zumos o jarabes para la tos, el dolor de garganta, los resfriados o las infecciones en la boca, garganta o cuello, comprimidos para la garganta, caramelos, caramelos masticables, píldoras recubiertas y pastillas para los síntomas de garganta o el dolor de garganta, así como los aerosoles.

15 Los productos médicos preferidos en el sentido de la invención comprenden enjuagues nasales, enjuagues bucales y enjuagues dentales; soluciones para gárgaras, pulverizados nasales, pulverizados bucales, pulverizados para la garganta, gotas nasales, gotas, tinturas, zumos o jarabes para la tos, para el dolor de garganta, los resfriados o las infecciones de boca, de cuello o de garganta, comprimidos para la garganta, caramelos, caramelos masticables, píldoras recubiertas y pastillas para los síntomas de garganta o el dolor de garganta, así como aerosoles.

20 Los productos cosméticos preferidos en el sentido de la invención comprenden pasta de dientes, lociones, mezclas para agitar, polvos, enjuagues nasales, enjuagues bucales y enjuagues dentales, soluciones para gárgaras, pulverizados nasales, pulverizados bucales, pulverizados para la garganta, chicle, hidrogel, cremas, cresa, pomada, pomada o pasta a base de grasa para su aplicación en la superficie de la piel.

25 Los alimentos preferidos y los suplementos nutricionales en el sentido de la invención comprenden comprimidos efervescentes, comprimidos de vitaminas, comprimidos minerales, comprimidos de oligoelementos, bebidas en polvo, bebidas, zumos, bebidas lácteas, yogures, agua mineral, agua sin gas, caramelos, caramelos masticables, chicle, zumo o jarabe, comprimidos para la garganta, píldoras recubiertas y pastillas, así como aerosoles. Además, la composición también puede contener aditivos, enzimas, electrolitos, reguladores del pH, espesantes, agentes de desprendimiento de la suciedad, abrillantadores ópticos, inhibidores del encanecimiento, inhibidores de la transferencia de colorante, reguladores de la espuma y/o agentes colorantes.

30 La bacteria del ácido láctico puede estar ventajosamente presente en forma viable o muerta en la composición. Además, puede ser preferible que la bacteria del ácido láctico esté presente en una forma encapsulada, secada por pulverización y/o liofilizada, y también puede ser preferible que el microorganismo esté presente en forma de un lisado celular. Además, es preferible que la bacteria del ácido láctico esté presente en la composición en una cantidad con una cantidad en peso del 0,001 % en peso al 20 % en peso, preferentemente del 0,005 % en peso al 35 10 % en peso, en especial, preferentemente del 0,01 % en peso al 5 % en peso.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de identificación y/o selección de una bacteria del ácido láctico que tiene la propiedad de agrupar *Streptococcus pyogenes*, en el que el método comprende al menos las siguientes etapas:

- a. incubar el microorganismo patógeno para formar una biopelícula;
- 45 b. añadir una bacteria del ácido láctico para su ensayo e incubarla para formar una mezcla para el desarrollo de la coagregación entre el microorganismo patógeno y la bacteria del ácido láctico que se va a ensayar;
- c. separar las bacterias del ácido láctico no unidas mediante la retirada del sobrenadante; y
- 50 d. determinar la biopelícula con respecto a las bacterias del ácido láctico agrupadas.

Además, el método también puede comprender la siguiente etapa de proceso:

- 55 - examinar la inhibición de la biopelícula debida a los microorganismos patógenos, donde las bacterias del ácido láctico que se van a examinar se añaden durante la incubación de los microorganismos patógenos que forman la biopelícula y/o preferentemente,
- cuantificar la formación de la biopelícula tras la retirada de las células no unidas midiendo la densidad óptica en comparación con un control sin adición de las bacterias del ácido láctico que se van a ensayar.

60 Además, la invención se refiere al uso de la composición para producir un fármaco, un producto médico o un cosmético para el tratamiento, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades microbianas de la piel, de las membranas mucosas y de la cavidad oral.

65 La composición preferida también se puede usar para la profilaxis y/o el tratamiento por vía tópica de enfermedades microbianas de enfermedades inflamatorias de la piel, de las membranas mucosas y de la cavidad oral. Es preferible que la composición se use para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades microbianas de la cavidad oral y

también comprenda una o más sustancias aromatizantes. Además, es preferible que la composición se use para la prevención y/o el tratamiento por vía tópica de enfermedades microbianas o enfermedades inflamatorias, preferentemente enfermedades microbianas o enfermedades inflamatorias de la cavidad oral, en las que la composición se usa en forma de una masa masticable, un chicle, un caramelo, una pastilla, pasta de dientes o un enjuague bucal.

Puede ser ventajoso el uso de una o más sustancias antiinflamatorias o antimicrobianas en la composición. Además, puede ser preferible que la composición se use en combinación con disolventes, vehículos, excipientes, cargas, sustancias aromatizantes, sustancias aromáticas y/o ingredientes adicionales. En una realización preferida, la composición se puede usar para preparar un agente de limpieza o un desinfectante para el tratamiento de superficies. También es preferible que la composición se use para producir un producto que se use en el campo de los productos médicos y/o de la prevención. Es preferible si la composición se usa para preparar un agente para la ingestión oral, sublingual y bucal.

En una realización preferida, la composición se puede usar para producir un aditivo antimicrobiano para el tratamiento tópico de inflamaciones producidas en el espacio orofaríngeo y para infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel. Una composición preferida se usa profiláctica o curativamente en particular. Puede ser preferible aplicar la composición por vía oral, sublingual o bucal.

Además, la invención se refiere a un kit para un tratamiento higiénico que comprende bacterias del ácido láctico preferidas o una composición preferida para dispositivos o aparatos de higiene física, enjuagues y/o pastas. El kit se puede usar para el tratamiento de infecciones bacterianas en la zona de la boca o de la garganta, en el que las infecciones están causadas, en particular, por *Streptococcus pyogenes* o esta especie al menos participa en la infección.

La presente invención se refiere preferentemente a nuevas bacterias del ácido láctico, así como a composiciones que las contienen, en particular, para su uso en el tratamiento o la prevención en bebés, niños pequeños, niños, personas sanas, ancianos, personas inmunodeprimidas, personas con infecciones por *Streptococcus pyogenes* de ocurrencia única o recurrentes y/o personas con infecciones bacterianas de garganta y amígdalas (faringitis). La invención también puede usarse sorprendentemente para los animales.

Por consiguiente, es preferible usar la composición para preparar un fármaco que sea beneficioso para el tratamiento o la prevención de los síntomas de garganta, dolor de garganta, enrojecimiento de la garganta, así como inflamaciones purulentas y no purulentas de la garganta y de las amígdalas, en las que es deseable la administración de bacterias del ácido láctico. La composición preferida se puede usar curativa o profilácticamente, por ejemplo, como un probiótico.

Las bacterias del ácido láctico preferidas, en particular, tienen la capacidad de la coagregación, uniéndose específicamente a *Streptococcus pyogenes*. Fue completamente sorprendente que las bacterias del ácido láctico preferidas no causaran ninguna coagregación ni unión de microorganismos comensales tales como *Streptococcus salivarius*. *Streptococcus salivarius* se encuentra en las membranas mucosas de la zona de la garganta de los seres humanos sanos y contribuye a que tengan un equilibrio microbiano saludable, por lo que su agregación no se prefiere dentro del contexto de la presente invención.

En otras palabras, las bacterias del ácido láctico preferidas se coagregan, específicamente con la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*. Nada de este tipo puede derivarse de la técnica anterior. La técnica anterior solo describe bacterias del ácido láctico que previenen la invasión y la replicación de *Streptococcus pyogenes* en y/o en estirpes celulares humanas. Sin embargo, la adhesión es la primera etapa esencial de la patogénesis bacteriana, por lo que este enfoque no podría usarse sin que tuviera efectos secundarios. Por el contrario, las bacterias del ácido láctico preferidas tienen una coagregación específica con las células planctónicas de *Streptococcus pyogenes*, representadas como ejemplo en las cepas que tienen los números DSM ATCC 12344 y ATCC 19615 antes de poderse unir a las células hospedadoras. Por lo tanto, la presente invención se puede considerar una desviación de la habitual, porque existe una tendencia en la técnica anterior a reducir la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales. Sin embargo, no se ha informado que las células patógenas se puedan agrupar en la cavidad oral, por lo que la unión a las células epiteliales no puede tener lugar desde el principio. Esto también tiene la importante ventaja de que los agregados celulares se ingieren con la saliva o mediante un enjuague bucal, y las células de *Streptococcus pyogenes* se destruyen durante la etapa gastrointestinal. Por lo tanto, esta es una aplicación fácil de usar, porque, en general, se percibe como desagradable e inconveniente tener que escupir el enjuague bucal, por ejemplo. Nada de este tipo es necesario para el uso preferido.

Los expertos en la materia saben que la piel y/o las membranas mucosas sanas está/n densamente poblada/s de microorganismos tales como bacterias y hongos, que se denominan comensales y/o mutuos. Estos microorganismos constituyen un componente natural de la superficie de la piel y se denominan colectivamente, en particular, flora de la piel. Los microorganismos que se incluirán bajo el título de flora autóctona son un importante requisito previo para proteger la piel y el cuerpo en su conjunto de los microorganismos patógenos, y forman parte del microbioma. En este sentido, es especialmente ventajoso que las bacterias del ácido láctico preferidas no creen un desequilibrio en

la flora de la piel, sino que simplemente se unan y/o se agrupen con la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*.

No menos importante, las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención evitan la unión a la fibronectina y así evitan la invasión de las células. Debido al hecho de que las bacterias del ácido láctico preferidas se coagregan con *Streptococcus pyogenes* y/o tienen propiedades adhesivas con respecto a estas bacterias, esto conduce a un enmascaramiento, en particular, y a la ocultación de factores de patogenicidad, lo que conduce a una reducción de la carga bacteriana y/o a la inhibición de la unión a la fibronectina y/o a las células de la zona de la garganta.

Aunque la presente invención se refiere a un grupo de bacterias del ácido láctico en particular, coincide con la enseñanza de acuerdo con la solicitud de patente. Las bacterias del ácido láctico reivindicadas tienen una propiedad o efecto común. La suma de las características comunes estructurales o funcionales conduce a la relación funcional de coagregación de *Streptococcus pyogenes*, la no unión de microorganismos comensales de la piel y/o de las mucosas y la prevención de la unión a la fibronectina por *Streptococcus pyogenes*. Por lo tanto, las características comunes no representan una suma arbitraria de características, sino que constituyen la identificación genética común de los microorganismos reivindicados, por así decirlo, lo que permite y caracteriza ventajosamente la idoneidad de estas bacterias del ácido láctico para este fin. Además, se ha descubierto que, sorprendentemente, la propiedad sorprendente de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, en concreto, la coagregación de *Streptococcus pyogenes*, no se inhibe en la saliva ni en presencia de azúcares. Esto es ventajoso, en particular, porque el sitio de uso preferido de las bacterias del ácido láctico y la composición está en la cavidad oral, y se sabe por la técnica anterior que los procesos de coagregación, en general, se inhiben mediante altas concentraciones de azúcar. Sin embargo, los ensayos han demostrado que este no es el caso para las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, porque se siguen agrupando con *Streptococcus pyogenes*, incluso a altas concentraciones de azúcar (como las que se producen en la saliva, por ejemplo, así como en posibles formas farmacéuticas tales como comprimidos efervescentes, comprimidos de vitaminas, comprimidos minerales, comprimidos de oligoelementos, bebidas en polvo, bebidas, zumos, bebidas lácteas, yogures, caramelos, caramelos masticables, chicles, zumos o jarabes, comprimidos para la garganta, píldoras recubiertas y aerosoles).

También fue sorprendente que las bacterias del ácido láctico preferidas también se pudieran usar en la piel, donde también se coagregan con *Streptococcus pyogenes*. Los expertos en la materia saben que *Streptococcus pyogenes* también se conoce como un organismo patógeno de las heridas, por lo que es especialmente ventajoso que la capacidad de coagregación de las bacterias del ácido láctico preferidas no se limite a la cavidad oral, sino que también se pueda aplicar a zonas cutáneas.

La presente invención también se refiere a bacterias del ácido láctico o a su lisado celular, así como a composiciones que las contienen, en particular, para su uso en el tratamiento o la prevención en bebés, niños pequeños, personas sanas, ancianos, personas inmunodeprimidas, personas con cambios patológicos en la piel (en particular, síndrome de la piel escaldada estafilocócica, impétigo contagioso, foliculitis superficial, impetiginización, abscesos cutáneos, forúnculos (furunculosis), carbuncos (abscesos), flemones, piel seca, piel con picor, piel enrojecida, piel irritada, piel extremadamente grasa, acné, pie diabético, úlceras decúbito, neurodermatitis, linfadenitis aguda, quistes pilonidales (incluyendo las fistulas pilonidales, el seno pilonidal, la fistula coccígea, los quistes coccígeos), otras infecciones locales de la piel y del tejido subcutáneo (por ejemplo, pioderma, dermatitis purulenta, dermatitis séptica, dermatitis supurativa); también se pueden usar para tratar las diversas formas de dermatitis y eczema (por ejemplo, eczema atópico, eczema seborreico, erupción o dermatitis del pañal, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis seborreica, dermatitis exfoliativa, dermatitis de contacto tóxica, liquen simple crónico, prurigo, prurito y otras formas de dermatitis); también enfermedades papuloescamosas de la piel (soriasis, parasoriasis), enfermedades de los apéndices integumentarios (por ejemplo, alopecia con cicatrización incluyendo foliculitis decalvans), más otras enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (por ejemplo, úlceras cruales), personas con daño cutáneo preexistente (por ejemplo, piel seca), lesiones de la piel (por ejemplo, costras, heridas, incluso después de accidentes o cirugía) en seres humanos o en animales comerciales y mascotas.

