

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 328**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)	C12Q 1/04	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)		
A61K 35/74	(2015.01)		
A61K 8/99	(2007.01)		
A23L 33/135	(2006.01)		
A61Q 19/10	(2006.01)		
A61K 35/744	(2015.01)		
A61K 35/747	(2015.01)		
A61Q 17/00	(2006.01)		
C11D 3/38	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2012 PCT/DE2012/100129**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152270**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2012 E 12730781 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2705140**

54 Título: **Nuevas bacterias de ácido láctico y composiciones que las contienen**

30 Prioridad:

06.05.2011 DE 102011101134

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

28.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LANG, CHRISTINE;
RAAB, ANDREAS y
GOLLETZ, PATRICK**

74 Agente/Representante:

GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando

ES 2 674 328 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).

NUEVAS BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO Y COMPOSICIONES QUE LAS CONTIENEN

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a nuevas bacterias de ácido láctico, o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos, así como a composiciones que las contienen, en particular para uso como probióticos y / o en higiene y terapia física. La presente invención se refiere en particular al uso de las nuevas bacterias de ácido láctico y / o composiciones que las contienen para el tratamiento y / o prevención de todas las enfermedades que pueden ser causadas por *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*.

Además, el desarrollo descrito aquí presenta un producto biológico innovador en forma de microorganismos GRAS, bacterias de ácido láctico que pueden usarse como un aditivo antimicrobiano que tiene una acción específica para la prevención y tratamiento tópico de infecciones de la piel y para acelerar el tratamiento de heridas crónicas.

Además, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de acuerdo con la invención, o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos en composiciones o productos farmacéuticos o productos cosméticos o productos médicos, así como para desinfectantes de la piel o de superficie.

Antecedentes

La función principal de la piel es proteger el tejido subyacente del entorno externo. Por lo tanto, previene, entre otras cosas, la penetración de microorganismos patógenos en el cuerpo. La piel y las membranas mucosas están, por supuesto, pobladas por una amplia variedad de microorganismos que a menudo viven como comensales en una composición relativamente estable en la superficie y apoyan la función protectora de la piel. En el caso ideal, las bacterias que tienen un efecto positivo en la salud serán dominantes sobre los microorganismos dañinos que se producen al mismo tiempo. Si este sistema se desequilibra, los efectos negativos sobre la salud y el bienestar de la persona quedan prácticamente predestinados.

Los microorganismos patógenos tienen la capacidad de adherirse específicamente a las estructuras de la epidermis a través de proteínas de unión. Por ejemplo, se sabe que la presencia de adhesinas con las que el microorganismo puede adherirse a estructuras de fibronectina se produce con la cepa patógena *Staphylococcus aureus* (Bingham, R. J. et al. 2008, O'Neill, E. et al., 2008).

Los microorganismos patógenos suelen tener un mayor potencial para adherirse al huésped, lo que explica el aumento de la virulencia. La presencia de lesiones extremadamente pequeñas u otras lesiones en las capas superiores de la piel aumenta el riesgo de invasión de microorganismos patógenos.

Además, las infecciones bacterianas de las superficies de la herida, especialmente en la cicatrización de heridas, pueden provocar complicaciones. Primero existe el riesgo de que la herida aguda no cicatrice y dé lugar a heridas crónicas. La microflora de estas heridas crónicas es muy compleja y se sabe que una variedad de microorganismos puede tener un efecto perjudicial en el proceso de curación de la herida (Davies et al., 2004, Kirketerp-Moller et al., 2008).

Las bacterias aeróbicas, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, se han identificado como los principales patógenos en las heridas. La fase inflamatoria de la curación de heridas normalmente sirve para combatir microorganismos potencialmente patógenos y para la regeneración celular. Sin embargo,

a menudo se producen heridas poco curativas o refractarias en pacientes que ya están inmunosuprimidos y tienen una respuesta inflamatoria reducida. Esta respuesta inmune debilitada ya no puede proporcionar una defensa efectiva contra las bacterias de la herida primaria, por lo que las bacterias penetran en la herida y forman colonias, que se organizan como biopelículas (James et al., 2008).

5 Las biopelículas no solo son resistentes al sistema de defensa del huésped sino también a las células
plancónicas o microcolonias (Fux et al., 2005, Sheldon 2005). Debido al sistema inmune deteriorado, la
biopelícula mantiene el proceso de cicatrización de la herida en la fase de inflamación con el resultado de que
hay una concentración elevada de metaloproteínas de la matriz como elastasa