En el sentido de la presente invención, se entiende que la piel, en las realizaciones preferidas, es, en particular, el órgano externo del cuerpo humano o animal que sirve para delimitar el interior desde el exterior. En realizaciones preferidas, una zona de piel en el sentido de la presente invención incluye componentes de la capa superior de la piel, el corion o piel verdadera o el tejido subcutáneo. La capa superior de la piel (epidermis) también consiste en las siguientes capas de acuerdo con la invención: el estrato córneo (capa córnea), el estrato lúcido (capa transparente), el estrato granuloso (capa granular), el estrato espinoso (capa espinosa) y/o el estrato basal (capa basal). Cada modificación de las células de esta zona constituye una modificación celular en una zona de la piel en el sentido de la presente invención. De acuerdo con la invención, la dermis o corion, que también puede ser un componente de la zona de la piel, preferentemente consiste en fibras de tejido conjuntivo, y sirve para proporcionar alimento y anclaje a la epidermis. El sistema de vasos capilares de la zona que limita con la epidermis también pertenece a una zona de la piel en el sentido de la invención, al igual que las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas o glándulas sudoríparas. La dermis en el sentido de la presente invención se puede subdividir en un estrato papilar y un estrato reticular. Además, una zona de piel en el sentido de la invención puede ser cualquier zona, es decir, cualquier ubicación en o sobre el tejido subcutáneo (subcutis) o tejido del interior del organismo, o cualquier órgano o componente orgánico. Una barrera de tejido que delimita un órgano de las estructuras circundantes puede ser una piel en el sentido de la presente invención. Además, también puede entenderse que el concepto de la invención de

una zona de la piel incluye apéndices integumentarios tales como cabello, glándulas sebáceas, músculos piloerectores, uñas, cuernos y glándulas sudoríporas, en particular, las glándulas sudoríporas ecrinas y apocrinas, pero también las glándulas mamarias. Cualquier modificación celular, en particular, un crecimiento celular que se desvíe de la normal, se puede tratar con los agentes de acuerdo con la invención, preferentemente sin limitarse a las zonas externas de la piel. Sin embargo, las zonas de la piel en el sentido de la presente invención también pueden incluir el corion, tal como el de los dedos o las plantas de los pies, y la piel con malla y los apéndices integumentarios asociados con la misma.

La composición preferida puede estar contenida en un jabón, una loción, un polvo, un detergente sintético, una espuma, un filamento, una emulsión, un pulverizado, una crema, un gel, un champú, un jabón líquido o un desodorante en particular. También es preferible que la composición se use, en particular, como un probiótico que se puede añadir como detergente, agente de aclarado, agente de limpieza o desinfectante (por ejemplo, jabones, polvos, pastas, soluciones, emulsiones, lociones), limpieza y/o paños o toallas de desinfección, champús, enjuagues o aplicaciones para la piel, el cabello y/o el cuero cabelludo, cremas, pomadas, lociones para la limpieza de la piel y/o lociones para el cuidado de la piel, soluciones (por ejemplo, en forma de gotas, pulverizados, enjuagues) para su uso en o sobre los ojos, oídos, boca, nariz o garganta y/o pueden incorporarse a vendajes o apósitos para heridas para suprimir la formación de microorganismos patógenos, unirlos, retirarlos en forma de un agregado y/o inhibirlos o matarlos y, por lo tanto, para reducir sus números.

Resultó completamente sorprendente que las ventajas de la composición de acuerdo con la invención pudieran mejorarse una vez más mediante su incorporación en las formas farmacéuticas mencionadas anteriormente. Los expertos en la materia están familiarizados con otros conceptos de formulación para introducir la composición de acuerdo con la invención a sustancias portadoras, por ejemplo, tales como emulsiones u otros productos de aplicación dérmica, por ejemplo, formas líquidas, que preferentemente pueden ser hidratadas o anhidras, donde las formas acuosas se pueden dividir en sistemas monofásicos y sistemas multifásicos de acuerdo con la invención. Además, se pueden usar formas semisólidas que sean anhidras o hidratadas, donde, de nuevo, es posible dividir las en sistemas monofásicos y sistemas multifásicos en los que también son posibles las formas semisólidas que contienen agua. Preferentemente, también se pueden usar formas sólidas que sean lipófilas o hidrófilas. Los ejemplos de dichas formas incluyen, por ejemplo, pomadas a base de grasa, espumas, polvos, filamentos, cremas de gel, geles de hidrodispersión, emulsiones delgadas (no viscosas), lociones, pomadas, pulverizados y cremas además de las formas ya mencionadas anteriormente. Los expertos en la materia son conscientes de que dichas sustancias de vehículos se pueden diferenciar primero en aquellas que son ricas/de alta calidad y aquellas que son frescas y ligeras, basándose en la sensación sobre la piel, y en segundo lugar, con respecto a la viscosidad, aquellas con una baja viscosidad y otras con una alta viscosidad, mientras que los hidrogeles o las hidrocremas y/o emulsiones de aceite en agua o las emulsiones de agua en aceite tienen una alta viscosidad. Cuando se usan formas de aplicación líquidas, se pueden subdividir, como se ha explicado anteriormente, en sistemas hidratados y anhidros. De los sistemas anhidros, se prefieren en especial los sistemas apolares, los sistemas polares sin emulsionantes y los sistemas polares con emulsionantes. De los sistemas hidratados, se prefieren sistemas monofásicos tales como soluciones y microemulsiones; de los sistemas multifásicos, se prefieren emulsiones de agua en aceite o emulsiones de aceite en agua de múltiples emulsiones. De los sistemas sólido/líquido, las formas preferidas incluyen suspensiones o sistemas líquido/sólido/líquido tales como sistemas de suspensión/sistemas de emulsión. Los expertos en la materia conocen diversas posibilidades para suministrar dichos vehículos. Con las emulsiones de aceite en agua, las sustancias farmacéuticas líderes preferidas incluyen emulsionantes de aceite en agua, emulsionantes de agua en aceite, ingredientes hidrófilos líquidos e ingredientes lipófilos líquidos. Con las emulsiones de agua en aceite, las sustancias farmacéuticas líderes preferidas incluyen emulsionantes de agua en aceite, emulsionantes de aceite en agua, ingredientes lipófilos líquidos y semisólidos, agentes formadores de gel, ingredientes hidrófilos líquidos y/o sales.

De las sustancias portadoras semisólidas preferidas, se prefieren tanto los sistemas hidratados como los sistemas anhidros para diversas aplicaciones. Los sistemas anhidros pueden consistir en sistemas polares o apolares sin emulsionantes tales como lipogeles, oleogeles o geles de polietilenglicol y/o pueden consistir en sistemas apolares con emulsionantes en bases de absorción de aceite en agua o bases de absorción de agua en aceite. Los sistemas hidratados pueden consistir preferentemente en sistemas monofásicos tales como hidrogeles o geles de microemulsión, o sistemas multifásicos tales como cremas de aceite en agua, cremas de agua en aceite o sistemas anfífilos. Los preparados semisólidos preferidos son preparados extensibles para su aplicación en la piel en el intervalo de temperaturas entre la temperatura ambiente y la temperatura de la piel o para la aplicación en las membranas mucosas, donde tienen un efecto tópico, donde transportan los principios activos o tienen un efecto suavizante o protector en la piel. Los preparados preferidos incluyen pomadas en sentido estricto, cremas, geles y/o pastas. Además de las pomadas, las cremas, los geles y las pastas, también se pueden usar oleogeles como sistemas monofásicos semisólidos transparentes. Los expertos en la materia conocen diversos compuestos anhidros para formular sistemas semisólidos de la patente de EE.UU. n.º 6.187.323 o Aiache *et al.*, 2001, incluyendo, por ejemplo, el compuesto de un oleogel y un hidrogel, que se puede denominar bigel de acuerdo con la presente invención. Además, se pueden usar geles de hidrodispersión o diversos lípidos para proporcionar sustancias portadoras de acuerdo con la invención. Cuando se usan lípidos, se pueden usar compuestos de organosilicio como los compuestos de organocarbono para suministrar fases lipídicas a sistemas dispersos, donde los compuestos organocarbonados pueden suministrarse, por ejemplo, con la ayuda de lípidos no hidrolizables o lípidos hidrolizables

(glicerol) o ésteres de cera. Las ventajas de dichos sistemas incluyen una flexibilidad mejorada de la piel y un aumento en su elasticidad, así como la capacidad de tener el efecto de aumentar la liberación de las sustancias y la penetración de las mismas, dependiendo de la composición lipídica. Los expertos en la materia están familiarizados con qué lípidos deben usar para aumentar o disminuir, por ejemplo, la penetración dentro de un parámetro de tiempo.

Las sustancias portadoras preferidas adicionales incluyen, por ejemplo, geles de hidrodispersión y/o microcápsulas, microesférulas o gránulos (macroperlas). Los vehículos mencionados sirven para aumentar la estabilidad y garantizar un período mínimo de aplicación en la piel. Los sistemas monofásicos semisólidos preferidos pueden prepararse con la ayuda de las siguientes sustancias farmacéuticas líderes: ingredientes hidrófilos líquidos, en particular, agua y (poli)alcoholes, sustancias formadoras de gel hidrófilas, sustancias formadoras de sal y emulsionantes de agua en aceite, emulsionantes de aceite en agua, ingredientes lipófilos líquidos, semisólidos y sólidos, así como sustancias y aditivos formadores de gel lipófilos. Los expertos en la materia sabrán cómo deben combinar estas sustancias para lograr un cierto efecto.

Los expertos en la materia también sabrán de otros preparados farmacéuticos para productos dérmicos. De acuerdo con la presente solicitud de patente, por ejemplo, todos los compuestos farmacéuticos desvelados en la cita de Daniels y Knie en JDDG; 2007, 5:367-383. Los expertos en la materia saben que los diferentes preparados farmacéuticos tienen diferentes efectos sobre la piel y aplicarán la composición galénica a la piel en diferentes cantidades. El contenido de JDDG; 2007, 5:367-383 se incorpora en el presente documento en el contenido de la divulgación de la enseñanza de acuerdo con la solicitud de patente. Los productos preferidos de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, soluciones lipófilas o hidrófilas, emulsiones lipófilas o hidrófilas, suspensiones lipófilas o hidrófilas, preparados líquidos especiales, pomadas hidrófobas o hidrófilas, pomadas emulsionantes con agua, cremas lipófilas, hidrófilas o anfífilas, hidrogeles, pastas hidrófobas o hidrófilas y/o polvos.

Las bacterias del ácido láctico preferidas se asocian a través de la relación funcional entre sí para formar una idea uniforme de acuerdo con la invención, de modo que comparten las propiedades y/o los efectos, en concreto, que coagregan específicamente la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*, no se unen a ninguno de los microorganismos comensales de la piel ni/o membranas mucosas y también impiden la unión a la fibronectina por *Streptococcus pyogenes* y/o destruyen las células de *Streptococcus pyogenes* que están unidas a la fibronectina. Estas bacterias del ácido láctico incluyen, en particular, microorganismos seleccionados del grupo que comprende los siguientes microorganismos depositados en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares con los números de código DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989, DSM 25973. Fue completamente sorprendente que se pudiera identificar un grupo de bacterias del ácido láctico que tenían propiedades ventajosas idénticas. No se han descrito bacterias, en particular, ninguna bacteria del ácido láctico que combinen todas estas propiedades a la vez que sean apatógenas y que no causen ningún daño ni influencia en la flora natural de la piel. También se ha encontrado que la aplicación de las bacterias del ácido láctico preferidas, ya sea como composición o de otro modo, evita la unión e invasión de las células hospedadoras por *Streptococcus pyogenes*. Hasta la fecha, se desconoce la causa de esto, pero debe identificarse mediante experimentos adicionales.

Otra ventaja sorprendente de las bacterias del ácido láctico preferidas es que también pueden usarse de manera profiláctica. Esto significa que las bacterias del ácido láctico y/o una composición que las contiene pueden aplicarse profilácticamente (preferentemente, en forma de grageas o caramelos) sin dañar de ese modo las membranas mucosas de la boca y la garganta o la flora autóctona.

En el sentido de la presente invención, se entiende que la piel y/o las membranas mucosas, preferentemente en realizaciones preferidas, se refiere, en particular, al órgano externo del cuerpo humano o animal que sirve para delimitar el interior desde el exterior. Una zona de piel en el sentido de la presente invención incluye, en realizaciones preferidas, componentes de las membranas mucosas.

La tolerabilidad de las bacterias del ácido láctico en la piel y las membranas mucosas es uno de los requisitos previos para el tratamiento exitoso de las inflamaciones bacterianas, infecciones, enfermedades o síntomas en la zona de la garganta que implican microorganismos del grupo de *Streptococcus*. La composición preferida debe introducirse, en particular, como un probiótico en forma de grageas, caramelos o pastillas recubiertas, zumo o jarabe, enjuague, pulverizado o aerosol para suprimir la formación del microorganismo patógeno líder y su unión a las células hospedadoras, para unir estos patógenos, para eliminarlos como un agregado y/o para inhibirlos y/o matarlos y así reducir su número.

La composición de acuerdo con la invención se usa preferentemente en forma de caramelo, gragea o píldora recubierta. En primer lugar, la formulación en forma de caramelo, gragea o píldora recubierta permite una receta que tendrá un sabor agradable en la mayoría de los casos (incluyendo la adición de azúcares, sustitutos del azúcar, saborizantes) y que obtendrá una gran aceptación entre los pacientes y los consumidores. En segundo lugar, la saliva que también se secreta cuando se chupa la gragea humedece las membranas mucosas, de modo que se produce cierta liberación cuando hay síntomas de dolor de garganta o amigdalitis. La composición de acuerdo con la invención se libera lentamente durante un período prolongado de tiempo cuando se chupa en caramelos, grageas o píldoras recubiertas, y esto es ventajoso para el aspecto de la aplicación. Además, es técnicamente muy fácil

implantar la incorporación de la composición de acuerdo con la invención en una composición para caramelos, grageas o pastillas recubiertas. A este sentido, fue completamente sorprendente que fuera posible disponer de bacterias del ácido láctico que tuvieran una actividad y temperatura corporales, pero que pudieran sobrevivir a un tratamiento térmico a una temperatura de 70 a 90 °C de manera que siguieran teniendo las habilidades preferidas, en particular, la de coagregación de *Streptococcus pyogenes* incluso después del tratamiento. Esto es especialmente ventajoso, porque se suelen alcanzar temperaturas de 70 °C en la producción de caramelos, de modo que es ventajoso para el uso de las bacterias del ácido láctico o la composición en forma de caramelos que las bacterias del ácido láctico sigan teniendo la capacidad de coagregarse incluso después de la producción de los caramelos. Nada de este tipo se conoce de la técnica anterior. Por lo tanto, las bacterias del ácido láctico preferidas tienen capacidades que definitivamente las diferencian de los microorganismos conocidos. Además, era sorprendente que los caramelos que tenían la composición con las bacterias del ácido láctico se disolvieran más lentamente en la boca y, por lo tanto, que el caramelo consiguiera un efecto mejor y de mayor duración. Esto fue completamente sorprendente para los inventores. Además, los experimentos han demostrado que, en particular, a través de la liberación lenta de las bacterias del ácido láctico, esencialmente todas las células de *Streptococcus pyogenes* de la cavidad oral se pueden agrupar.

Los expertos en la materia saben lo que debe subsumirse en la expresión "temperatura corporal" y cómo se puede determinar. La temperatura corporal en el presente documento se refiere esencialmente a los seres humanos y animales. Los expertos en la materia también están familiarizados con el término "caramelo", y también saben en qué material publicado convencional buscar los ingredientes o el método de preparación de un caramelo. La presente invención no se limita a los caramelos simples, sino que la invención se puede combinar fundamentalmente con todos los caramelos con los que los expertos en la materia están familiarizados. Los caramelos y su producción están descritos por los expertos en la materia en la correspondiente literatura técnica de libre acceso, por ejemplo, en Candy Ind. 27, 161 (1996); H. Hoffmann, W. Mauch, W. Untze, "Sugar and Sugar Products", 2ª edición, Behr's: Hamburg (2002); R. Lees, B. Jackson, "Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture", Leonard Hill Books: Plymouth (1999); Federal Association of the German Confectionery Industry (BDSI), editores, Confectioner's Handbook, Molberg, Bonn (2001); "Handbook for the Food Chemist, Food Leader", Thieme, Stuttgart (1995).

Los caramelos pueden preferirse en una variedad de formas, sabores, consistencias y colores. Por lo general, son fragmentos del tamaño de un bocado. Los caramelos pueden ser sólidos o rellenos, redondos, ovalados, cuboides o en forma de cubo. Dependiendo del contenido de agua residual, son duros (caramelos duros) o blandos y masticables (caramelos blandos). Dependiendo de los aditivos, se hace una distinción, en particular, entre los caramelos para la garganta y los caramelos para la tos, los caramelos de fruta, de caramelo y refrescantes. Los efectos y el sabor de los caramelos pueden determinarse mediante el uso de extractos de hierbas, aceites esenciales (por ejemplo, eucalipto) y principios activos como el mentol. En el caso de los caramelos de frutas, las sustancias aromatizantes y los componentes ácidos pueden producir un sabor individual. También se pueden añadir extractos naturales de frutas y plantas o colorantes alimentarios para conferir color a los caramelos. Los caramelos de caramelo se preparan, en particular, a partir de productos lácteos tales como la leche condensada, mantequilla y crema. Al aromatizar y añadir diversos aditivos, son posibles variantes de sabor tales como nueces, almendras, miel, cacao, coco y similares. Además, se prefieren caramelos masticables, cortados, estampados, colados o laminados. Se pueden proporcionar caramelos ventajosos con una variedad de ingredientes, por ejemplo, vitaminas, aminoácidos, aceites, hierbas, grasas, diversos hidratos de carbono o sustitutos del azúcar, potenciadores del sabor y/o emulsionantes. Los caramelos duros, en particular, contienen sacarosa y glucosa que se producen preferentemente usando sustancias colorantes y sustancias que confieren olor y que confieren sabor, que influyen en las propiedades de los caramelos. Debido al bajo contenido de agua residual del 1-3 %, los caramelos duros tienen una consistencia dura y a menudo brillante. Los caramelos duros también pueden producirse sin azúcar mediante el uso de edulcorantes y sustitutos del azúcar.

Los caramelos blandos denotan, en particular, un grupo de productos de confitería que tienen una consistencia masticable, en contraste con los caramelos duros, y que se producen con un contenido de agua del 6 al 10 % de los ingredientes principales que son sacarosa, otros tipos de azúcar, edulcorantes y/o alcoholes de azúcar, así como jarabe de glucosa por cocción discontinua o continua, conteniendo preferentemente también grasas, ingredientes lácteos, espesantes, emulsionantes, aromatizantes y sustancias saborizantes como aditivos. También se pueden producir en una amplia variedad de formas y colores, con y sin relleno.

Además, se ha demostrado que es ventajoso que los caramelos tengan un sistema multicámara, de modo que las vitaminas u otros cofactores estén presentes en una cámara y la composición o bacteria del ácido láctico preferida esté presente en una o más cámaras adicionales. A través de este sistema de cámaras, es posible garantizar que las bacterias del ácido láctico se liberen en un momento óptimo y, opcionalmente, a diferentes dosis. Las vitaminas u otros cofactores también pueden potenciar la actividad de las bacterias del ácido láctico. Por ejemplo, sorprendentemente se ha encontrado que los arándanos tienen el efecto de prevenir el desarrollo de una biopelícula, por lo que son un suplemento óptimo para las bacterias del ácido láctico preferidas. Los ensayos han demostrado que la coagregación de *Streptococcus pyogenes* es un 50 % más eficaz si también hay presentes ingredientes o una solución de arándanos.

Los ensayos han demostrado que las bacterias del ácido láctico preferidas se coagregan al entrar en contacto con

las células de *Streptococcus pyogenes*. A través de la formación de agrupaciones, se impide que *Streptococcus pyogenes* colonice e invada las células de la zona de la garganta en particular. Las células de *Streptococcus pyogenes*, en particular, su superficie celular, son enmascaradas por las bacterias del ácido láctico, en particular las células de *Lactobacillus*, de modo que las células de *Streptococcus pyogenes* ya no pueden unirse a las células epiteliales de la piel ni las membranas mucosas. Las reacciones inflamatorias se previenen mediante la unión impedida de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales de la piel y de las membranas mucosas. Resultó completamente sorprendente que fuera posible suministrar bacterias del ácido láctico que se agruparan con *Streptococcus pyogenes* en una etapa muy temprana y, por lo tanto, impidieran la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales desde el principio. Esto fue completamente sorprendente y no se conoce en la técnica anterior. Por tanto, las bacterias del ácido láctico preferidas ya pueden coagregarse con *Streptococcus pyogenes* en la cavidad oral. Además, fue completamente sorprendente que las bacterias del ácido láctico preferidas no fueran inhibidas por las enzimas u otros factores que se dan en la saliva, es decir, su capacidad de coagregación de *Streptococcus pyogenes* no se inhibe.

La saliva natural contiene, entre otras cosas, sustancias antimicrobianas como la lisozima, que sirve como defensa contra las bacterias y puede atacar directamente la pared celular de las bacterias Gram-positivas en particular. Sin embargo, las bacterias del ácido láctico preferidas se caracterizan porque, a pesar de la presencia de saliva natural y a pesar de las sustancias antimicrobianas contenidas en la misma, todavía son capaces de la coagregación específica de *Streptococcus pyogenes*. Esto fue completamente sorprendente y es una ventaja considerable frente a la técnica anterior.

En el sentido de la presente invención, los microorganismos probióticos comprenden células que tienen efectos ventajosos sobre el cuerpo humano y/o animal. Una composición preferida se usa como una composición probiótica y contiene bacterias del ácido láctico que tienen un efecto ventajoso sobre el cuerpo humano y/o animal. Los efectos ventajosos pueden consistir, en particular, en la reducción de la carga microbiana de la zona del cuello y de la garganta por *Streptococcus pyogenes*. En particular, los microorganismos no deseados tales como *Streptococcus pyogenes* de la flora autóctona pueden inhibirse mediante interacciones indirectas con los microorganismos probióticos y los microorganismos no deseados y, en particular, mediante interacciones indirectas basadas en la inhibición del metabolismo de los microorganismos no deseados por productos de expresión del microorganismo probiótico. Los ensayos han demostrado que el microorganismo patógeno *Streptococcus pyogenes* ya no presenta ningún crecimiento, es decir, no hay más reproducción de la masa celular tras la coagregación con las bacterias del ácido láctico preferidas, sino que las células se enmascaran en particular y/o se mueren.

Además, fue sorprendente que las bacterias del ácido láctico todavía tuvieran las propiedades ventajosas incluso después de la muerte física, química y/o biológica. Por ejemplo, las cepas preferidas, en concreto, DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973 producen la coagregación de los patógenos, evitan la unión a la fibronectina y, además, no presentan ninguna unión de los microorganismos comensales incluso después de un tratamiento térmico a 70 °C durante 20 minutos o un tratamiento con ultrasonidos. Por lo tanto, las bacterias del ácido láctico también pueden estar presentes ventajosamente en forma muerta en una realización preferida de la composición. De esta manera, la estabilidad y la utilidad de la composición pueden prolongarse sustancialmente. Además, la composición se usa en zonas de aplicación adicionales, que no permiten el uso de microorganismos viables, se producen por destrucción térmica o liofilización, en particular, mediante métodos biológicos, químicos o de muerte física, por lo que el análogo o fragmento todavía tiene la capacidad para unirse específicamente a los microorganismos patógenos incluso después de la destrucción o el secado por pulverización, siendo dicho microorganismo seleccionado del grupo de *Streptococcus pyogenes*. Resultó completamente sorprendente que las bacterias del ácido láctico estuvieran presentes en la composición de forma viable o no viva (muerta) y, sin embargo, aún se unieran específicamente al microorganismo patógeno y/o se agruparan con el mismo.

Además, la presente invención también se refiere a composiciones que contienen la bacteria del ácido láctico de acuerdo con la invención que tienen la capacidad de unirse específicamente al microorganismo patógeno indicado anteriormente y que se usan, en particular, como alimento, aditivo alimentario, pienso animal o bebidas. Una composición preferida contiene las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención que tienen la capacidad de unirse y/o coagregarse específicamente con al menos un microorganismo patógeno del grupo de *Streptococcus pyogenes*, por lo que la composición se usa para el tratamiento de la prevención de resfriados.

Las bacterias del ácido láctico preferidas de acuerdo con la invención son representativas del género de bacterias del ácido láctico, es decir, bacterias Gram-positivas que producen ácido láctico por fermentación de la glucosa. Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención se caracterizan porque, por un lado, tienen la capacidad de unirse específicamente a, es decir, por coagregación con al menos un microorganismo patógeno seleccionado del grupo de *Streptococcus pyogenes*. Esta unión conduce a la formación de agregados de los microorganismos de acuerdo con la invención y los microorganismos patógenos específicamente unidos. Debido a la formación de agregados, estos últimos, es decir, los microorganismos patógenos pueden eliminarse mecánicamente, por ejemplo, enjuagándolos en un procedimiento dirigido y fácil, lo que era imposible con las medidas conocidas en el pasado.

La expresión "unión específica" o el término "coagregación" se entienden en el sentido de la invención, así como habitualmente en el campo de la microbiología y de la higiene, en particular, la microbiología humana y la higiene

física, y el reconocimiento y la adhesión mutuos de células que pertenecen genéticamente a diferentes tipos de células. La coagregación se entiende en el sentido de la invención en particular como adhesión, interacción, unión, unión específica, afinidad o interacción, y caracteriza, en particular, la capacidad de las bacterias del ácido láctico preferidas para formar aglomerados con *Streptococcus pyogenes*. En su superficie celular, las bacterias expresan receptores y estructuras para las adhesinas a otros tipos de células que se usan para la adhesión entre las células. Esta adhesión desempeña un papel excelente en la colonización con microorganismos patógenos y comensales, de modo que una intervención en la adherencia podría tener consecuencias de gran alcance. Debido al hecho de que las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención tienen la capacidad de unión específica, en particular, de coagregación con al menos un microorganismo del grupo de *Streptococcus pyogenes*, los agregados de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención y los microorganismos patógenos. Los coagregados resultantes se pueden eliminar fácilmente, por ejemplo, enjuagando las superficies, la piel, el tejido y/o algún otro sitio o reservorio de colonización, de modo que se reduzca definitivamente el número de microorganismos patógenos. Además, una adherencia inicial y/o renovada a las superficies, la piel, los tejidos y/u otros sitios o depósitos de colonización se previenen y/o reducen enmascarando las estructuras superficiales de los microorganismos patógenos. Si las células se unen entre sí y forman agregados, este proceso se conoce, en particular, como agregación. Si solo participa una especie de célula en esta formación de un agregado, entonces eso se conoce como autoagregación. Si participan al menos dos especies celulares diferentes en la formación del agregado, este proceso se conoce, en particular, como coagregación.

En el sentido de la presente invención, "unión específica de al menos un microorganismo patógeno" se entiende que se refiere, en particular, a la propiedad de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención para unirse específicamente a al menos una bacteria del grupo de *Streptococcus pyogenes*.

De acuerdo con una realización preferida de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, también se caracterizan porque existe la capacidad de unión específica a al menos un microorganismo patógeno incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico, por ejemplo, un tratamiento térmico a una temperatura mínima de 70 °C. En otras palabras, las bacterias del ácido láctico preferidas pueden estar presentes preferentemente en forma muerta en una composición preferida, porque la capacidad de interacción específica o unión a bacterias patógenas, en particular, a *Streptococcus pyogenes*, no se ve afectada y, por lo tanto, se puede establecer una unión o interacción.

El tratamiento térmico mencionado anteriormente y/o "resistencia a un tratamiento térmico" o "estabilidad térmica" se entiende que se refieren a la propiedad de una bacteria de seguir siendo capaz de entrar en un enlace específico con al menos un microorganismo patógeno seleccionado del grupo de *Streptococcus pyogenes* e incluso después de un cierto período de tiempo de al menos 30 minutos a una temperatura elevada de 70 °C o superior. Las células muertas o destruidas de bacterias del ácido láctico pueden ser especialmente ventajosas, porque las células de bacterias del ácido láctico no pueden desencadenar ninguna actividad metabólica. Las formas "muertas" o "destruidas" se caracterizan, en particular en el sentido de la invención, porque estas formas de bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención ya no son capaces de dividirse, por ejemplo, no pueden teñirse con colorantes vivos, no son metabólicamente activas ni presentan ninguna replicación del ADN, o biosíntesis o secreción de proteínas, por ejemplo, de productos metabólicos.

De acuerdo con otra propiedad preferida de las bacterias del ácido láctico, las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención también pueden caracterizarse por una estabilidad térmica además de la propiedad descrita anteriormente, en concreto, la capacidad de unión específica de al menos un microorganismo patógeno seleccionado entre *Streptococcus pyogenes*, y pueden sobrevivir a un tratamiento a altas temperaturas preferentemente de al menos aprox. 60 °C, más preferentemente al menos 65 °C e incluso más preferentemente al menos 70 °C durante un período de al menos 20 minutos, preferentemente de 25 minutos y más preferentemente de al menos aprox. 30 minutos, y permanecen sin cambios con respecto a su capacidad para la coagregación de la unión específica de los microorganismos patógenos anteriormente mencionados.

En una realización preferida de la composición, se prefieren las bacterias del ácido láctico que están vivas o muertas o son partes y fragmentos, por ejemplo, productos de escisión enzimática o mecánica (por ejemplo, prensa francesa, etc.) o productos metabólicos de estas bacterias, en la medida en que todavía tienen la capacidad de coagregación y/o de prevenir la unión a la fibronectina. También es preferible usar las bacterias del ácido láctico en forma encapsulada, secada por pulverización y/o liofilizada, es decir, que estén presentes en forma encapsulada, secada por pulverización o liofilizada en una composición preferida. Además, puede ser ventajoso usar las bacterias del ácido láctico en forma de células digeridas.

Además, es preferible si la capacidad de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención para la unión específica de los microorganismos patógenos también persiste a un pH entre aprox. 3 y 8. Esto significa que las bacterias del ácido láctico pueden estar en un medio que tiene un pH de 3 a 8 y seguir teniendo su capacidad de unirse a *Streptococcus pyogenes*. Las bacterias del ácido láctico preferidas se pueden usar ventajosamente en un amplio intervalo de pH y/o tienen las propiedades preferidas en el intervalo preferido. Por lo tanto, las bacterias del ácido láctico preferidas pueden usarse universalmente en diferentes zonas del cuerpo. Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención han mostrado sorprendentemente propiedades de coagregación con

- Streptococcus pyogenes*, en particular, en un amplio intervalo de temperaturas de aprox. 25 °C-42 °C. Por lo tanto, será evidente para los expertos en la materia que, en el presente documento, así como en todas las afirmaciones de intervalo dadas en la presente invención, caracterizadas por términos tales como "aproximadamente", no es necesario indicarse el intervalo numérico exacto con expresiones tales como "aproximadamente" o "aprox.", sino
- 5 que, en cambio, incluso pequeñas desviaciones hacia arriba o hacia abajo con respecto al número indicado todavía están dentro del alcance de la presente invención. La unión de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención a los microorganismos patógenos enumerados preferentemente produce la inhibición del crecimiento del microorganismo patógeno.
- 10 Fue sorprendente que, mediante la unión del microorganismo patógeno y de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, se forma un agregado, que puede centrifugarse a una fuerza centrífuga de preferentemente 300 g durante 10 segundos, en particular, y luego se presenta como un sedimento, en particular, después preferentemente de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente sin agitación.
- 15 De acuerdo con otra realización preferida, las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención no tienen la capacidad de unirse a la flora orofaríngea comensal tal como *Streptococcus salivarius*, en la que *Streptococcus salivarius*, en particular, es un comensal en gran medida sin importancia de la flora de la piel. En la interacción de diversos microorganismos presentes en o sobre la piel, esta especie de *Streptococcus pyogenes* está presente en la flora sana de la piel de muchos mamíferos y se encuentra en equilibrio microbiano con los mismos, al menos en las
- 20 pieles sanas. La influencia de esta bacteria debido a la agregación, por ejemplo, y por lo tanto, una influencia sobre otros microorganismos que podrían estar presentes en la higiene física para una diana específica, no se prefiere dentro del alcance de la presente invención.
- En una realización preferida, la presente invención se refiere a bacterias del ácido láctico que, en una realización preferida, tienen al menos una de las siguientes características: a) estabilidad térmica o estabilidad después del
- 25 tratamiento biológico y/o químico y/o físico; o b) capacidad para inhibir la adhesión de las células del hospedador por *Streptococcus pyogenes*. Resultó completamente sorprendente que las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención todavía fueran capaces de unirse a *Streptococcus pyogenes* específicamente incluso después del tratamiento biológico y/o químico y/o físico.
- 30 Otra propiedad de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención es la capacidad de inhibir la unión a las células hospedadoras por *Streptococcus pyogenes* en el sentido de que estas células, que ya están presentes en forma planctónica, se coagregan específicamente y luego se eliminan por lavado en forma de agregados. Estas bacterias patógenas ya no pueden colonizar e invadir superficies biológicas debido a esta coagregación y, por lo
- 35 tanto, tampoco pueden causar ninguna enfermedad.
- Por lo tanto, en el sentido de la presente invención, debe entenderse que la expresión "inhibir la unión a células hospedadoras (células orofaríngeas) por *Streptococcus pyogenes*" se refiere, en particular, a la propiedad de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención para interactuar con *Streptococcus pyogenes*, es decir, para
- 40 unirse a las mismas o influir de otra manera con las mismas de manera que ya no puedan unirse a las células orofaríngeas.
- De acuerdo con una realización preferida, por lo tanto, la bacteria del ácido láctico de acuerdo con la invención puede tener al menos una de las propiedades indicadas, es decir, resistencia al tratamiento biológico, químico y/o
- 45 físico, resistencia al calor, capacidad de unión específica, coagregación a *Streptococcus pyogenes*. Una combinación preferida de propiedades incluiría, por ejemplo, dos o tres propiedades, es decir, por ejemplo, resistencia al tratamiento biológico, químico y/o físico, resistencia al calor y capacidad de unión a *Streptococcus pyogenes* o resistencia a productos biológicos, químicos y/o tratamiento físico, resistencia al calor e inhibición de la unión a las células orofaríngeas por *Streptococcus pyogenes*.
- 50 Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención son preferentemente bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus ingluviei*.
- 55 Por consiguiente, "un mutante o un derivado" de bacterias del ácido láctico, en particular, un mutante o un derivado de *Lactobacilli* sp. depositado con la colección DSMZ como parte de la presente solicitud de patente tiene las mismas características que las reivindicadas para las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención en el presente caso y, en particular, las mismas cepas que las depositadas con el DSMZ; esto se referiría al menos a la capacidad de unión específica, coagregación de al menos un microorganismo patógeno seleccionado del grupo de
- 60 *Streptococcus pyogenes*. Además, es preferible tener al menos una de las siguientes características: (i) resistencia de la capacidad para la unión específica a un tratamiento biológico, químico y/o físico, en particular, un tratamiento térmico a más de 70 °C durante al menos 30 minutos; (ii) sin unión a *Streptococcus salivarius*; (iii) capacidad de unión específica a *Streptococcus pyogenes*; (iv) capacidad para inhibir la unión a células orofaríngeas por *Streptococcus pyogenes*; (v) existencia de la unión específica a pH 3-8; (vi) capacidad de unión específica en saliva natural. Dichos derivados preferidos pueden producirse por ingeniería genética, por ejemplo. La expresión "producido mediante ingeniería genética" en el sentido de la presente invención incluye, en particular, todos los
- 65

métodos con los que los expertos en la materia están familiarizados en el campo de la ingeniería genética para la modificación de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo*, de modo que se pueden inducir modificaciones genéticas mediante tecnologías de ADN recombinante y se pueden modificar genes.

5 Un "fragmento" en el sentido de la presente invención es, en particular, un componente celular de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención y preferentemente una parte de la membrana celular. Los expertos en la materia estarán familiarizados adecuadamente con los métodos de obtención de fracciones de membranas celulares de la técnica anterior.

10 Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención están preferentemente en forma aislada o purificada, donde el término "aislada" significa, en particular, que las bacterias del ácido láctico se derivan de su medio de cultivo, incluyendo su medio natural, por ejemplo. El término "purificada" no está restringido a la pureza absoluta.

15 Es preferible que, además de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención en una forma viable, también se incluyan las formas muertas de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención dentro del alcance de la presente invención. Los métodos adecuados para matar (por ejemplo, los métodos de destrucción biológicos, químicos o físicos) son suficientemente familiares para los expertos en la materia. En el presente caso, sin embargo, las bacterias del ácido láctico también pueden usarse en forma liofilizada. Se puede hacer que las células liofilizadas vuelvan a crecer después de un cultivo adecuado en un medio líquido o sólido. Esto fue  
20 completamente sorprendente y se relaciona con un nicho novedoso e inventivo. La técnica anterior incluye, por ejemplo, soluciones para limpiar superficies que contienen esporas, en las que las bacterias se reactivan cuando las esporas entran en contacto con los sustratos correspondientes. Nada de este tipo es necesario para las bacterias del ácido láctico preferidas y la composición. Las bacterias del ácido láctico preferidas también son activas, es decir, se coagregan con *Streptococcus pyogenes* y también tienen otras propiedades como se ha descrito anteriormente,  
25 pero ya no tienen ninguna actividad metabólica, y los expertos en la materia se referirán a las mismas en microbiología como "muertas". Por lo tanto, las bacterias del ácido láctico ya no son capaces de crecer, dividirse, replicarse o secretar productos metabólicos, por lo que su rango de uso se amplía considerablemente.

30 Los términos "muerto/a" o "forma muerta" y "derivados" o "análogos" o "mutantes" también incluyen en el presente caso lisados, fracciones o extractos de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, en la que estos lisados, fracciones o extractos tienen preferentemente las propiedades de las bacterias del ácido láctico donde "lisado" - así como el término "extracto" - se refiere, en particular, a una solución o suspensión en un medio acuoso de las células de la bacteria del ácido láctico de acuerdo con la invención y comprende, para ejemplo, macromoléculas tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, lípidos, hidratos de carbono, etc., así como detritos  
35 celulares. El lisado también incluye preferentemente la pared celular o los constituyentes de la pared celular. Los métodos de producción de lisados son suficientemente conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, el uso de una "prensa francesa" o lisis enzimática, un molino de bolas con perlas de vidrio o perlas de hierro. Las células se pueden romper mediante métodos enzimáticos, físicos o químicos. Los ejemplos de lisis celular enzimática pueden incluir enzimas individuales, así como cócteles enzimáticos, por ejemplo, proteasas, proteinasa K, lipasas, glucosidasas; la lisis química se puede inducir por ionóforos, detergentes tales como SDS, ácidos o bases; los métodos físicos también pueden implantarse mediante el uso de altas presiones como la prensa francesa, osmolaridades, temperaturas o alternancia entre calor y frío. Además, los métodos químicos, físicos y enzimáticos pueden, por supuesto, combinarse. Las "formas destruidas" o las "formas muertas" y los "derivados" o "análogos" o "mutantes" de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención tienen preferentemente las  
45 mismas propiedades que las cepas mencionadas anteriormente. La "forma destruida" o "forma muerta" y "derivado" o "análogo" preferentemente ya no tienen ninguna actividad metabólica. Los análogos de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención son una forma del lisado o fragmentos. Un fragmento de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención es una parte de las células, por ejemplo, la membrana celular, macromoléculas tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, lípidos, hidratos de carbono, etc., así como detritos celulares. Los  
50 mutantes y/o las variantes o los derivados genéticamente alterados se alteran genéticamente, por ejemplo, mediante tecnologías de ADN recombinante (clonación, secuenciación, transformación de ácidos nucleicos recombinantes), así como mutagénesis física, por ejemplo, mediante radiación ultravioleta, pero también a través de agentes químicos tales como con sulfonato de etilmetano (EMS). Se pueden seleccionar cambios en las propiedades positivas. Los mutantes alterados genéticamente contienen células de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención y retienen ácidos nucleicos recombinantes en sus cromosomas y/o plásmidos bacterianos. Las modificaciones a través de mutaciones puntuales también pueden inducir efectos sobre la expresión/transcripción/traducción, así como mutaciones espontáneas incluso sin ninguna manipulación genética directa. Los análogos o fragmentos pueden incluir formas destruidas (muertas) térmicamente o liofilizadas de las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención que conservan sus propiedades de acuerdo con la invención  
60 o incluso las mejoran ampliando la zona superficial, por ejemplo. Las células después de la liofilización (criodesecación) siguen siendo viables en algunas circunstancias. Estas células se pueden destruir mediante procesos de almacenamiento especiales a diferentes temperaturas. Las células muertas pueden tener membranas celulares intactas o rotas, por ejemplo, pero no tienen ninguna actividad metabólica. Los métodos de producción de células destruidas pueden incluir, por ejemplo, un tratamiento con perlas de vidrio, en el que el efecto de las fuerzas de cizalla entre las células y las perlas de vidrio produce la ruptura de la célula. Otros métodos físicos tales como  
65 prensa francesa, homogenización a alta presión, molino de bolas o procesos de congelación-descongelación y

autoclave producen la destrucción de células y también conducen a fragmentos de bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, como lo hacen la irradiación UV, los métodos de autólisis o procesos especiales de almacenamiento a diferentes temperaturas.

5 Los expertos en la materia pueden ensayar y verificar si una bacteria del ácido láctico que pertenece al género de las bacterias del ácido láctico tiene las propiedades de acuerdo con la invención, por ejemplo, basándose en los ensayos descritos en el presente documento y a continuación. La expresión "células de *Lactobacillus*" también se puede usar en el sentido de la presente invención para incluir bacterias del ácido láctico o lactobacilos, e incluye microorganismos que requieren hidratos de carbono, en particular, glucosa y lactosa para la fermentación del ácido  
10 láctico, y normalmente usan la vía de biosíntesis de Embden-Meyerhof. Las células de *Lactobacillus* se clasifican taxonómicamente en la familia *Lactobacteriaceae*. Son Gram-positivas, no forman esporas y, en general, son inmóviles. Las células de *Lactobacillus* son anaerobias, pero son aerotolerantes, aunque no contienen heminas (citocromo, catalasa) (Schleifer *et al.*, *System. Appl. Microb.* 18, 461-467 (1995) o Ludwig *et al.*, *System. Appl. Microb.* 15, 487-501 (1992). Las células y/o la especie *Lactobacillus* pueden determinarse basándose en el patrón de utilización de los hidratos de carbono, en particular, usando el ensayo API (de la empresa Biomerieux). De acuerdo  
15 con la invención, estas incluyen, en particular, especies que son adecuadas para la fermentación del ácido láctico homofermentativo o la fermentación del ácido láctico heterofermentativo. Dichas células de *Lactobacillus* también se seleccionan preferentemente del grupo que comprende *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* (siendo todas ellas homofermentativas), también *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus viridescens*, así como *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus ingluviei* (siendo todas ellas heterofermentativas). Las células de *Lactobacillus*  
20 que son adecuadas como ejemplos y han sido depositadas por el solicitante incluyen: *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* (DSM 25972), *Lactobacillus crispatus* (DSM 25987, DSM 25988), *Lactobacillus plantarum* (DSM 25989), *Lactobacillus ingluviei* (DSM 25973), siendo todas ellas preferidas de acuerdo con la presente invención.

30 En una realización preferida de la presente invención, la bacteria del ácido láctico de acuerdo con la invención se selecciona de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus ingluviei*, cada una de las cuales se ha depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) en Braunschweig con los números de deposición DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989, DSM 25973. Las deposiciones de la DSMZ mencionadas anteriormente se hicieron de acuerdo con el  
35 Tratado de Budapest relativo al Reconocimiento Internacional de la Deposición de Microorganismos con el propósito de la deposición de patentes.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención también se refiere a composiciones que contienen bacterias del ácido láctico, preferentemente viables, así como preferentemente al menos un vehículo o excipiente  
40 seleccionado de al menos uno de los siguientes: un vehículo o excipiente cosméticamente aceptable, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, o un vehículo o excipiente dermatológicamente aceptable.

El término "composición" en el sentido de la presente invención se entiende que incluye, en particular, solo una composición que contiene al menos una bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la invención,  
45 así como otros ingredientes opcionales tales como vehículos o excipientes u, opcionalmente, otros principios activos y sales. Se entiende que los aditivos, vehículos o excipientes cosmética, farmacéutica o dermatológicamente aceptables son cualquier sustancia, en general, en los campos cosmético, farmacéutico o dental de uso cosmético o farmacéutico, administración o aplicación de manera eficaz de un principio activo o una composición, es decir, en el presente caso, al menos una bacteria del ácido láctico o su lisado celular.

50 El término "mucosa" o "membrana mucosa" en el sentido de la presente invención y las reivindicaciones se entiende que se refiere a la capa interna que reviste órganos huecos mantenidos húmedos por las secreciones glandulares. En particular, esto se refiere a la mucosa oral y nasal, al tejido conjuntivo, a las membranas mucosas del tracto gastrointestinal y a las membranas mucosas de la zona química.

55 Se entiende que "enfermedades inflamatorias", en el contexto de la presente descripción y de las reivindicaciones de patente, se refiere a enfermedades que implican estados patológicos agudos, subagudos, crónicamente relajantes o crónicamente persistentes que implican a la piel, las membranas mucosas o la cavidad oral. Las enfermedades inflamatorias se caracterizan clínicamente por enrojecimiento, hinchazón, dolor, picazón, exudación, vesiculación,  
60 hiperqueratosis, hiperescamación, erosiones, úlceras y otros defectos de sustancias, así como costras, vesículas y otras eflorescencias. Las células histológicamente inflamatorias se pueden encontrar en el corion y/o en la epidermis. Se entiende que las "enfermedades inflamatorias" o los "estados inflamatorios", en el sentido de la presente invención y las reivindicaciones de patente, se refieren, en particular, a enfermedades y afecciones tales como, por ejemplo (pero no exclusivamente) eczema, eccema atópico, eczema seborreico, eccema alérgico o de contacto tóxico), soriasis y otras inflamaciones hiperqueratóticas, heridas agudas y crónicas, enfermedades pruriginosas de la piel, así como inflamaciones raras tales como liquen plano, cambios granulomatosos y

parasoriásicos de la piel, así como un gran grupo de enfermedades autoinmunes con una manifestación cutánea. Se entiende que el término "profilaxis" o "prevención", en la presente descripción y reivindicaciones, incluye todos los tipos de prevención, en concreto, tanto el tratamiento preventivo de usuarios sanos y/o pacientes, así como el tratamiento preventivo de los usuarios y/o pacientes que tienden a tener enfermedades microbianas de la piel, de las membranas mucosas o de la cavidad oral o los usuarios y/o pacientes (personas con una denominada "predisposición") que tienden a tener enfermedades inflamatorias. Además, también se entiende que la prevención incluye el tratamiento preventivo de usuarios y/o pacientes que ya han padecido una vez una enfermedad microbiana de la piel, las membranas mucosas o la cavidad oral, o una enfermedad inflamatoria, y que han superado la enfermedad mientras tanto, por ejemplo, mediante un tratamiento exitoso tal como el tratamiento presentado en la presente descripción y las reivindicaciones (denominado "prevención de recurrencia"). Además, se entiende que la prevención, en el sentido de la presente descripción y reivindicaciones, incluye el tratamiento cosmético, así como el cuidado y el tratamiento reparador de la piel que tiende a desarrollar irritación.

Es preferible que la composición pueda contener no solo una de las bacterias del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la invención o un análogo, mutante, derivado o fragmento de los mismos, sino que también pueda contener una mezcla de bacterias del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la invención.

La composición puede estar preferentemente en forma sólida o líquida o viscosa, o en aerosol, y puede usarse, por ejemplo, en forma de polvos, comprimidos, soluciones, gránulos, suspensiones, emulsiones, cápsulas, pastas, geles, aerosoles, etc., es decir, en cualquier forma adecuada para administración. También es preferible que la composición comprenda probióticos, antisépticos u otras sustancias antibacterianas adicionales, y preferentemente, pero opcionalmente, sacáridos y conservantes, aromatizantes, edulcorantes, vitaminas, minerales, aromas, etc. El documento EP 2 133 414 A1 enumera una serie de ingredientes que se pueden usar para las composiciones preferidas. Se hace referencia explícita a esta publicación. Además, en una composición preferida, puede haber cargas, agentes de control del flujo, modificadores de la reología, suavizantes, estabilizantes o monómeros reticulados reactivamente, por ejemplo, metacrilatos. En este sentido, puede ser preferible que la composición contenga sustancias tales como EDTA, magnesio, calcio, SDS o sus sales, o sales similares. Fue completamente sorprendente que estas sustancias inhibieran primero la formación de una biopelícula por *Streptococcus pyogenes* pero también potenciaran la capacidad de coagregación de las bacterias del ácido láctico preferidas. La composición de acuerdo con la invención se usa, en particular, para su administración en higiene física, tratamiento y prevención, y contiene al menos una bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la invención.

En particular, se prefiere usar la composición como un probiótico, es decir, como un preparado que contiene microorganismos viables que pueden tomarse por vía oral y que tiene un efecto potenciador de la salud en la persona que toma el probiótico y/o la persona a quien se administra. Dichos preparados pueden ser alimentos o aditivos alimentarios, o piensos o aditivos de piensos animales, o medicamentos. De acuerdo con la invención, la composición puede usarse en todos los animales comerciales y mascotas, es decir, además de en seres humanos, también en perros, gatos, caballos, camellos, halcones, etc. Las bacterias del ácido láctico y/o una composición que las contienen pueden usarse en diversas formas para lograr esto. Por ejemplo, puede ser preferible aplicar esta composición en huesos masticables, palitos masticables, golosinas para animales, alimentos para animales, microgránulos, artículos para morder y masticables o juguetes para animales, etc. En particular, es preferible que las bacterias del ácido láctico o la composición se usen para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas en la zona de la garganta, causadas, en particular, por *Streptococcus pyogenes*, en animales y en seres humanos.

La dosis y administración en sí con las que se usa la composición de acuerdo con la invención dependerán del uso específico y del paciente específico, en particular, de la edad, del peso, del estado general de salud, etc., y están dentro del alcance de las capacidades y la evaluación de los expertos en la materia que usarán esta composición.

La composición de acuerdo con la invención puede ser un producto cosmético, un producto médico o un producto farmacéutico. La composición contiene preferentemente las bacterias del ácido láctico en una cantidad del 0,001 % en peso al 20 % en peso, preferentemente del 0,005 % en peso al 10 % en peso, en especial, preferentemente del 0,01 % en peso al 5 % en peso. Fue completamente sorprendente que el uso de una cantidad del 0,001 % en peso al 20 % en peso en particular hiciera que la descomposición se pudiera usar durante un período de tiempo más prolongado, es decir, que permaneciera estable. Si las bacterias del ácido láctico se usan en una cantidad del 0,005 % en peso al 10 % en peso, esto sorprendentemente produce un efecto positivo sobre las propiedades reológicas de la composición y hace que la composición tenga una viscosidad inferior y se distribuya mejor en la piel o sea más fácil de introducir en la cavidad oral. El uso de las bacterias del ácido láctico en una cantidad del 0,01 % en peso al 5 % en peso ha hecho sorprendentemente que los componentes de la composición se unan mejor entre sí y que se pueda suministrar una composición homogénea en un tiempo de trabajo reducido, lo que, a su vez, conduce a una reducción en los costes de producción. Sin embargo, es evidente que otras cantidades, que son diferentes de las especificadas en el presente documento, también se pueden usar para aplicaciones específicas. Fue especialmente sorprendente que las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención tuvieran una actividad de coagregación sumamente elevada en la saliva humana. Los agregados resultantes con *Streptococcus pyogenes* tienen una estabilidad sumamente buena y, por lo tanto, se pueden eliminar muy bien y de manera eficaz enjuagando o tragando.

La eficacia de coagregación puede aumentar sorprendentemente de forma significativa en presencia de cofactores (EDTA, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, SDS). Fue absolutamente inesperado que EDTA, en particular, tuviera un efecto fuertemente positivo en la coagregación de bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención con *Streptococcus pyogenes*. Como se ha mencionado anteriormente, de acuerdo con una realización preferida, la composición y/o la bacteria del ácido láctico se pueden usar en el zona de prevención y tratamiento de infecciones de garganta y amígdalas para agregar los microorganismos patógenos mencionados anteriormente, es decir, para unirlos. Esta coagregación se puede eliminar fácilmente por deglución o enjuague y/o en el caso de una suspensión, se pueden enjuagar en particular, lo que logra de manera ventajosa una reducción del número de patógenos. Las bacterias del ácido láctico y/o una composición que las contiene se pueden usar con este fin de varias formas. Por ejemplo, se pueden usar en pulverizados, soluciones para hacer gárgaras o enjuagues bucales, en forma de grageas o comprimidos para la garganta, pastillas, píldoras recubiertas, aerosoles, pasta de dientes, zumos, sirope o como un aditivo en los alimentos y/o como un complemento alimentario. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a todos los productos usados en el campo de la higiene física, y los productos médicos y la profilaxis, y que contienen las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención. Por consiguiente, las realizaciones descritas anteriormente se consideran para las zonas de tratamiento, terapia y prevención en mamíferos. Las bacterias del ácido láctico y/o las composiciones que las contienen pueden, por lo tanto, usarse de diversas maneras.

Preferentemente, en particular, la composición de acuerdo con la invención y/o las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención se usan para producir un fármaco farmacéutico para el tratamiento o la prevención de los síntomas de garganta, faringitis atrófica sicca, faringitis seca, angina lateral, amigdalitis causada por *Streptococcus pyogenes*. Las bacterias del ácido láctico y las composiciones de acuerdo con la invención que contienen las mismas proporcionan agentes con los que se pueden tratar y/o prevenir estas enfermedades ventajosamente. Las bacterias del ácido láctico y/o las composiciones que las contienen pueden usarse tanto en medicina humana como veterinaria, en particular, en perros, gatos, caballos, camellos y halcones, como ya se ha indicado. La composición y/o las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención - o los fragmentos, derivados o mutantes de las mismas - se pueden usar, en particular, como aditivos alimentarios, productos de higiene y/o como productos de higiene que contienen las bacterias del ácido láctico o como un preparado farmacéutico.

La presente invención también se refiere a un método de identificación y/o selección de un microorganismo del género *Lactobacillus* sp. que tiene las propiedades de acuerdo con la invención, de manera que el método comprende al menos los siguientes etapas: a) incubar un lote de un microorganismo patógeno seleccionado de *Streptococcus pyogenes* para unirse a la fibronectina; b) añadir el microorganismo del género *Lactobacillus* que se va a examinar e incubar el lote para formar la unión específica entre el microorganismo patógeno y el microorganismo del género que se va a examinar; c) separar los microorganismos no unidos del género *Lactobacillus* retirando el sobrenadante; y d) determinar la unión a la fibronectina con respecto a los microorganismos unidos y agregados del género *Lactobacillus*.

En una realización preferida, el método de acuerdo con la invención también comprende la etapa de examinar la prevención de la unión a la fibronectina por *Streptococcus pyogenes*. Los microorganismos del género *Lactobacillus* que se van a examinar se añadieron en el presente documento durante la incubación del microorganismo patógeno marcado con fluorescencia que se une a la fibronectina. Tras retirar las células no unidas, preferentemente se realiza la cuantificación específica de la unión a la fibronectina midiendo la fluorescencia en comparación con los controles mediante la adición de los microorganismos que se van a ensayar.

Es evidente que las características mencionadas anteriormente y las que aún deben describirse a continuación pueden usarse no solo en la combinación particular dada, sino también solo sin ir más allá del alcance de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Se derivan ventajas adicionales a partir de las siguientes figuras y los experimentos realizados en este sentido, así como las realizaciones a modo de ejemplo. Los experimentos se realizaron usando todas las bacterias del ácido láctico preferidas, aunque, en el presente documento, solo se presentan algunos de los experimentos. Los expertos en la materia pueden reproducir la invención basándose en los ejemplos, en los que:

La Figura 1 muestra la unión específica y/o agregación de una realización ilustrativa de los microorganismos de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25989, DSM 25973) a una biopelícula formada por *Streptococcus pyogenes* (ensayo de unión) después de lavar las células no unidas tres veces y, a modo comparativo, cepas de *Lactobacillus* adicionales que no son de acuerdo con la invención y que no son capaces de unirse a *Streptococcus pyogenes* (especie de *Lactobacillus* 1 y especie de *Lactobacillus* 2); la cuantificación específica de la unión y/o agregación de cepas de *Lactobacillus* marcadas con CFDA de acuerdo con la invención a la biopelícula de *S. pyogenes* en placas de microtitulación de 96 pocillos basadas en la medición de la fluorescencia (Ex 485 nm/Em 535 nm). De esta forma, los expertos en la materia aprenderán que los microorganismos preferidos pueden usarse en infecciones bacterianas que se producen especialmente en el zona orofaríngea en particular.

La Figura 2 muestra los controles macroscópicos (fotografía de una placa de microtitulación de 24 pocillos) de la

unión específica de una realización ilustrativa de un microorganismo de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973) a *Streptococcus pyogenes* en el lote de coagregación a escala de 24 pocillos, así como las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y la cepa diana de *Streptococcus pyogenes*, ambas solas y en un sistema de documentación fotográfica. Se forma un precipitante blanco mediante coagregación (y la precipitación asociada). Entonces, el aglomerado hace que *Streptococcus pyogenes*, en particular, no pueda unirse a las células epiteliales de la garganta. Los ensayos en pacientes han demostrado que las infecciones bacterianas pueden prevenirse o reducirse por medio de los microorganismos preferidos.

La Figura 3 muestra la representación microscópica de la unión específica de una realización ilustrativa de un microorganismo de acuerdo con la invención (DSM 25987 y DMS25973) a células de *Streptococcus pyogenes* tras la coagregación, así como las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y *Streptococcus pyogenes* sola. Mediante formación de imágenes microscópicas (contraste de fase, aumento de x1000); los coagregados pueden verse como aglomerados de células grandes.

La Figura 4 muestra los controles macroscópicos (fotografía de una placa de microtitulación de 24 pocillos) de la unión específica de una realización ilustrativa de un microorganismo de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DMS25989 and DMS25973) a células de *Streptococcus pyogenes* (coagregación) en saliva humana, así como las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y *Streptococcus pyogenes* sola en un sistema de documentación fotográfica. También se produce un depósito blanco mediante coagregación (y la precipitación asociada). Fue sorprendente que los microorganismos preferidos ya se unieran a *Streptococcus pyogenes* en la saliva, en particular, coagregándose allí y evitando así la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales. También fue sorprendente que los microorganismos preferidos no perdieran sus capacidades preferidas debido a las enzimas presentes en la saliva. Por lo tanto, los microorganismos preferidos son ventajosos de usar en un agente de aplicación oral tal como, en particular, un caramelo.

La Figura 5 muestra la influencia de una realización ilustrativa de los microorganismos de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973) sobre la prevención de la unión a la fibronectina de la cepa ATCC 19615 de *Streptococcus pyogenes* tras 2 horas de incubación a 37 °C con suspensión de *Lactobacillus* (viable) lavada en PBS y suspensión de *Lactobacillus* (muerta) destruida mediante un tratamiento térmico. La cuantificación específica es la unión de *Streptococcus pyogenes* marcado con CFDA a la placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con fibronectina. Esto muestra la unión de *Streptococcus pyogenes* en porcentaje, en la que el 100 % representa la unión de *S. pyogenes* (ATCC 19615) sola al recubrimiento de fibronectina de la placa de microtitulación sin la adición de la suspensión de *Lactobacillus*. Se encuentra que los microorganismos preferidos evitan la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales en la garganta y, por lo tanto, también previenen la infección bacteriana.

La Figura 6 muestra la influencia de una realización ilustrativa de los microorganismos de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973) sobre la unión de *Streptococcus pyogenes* (cepa ATCC 12344) a la fibronectina tras 2 horas de incubación a 37 °C (con suspensión de *Lactobacillus* (viable) lavada en PBS y suspensión de *Lactobacillus* (muerta), en la que el *Lactobacillus* se destruye mediante tratamiento térmico). Esto muestra la cuantificación específica de la unión de *Streptococcus pyogenes* marcado con CFDA a la placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con fibronectina. Esto muestra la unión de *Streptococcus pyogenes* en porcentaje, en la que el 100 % representa la unión de *S. pyogenes* sola al recubrimiento de fibronectina de la placa de microtitulación sin la adición de la suspensión de *Lactobacillus*.

La Figura 7 muestra la representación macroscópica (fotografía de una placa de microtitulación de 24 pocillos) de la coagregación de una realización ilustrativa del microorganismo de acuerdo con la invención (DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DMS 25989 y DMS 25973) y *Streptococcus salivarius* en tampón de PBS, así como las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y *Streptococcus salivarius* sola en un sistema de documentación fotográfica.. El depósito blanco se forma por coagregación (y la precipitación resultante).

### Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

#### Ejemplo 1:

Para la identificación y selección de microorganismos de acuerdo con la invención, se analizaron diversas cepas de un banco de cepas de *Lactobacillus* mediante un proceso de exploración de cuatro etapas en el que se exploraron primero con respecto a la capacidad de unirse al microorganismo patógeno diana *Streptococcus pyogenes* (en lo sucesivo también denominado "microorganismo diana") (ensayo de unión) y, después, las cepas identificadas en la primera etapa se ensayaron en un ensayo de coagregación a escala de placa de microtitulación, en el que se midió cualitativamente la coagregación con el microorganismo diana respectivo usando un estereomicroscopio binocular. En el sentido de la presente invención, el término "co-agregación" se usa como sinónimo del término "coagregación". Además, se examinaron la intensidad de la coagregación y la estabilidad de la unión al microorganismo diana, así como la capacidad de evitar la unión a la fibronectina, lo que finalmente condujo a los microorganismos ilustrativos de acuerdo con la invención que se identificaron (*Lactobacillus*).

Ensayo de unión

Se estableció un ensayo de unión para permitir la cuantificación de la actividad de unión de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, permitiendo la detección cuantitativa de la unión de cepas de *Lactobacillus* a microorganismos patógenos en una placa de 96 pocillos. La actividad de unión de las células de *Lactobacillus* con el microorganismo diana se correlaciona con la actividad de coagregación y/o la capacidad de coagregación. Esto se ensayó experimentalmente. En este sentido, la Figura 2 muestra un ejemplo de coagregación de *Lactobacillus* DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 and DSM 25973 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

El método de medición se basa en la unión específica de las cepas de acuerdo con la invención a una cepa diana unida en una biopelícula. Las cantidades definidas de las cepas de acuerdo con la invención se marcaron con un colorante fluorescente (solución de CFDA, Invitrogen) y se mezclaron con una cantidad definida de microorganismos diana unidos a una biopelícula para el ensayo. La persistencia de las cepas unidas de acuerdo con la invención sobre la cepa diana se mide usando un fotómetro de fluorescencia después del lavado varias veces.

Para realizar estos ensayos, se cultivaron los microorganismos diana *Streptococcus pyogenes* de acuerdo con el protocolo convencional. La cepa se cultivó en medio THY (caldo Todd Hewitt) en condiciones aerobias a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron anaeróbicamente a 37 °C en medio MRS (véase de Man *et al.* (1960) "A medium for the cultivation of Lactobacilli", *J. Appl. Bact.* 23(130-135). Para el tratamiento del microorganismo diana, se cosecharon las células después de 5 a 6 horas de cultivo en la fase de crecimiento exponencial medio, luego se lavaron tres veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) y se disolvieron en PBS. Para ello, se dispusieron 100 µl de la suspensión en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Durante una incubación de 16 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %, el microorganismo diana forma una biopelícula. Tras la incubación, se retiraron las células no unidas lavando tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Para el procesamiento de las cepas de *Lactobacillus*, se cosecharon después de cultivar durante 24 horas, luego se lavaron tres veces con PBS, se colocaron en PBS y se marcaron con fluorescencia mediante la adición de la solución de CFDA (Invitrogen). Para realizar el ensayo de unión, se añadieron 100 µl de suspensión de *Lactobacillus* marcado con fluorescencia por pocillo a la cepa diana unida a una biopelícula. Los lotes de control sin adición de la suspensión de *Lactobacillus* se llevaron en paralelo. Tras la incubación durante 1 hora a 37 °C en una incubadora, se separaron las células no unidas y se lavaron tres veces con PBS. Después de cada etapa de lavado, se midió la fluorescencia en un fotómetro de placa de fluorescencia (Em 485 nm/Ex 535 nm). El aumento de la fluorescencia (Em 485 nm/Ex 535 nm) en el lote con las cepas de *Lactobacillus* en comparación con los controles sin células de *Lactobacillus* se correlacionó con la cantidad de células de *Lactobacillus* unidas a la biopelícula. La fluorescencia medida después de la unión de las células de *Lactobacillus* correspondió a la intensidad de unión. Cuanto mayor sea este valor, mejor será la unión de las células de *Lactobacillus* marcadas a las cepas diana unidas en la biopelícula y mayor será la actividad de unión de las células de *Lactobacillus* ensayadas.

Estos experimentos han demostrado que, para el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*, en el ensayo de unión después de la eliminación de las células no unidas, las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención condujeron a un aumento de la fluorescencia de hasta 17 veces debido a la unión de las células de *Lactobacillus* marcadas a las cepas diana unidas en la biopelícula tras tres lavados. La Figura 1 muestra los resultados del ensayo de unión para *Lactobacillus* DSM 25972, DSM 25989 y DSM 25973 con *Streptococcus pyogenes* como ejemplo para los microorganismos de acuerdo con la invención. A modo comparativo, la Figura 1 también muestra los datos sobre cepas de *Lactobacillus* no de acuerdo con la presente invención (especies 1 y 2 de *Lactobacillus*) que no son capaces de realizar la unión específica para el microorganismo diana. Se encuentra que los microorganismos preferidos son capaces de prevenir infecciones bacterianas en seres humanos y animales y/o se usan para el tratamiento de los mismos debido a que se coagregan específicamente con *Streptococcus pyogenes*. De esta forma, se impide la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células epiteliales, por una parte, mientras que, por otra parte, se impide la formación de biopelículas por *Streptococcus pyogenes*, o se disuelve o se rompe cualquier biopelícula que ya se haya formado.

**Ejemplo 2:**Ensayo de coagregación

La siguiente verificación en un volumen de 1,0 ml y/o en una placa de 24 pocillos se usa para ilustrar la actividad de coagregación de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

En este método, se considera por separado el comportamiento de coagregación de los lactobacilos y de la cepa diana y, finalmente, se considera conjuntamente la coagregación de *Lactobacillus* y de la cepa diana en una mezcla. Este análisis se realiza macroscópicamente mediante el uso de fotografías de la placa de 24 pocillos, así como microscópicamente. Para realizar estos ensayos, se cultivó el microorganismo diana, *Streptococcus pyogenes*, de acuerdo con el protocolo convencional. La cepa se cultivó en medio THY (caldo Todd Hewitt) en condiciones aerobias en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en medio MRS (véase de Man *et al.* (1960) "A medium for the cultivation of lactobacilli", *J. Appl. Bact.* 23 (130-135)), anaeróbicamente a 37 °C.

Para el tratamiento del microorganismo diana, se cosecharon las células en la fase de crecimiento exponencial medio después de 5 a 6 horas de cultivo, luego se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) y se ajustaron a  $DO_{600} = 4$ . Para el tratamiento de cepas de *Lactobacillus*, se cosecharon después de cultivar durante 16 horas, se lavaron dos veces con PBS y luego se colocaron en un volumen de PBS y, por consiguiente, se ajustaron a una  $DO_{600} = 4$ . Para realizar el ensayo de coagregación, se combinaron partes de 500  $\mu$ l de una suspensión de microorganismos diana por pocillo con 500  $\mu$ l de suspensión de *Lactobacillus* en una placa de 24 pocillos. En paralelo, se ensayaron lotes de control con 500  $\mu$ l del microorganismo diana más 500  $\mu$ l de PBS o 500  $\mu$ l de la respectiva suspensión de *Lactobacillus* en 500  $\mu$ l de PBS (control 1). Después de incubar durante 10 minutos a 25 °C en un agitador de escritorio, se observaron los lotes macroscópicamente mediante el uso de un sistema de documentación fotográfica además de observarse microscópicamente. Para el análisis de la capacidad de coagregación de las células de *Lactobacillus* muertas, primero se sacrificaron mediante un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos en un baño de agua y luego se usaron en el ensayo de coagregación.

Estos experimentos mostraron que la cepa de *Lactobacillus* seleccionada se coagregaría con el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*, de modo que fuera posible observar aglutinación (agregados) en la mezcla, que son visibles macroscópicamente por regiones irregulares condensadas y/o granulares en el pocillo. No hay aglutinación o formación de agregado en los pocillos que contienen la cepa diana y/o las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención por separado. La suspensión celular en el pocillo permanece homogénea. La Figura 2 muestra los resultados macroscópicos en el lote de coagregación para las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, tanto vivas como muertas para el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*. En la observación microscópica, existe una afinidad claramente definida por el microorganismo diana en todas las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención, lo que conduce a diferentes tamaños de agregados en la observación microscópica de la coagregación. La Figura 3 muestra los resultados microscópicos en el lote de coagregación para las cepas de *Lactobacillus* DSM 25987 y DSM 25973 de acuerdo con la invención para el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo. Los microorganismos preferidos son capaces de prevenir o combatir las infecciones bacterianas causadas por *Streptococcus pyogenes* y/o en las que participa *Streptococcus pyogenes*, en particular, en pacientes o animales.

### Ejemplo 3:

#### Coagregación en la saliva humana

Para examinar la capacidad de coagregación de las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención en la saliva humana natural, se recogieron tras 16 horas de cultivo como se describe en el Ejemplo 2, se lavaron dos veces en PBS y se colocaron en saliva humana. La saliva se había recogido previamente de varias personas, se había mezclado y separado de las partículas mediante centrifugación a 8.000 g a los 20 minutos. El microorganismo diana se trató como se describe en el Ejemplo 2 y se colocó igualmente en saliva humana después de lavar dos veces en PBS. Para realizar el ensayo de coagregación, se combinaron partes de 500  $\mu$ l de una suspensión de microorganismos diana en saliva con 500  $\mu$ l de suspensión de *Lactobacillus* en saliva por pocillo en una placa de 24 pocillos. En paralelo, se ensayaron lotes de control con 500  $\mu$ l del microorganismo diana más 500  $\mu$ l de saliva o 500  $\mu$ l de la respectiva suspensión de *Lactobacillus* en 500  $\mu$ l de saliva (control 1). Después de incubar durante 10 minutos a 25 °C en un agitador de escritorio, se observaron los lotes macroscópicamente mediante el uso de un sistema de documentación fotográfica además de observarse microscópicamente.

Los ensayos han demostrado que la cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención en saliva natural es capaz de realizar una coagregación específica con el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*. Esto proporciona los mejores requisitos previos para la aplicación de las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención en el espacio orofaríngeo. Los microorganismos preferidos para esto pueden administrarse por vía oral en forma de caramelo, por ejemplo, y conducir al alivio o incluso al tratamiento completo de infecciones bacterianas. La Figura 4 muestra los resultados macroscópicos de la coagregación en saliva humana natural para las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención con el microorganismo diana *Streptococcus pyogenes*.

### Ejemplo 4:

#### Prevención de la unión a la fibronectina

Para examinar el efecto de las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención sobre la unión del microorganismo patógeno diana *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) a la fibronectina, se estableció un ensayo de unión que permite la detección cuantitativa de la unión del microorganismo diana marcado con fluorescencia en una placa de 96 pocillos recubiertos de fibronectina. Las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención se añadieron directamente al microorganismo diana marcado con CFDA al comienzo de la unión y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Tras eliminar las células no unidas y lavar dos veces con PBS, se realizó la cuantificación específica de las células del microorganismo diana unidas midiendo la fluorescencia a Em de 485 nm/Ex de 535 nm en el fotómetro de placa de fluorescencia. Para realizar estos ensayos, se cultivaron las cepas diana y las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención de acuerdo con protocolos convencionales. Para el tratamiento de las cepas de *Lactobacillus*, se lavaron dos veces en PBS después del cultivo y luego se colocaron en PBS. Algunas de

las cepas de *Lactobacillus* se sacrificaron por pasteurización a 70 °C durante 30 minutos después del lavado en PBS. Para el tratamiento de la cepa diana, se cultivó durante 16 horas hasta alcanzar la fase de crecimiento en estado estacionario, luego se cosechó, se marcó mediante la adición de fluorescencia CFDA y se ajustó a  $DO_{600nm} = 3,0$ . Para realizar el ensayo de unión, se añadieron las células de *Lactobacillus* directamente al microorganismo diana marcado con fluorescencia al comienzo de la unión y se incubaron durante 2 horas en condiciones microaerofílicas a 37 °C. Los lotes de control sin adición de la suspensión de *Lactobacillus* se llevaron en paralelo. Tras eliminar las células planctónicas y lavar las células encontradas en la biopelícula, se realizó la cuantificación específica de las células del microorganismo diana unidas mediante la medición de fluorescencia con y sin células de *Lactobacillus*. Se correlacionó la reducción de la fluorescencia en comparación con los controles del microorganismo diana sin *Lactobacillus* con la intensidad de la unión del microorganismo diana *Streptococcus pyogenes* a la placa de microtitulación recubierta de fibronectina. Esta reducción se representa en el porcentaje de impedimento de la formación de biopelículas. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos con las cepas de *Lactobacillus* DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973 en el impedimento de la unión a la fibronectina; estas cepas se consideraron un ejemplo de los microorganismos de acuerdo con la presente invención, concretamente *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Los experimentos han demostrado que esto conduce a la unión impedida de microorganismos diana a la fibronectina debido a las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención enumeradas anteriormente tanto forma viable como muerta. Por lo tanto, esto muestra que las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención son capaces de prevenir la unión de *Streptococcus pyogenes* a las células hospedadoras. Además, también se realizaron experimentos con microorganismos adicionales del mismo género y especie para representar la especificidad de las propiedades de unión y/o las propiedades de agregación de las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención, así como su capacidad para evitar la unión a la fibronectina en función de los microorganismos diana del mismo género y especie. *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344, entre otros, se seleccionó con este fin. Para examinar su efecto sobre la unión del microorganismo diana *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344 a la fibronectina, las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y el microorganismo diana se cultivaron en condiciones convencionales como se ha descrito anteriormente, luego se procesaron y se usaron en el ensayo.

Los ensayos han demostrado que la cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención también puede agregar otros microorganismos de la misma especie y género, y que las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención también pueden evitar que otros microorganismos diana se unan a la fibronectina. La Figura 6 muestra los resultados en la prevención de la unión de *Streptococcus pyogenes* (cepa ATCC 12344) a la fibronectina por las cepas de *Lactobacillus* DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973 como ejemplo de los microorganismos de acuerdo con la invención. Resultó completamente sorprendente que la administración de los microorganismos preferidos a seres humanos o animales pudiera usarse para prevenir o tratar infecciones bacterianas, por lo que microorganismos adicionales del mismo género y especies que *Streptococcus pyogenes* también pueden participar en la infección.

#### Ejemplo 5:

##### Coagregación de *Streptococcus salivarius*

Se cultivaron cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y *Streptococcus salivarius* de acuerdo con condiciones convencionales, se lavaron tres veces en PBS y se usaron en saliva humana en el ensayo de coagregación. Los resultados muestran que *Streptococcus salivarius* no es coagregada por las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención (Figura 7). Por lo tanto, puede descartarse la posibilidad de que las cepas comensales, representadas en el presente documento por *Streptococcus salivarius* como ejemplo, no sean coagregadas por cepas de *Lactobacillus* y extraídas de su hábitat natural. Esto muestra, en particular, que las bacterias del ácido láctico preferidas tienen una acción específica contra las infecciones bacterianas.

#### Lista de referencias

Beachey y Ofek (1976), "Epithelial cell binding of Group A Streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein". *Journal of experimental medicine* 143:759-771

Bisno (1995), "Streptococcus pyogenes S". 1786ff en Mandell, Bennett y Dolin (Hrsg.) "Principles and practice of infectious diseases". Vol 2. Churchill Livingstone, Nueva York.

Courtney *et al.* (1999) "Strategies for prevention of group A streptococcal adhesion and infection", pág. 553ff. En An y Friedman (Hrsg.) "Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications". Humana Press, Totowa, N.J.

Cunningham (2000), "Pathogenesis of group A streptococcal infections". *Clin Microbiol Rev* 13:470-511.

Hasty *et al.* (1992) "Multiple adhesins of Streptococci". *Infect Immun* 60: 2147-2152.

Kaplan (1991) "The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*

10:55-57.

Kilian (2002) "Streptococcus and Enterococcus". En: Medical Microbiology. Greenwood, D.; Slack, R. C. A.; Peutherer, J.F. (Hrsg.) capítulo 16. Churchill Livingstone, Edingburgh, RU: pág. 174-188, 2002.

5 LaPenta *et al.* (1994). "Group A Streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 91:12115-12119.

10 Musser y Krause (1998), "The revival of group A streptococcal diseases, with a commentary on staphylococcal toxic shock syndrome". En *Emerging Infections*. Krause (Hrsg.) Academic Press, Nueva York.

Reid *et al.* (2001) "Group A Streptococcus: Allelic Variation, population genetics, and host pathogen interactions". *J Clin Invest* 107: 393-399.

15 Simpson y Beachey (1983) "Adherence of group A Streptococci to fibronectin on oral epithelial cells". *Infect Immun* 39:275-279.

## REIVINDICACIONES

1. Una bacteria láctica o su lisado celular para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades microbianas de la piel, de las membranas mucosas y/o de la cavidad oral, en la que la bacteria del ácido láctico se coagrega con un *Streptococcus pyogenes*, y estando la bacteria del ácido láctico seleccionada del grupo que comprende los siguientes microorganismos depositados en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, y numerados como DSM 25972, DSM 25987, DSM 25988, DSM 25989 y DSM 25973.
2. La bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la coagregación con el *Streptococcus pyogenes* es posible incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico, y/o la coagregación con el *Streptococcus pyogenes* es posible a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 8.
3. La bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en la que la bacteria del ácido láctico o su lisado celular es capaz de inhibir la formación de biopelícula por parte del *Streptococcus pyogenes*, y/o en la que la bacteria del ácido láctico o su lisado celular es capaz de evitar que *Streptococcus pyogenes* se una a la fibronectina, y/o en la que la bacteria del ácido láctico o su lisado celular no se coagrega con ningún microorganismo comensal de la piel ni de las membranas mucosas.
4. Una composición que comprende al menos una bacteria del ácido láctico o su lisado celular de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende preferentemente un vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable y/o en la que la composición está en una forma sólida, líquida o viscosa, o es un aerosol y/o en la que la composición está en forma de una pasta, cápsula de gelatina blanda, cápsula de gelatina dura, polvo, gránulos, perlas, pastillas, comprimido efervescente, gragea, comprimido bucal, comprimido masticable, comprimido sublingual, solución, tintura, emulsión, zumo, concentrado, jarabe, pulverizado, ampolla bebible, gel, enjuague bucal, pasta de dientes, chicle, comprimido, comprimido recubierto o caramelo, y/o en la que la composición comprende probióticos, antisépticos u otras sustancias antibacterianas, y/o en la que la composición contiene además una o más de las siguientes sustancias: antioxidantes, vitaminas, coenzimas, ácidos grasos y aminoácidos, cofactores, uno o más edulcorantes y/o uno o más edulcorantes artificiales.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación precedente, en la que la composición es una composición farmacéutica, veterinaria o cosmética, o un suplemento dietético o una composición dietética.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en la que la bacteria del ácido láctico está viva o muerta en la composición, y/o la bacteria del ácido láctico está en forma encapsulada, secada por pulverización y/o liofilizada, y/o la bacteria del ácido láctico está presente en una cantidad del 0,001 % en peso al 20 % en peso, preferentemente en una cantidad del 0,005 % en peso al 10 % en peso, en particular, preferentemente en una cantidad del 0,01 % en peso al 5 % en peso.
7. Un método de identificación y/o selección de una bacteria del ácido láctico que tiene la propiedad de coagregarse con *Streptococcus pyogenes*, en el que el método comprende al menos las siguientes etapas:
- incubar el microorganismo patógeno para formar una biopelícula;
  - añadir una bacteria del ácido láctico que se va a examinar a una mezcla para la coagregación entre el microorganismo patógeno y la bacteria del ácido láctico que se va a examinar, e incubar la mezcla;
  - separar cualquier bacteria del ácido láctico no unida mediante la retirada del sobrenadante; y ensayar la biopelícula con respecto a las bacterias del ácido láctico coagregadas.
8. El método de acuerdo con la reivindicación precedente, que comprende además la etapa de:
- examinar la inhibición de la biopelícula realizada por los microorganismos patógenos, en el que la bacteria del ácido láctico que se va a examinar se añade durante la incubación del microorganismo patógeno que forma la biopelícula y/o
- que además comprende la etapa de:
- cuantificar la formación de la biopelícula tras la retirada de las células no unidas midiendo la densidad óptica en comparación con un grupo de control sin la adición de la bacteria del ácido láctico que se va a ensayar.
9. Uso de la composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 4 a 6 para producir un producto farmacéutico, un producto medicinal o un producto cosmético para el tratamiento, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades microbianas de la piel, de las membranas mucosas y de la cavidad oral.
10. El uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición se usa para la prevención y/o el tratamiento por vía tópica de enfermedades microbianas o enfermedades inflamatorias, preferentemente enfermedades microbianas o enfermedades inflamatorias de la cavidad oral, siendo la composición

usada en forma de una masa masticable, un chicle, un caramelo, una pastilla, una pasta de dientes, un pulverizado o un enjuague bucal.

5 11. El uso de la composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 4 a 6 para producir un agente de limpieza o desinfectante para el tratamiento de superficies.

10 12. El uso de la composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 4 a 6 para producir un producto para su uso en el campo de los productos medicinales y/o preventivos, y/o para producir un agente para la ingestión oral, sublingual o bucal, y/o para producir un aditivo antimicrobiano de acción específica para el tratamiento tópico de inflamaciones en el espacio orofaríngeo y de infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel.

15 13. Un kit para tratamiento de higiene que comprende microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6, junto con dispositivos o aparatos de higiene física, enjuagues y/o pastas.

Figura 1

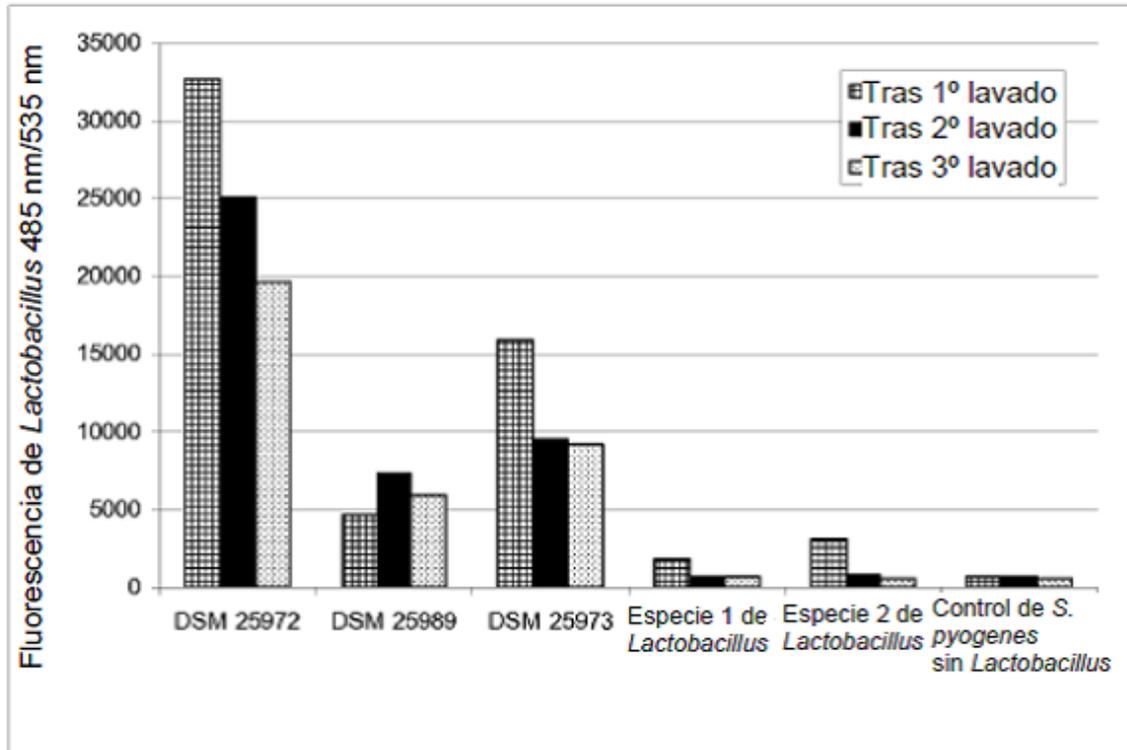


Figura 2

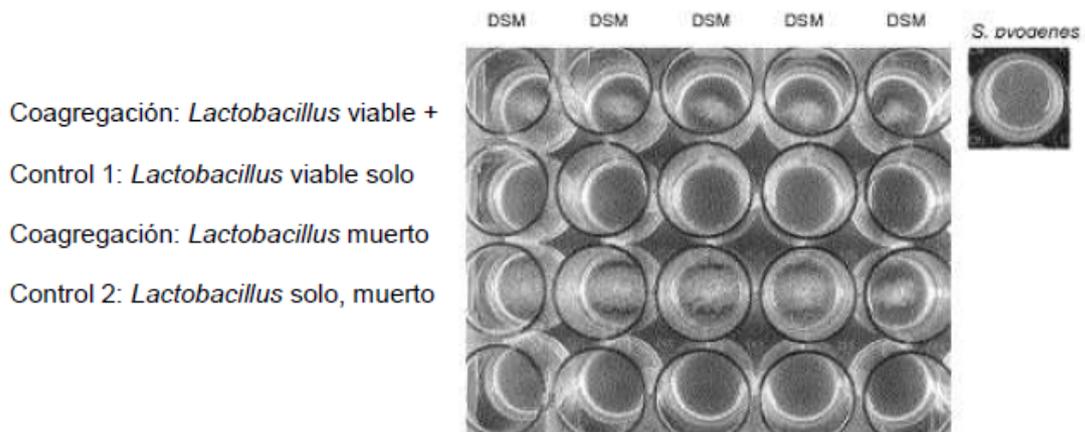


Figura 3

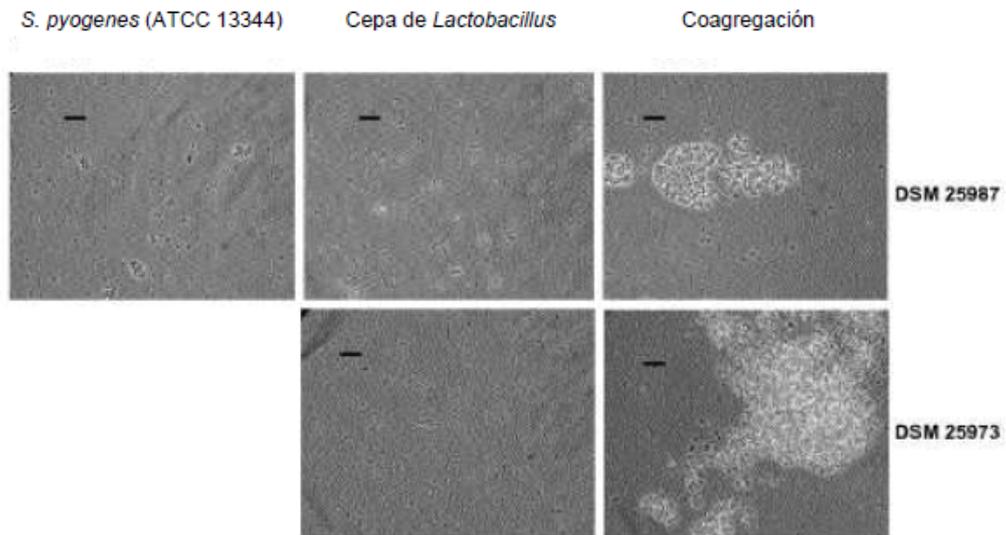


Figura 4

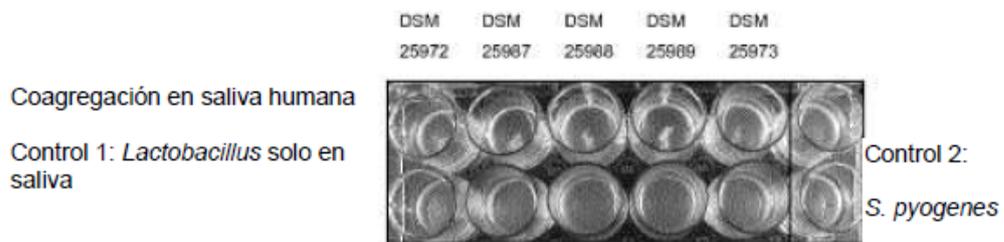


Figura 5

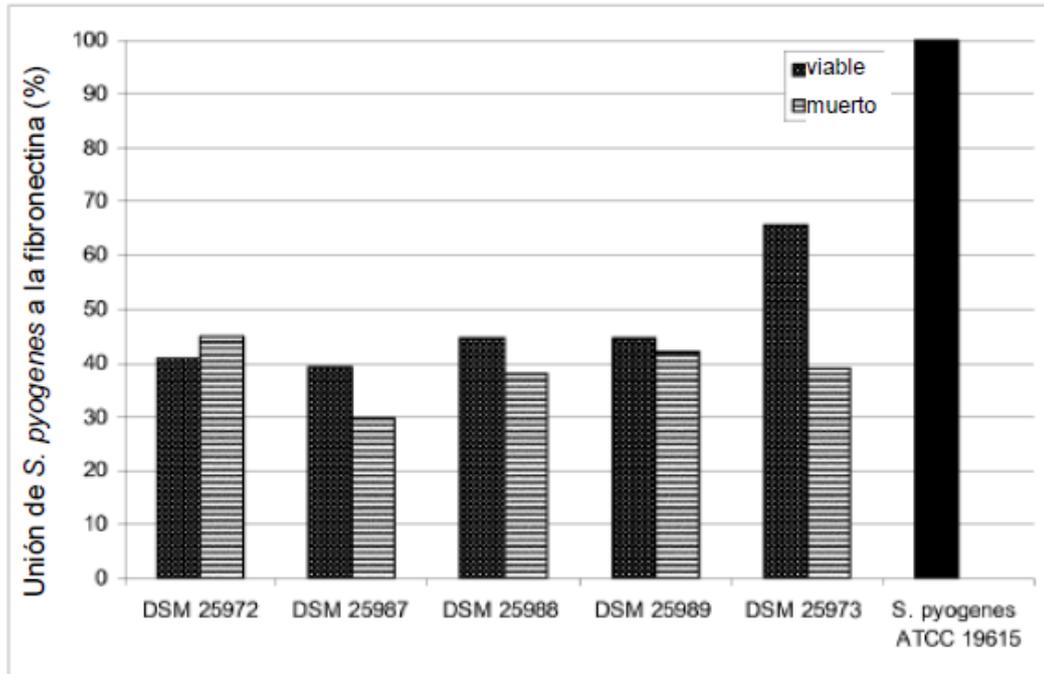


Figura 6

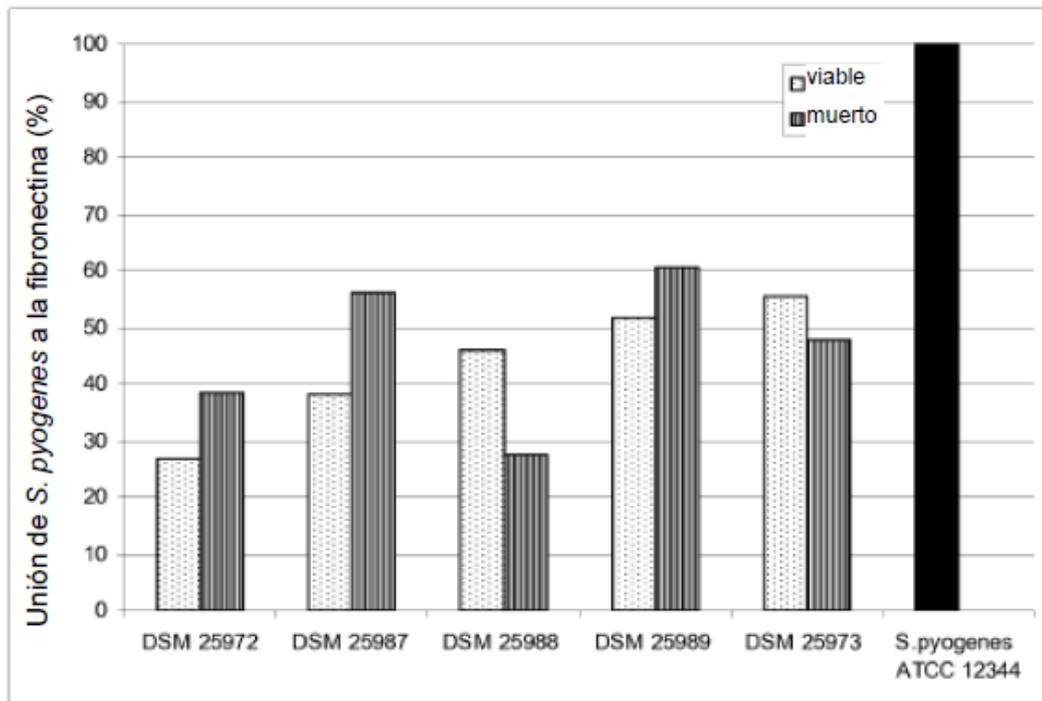


Figura 7

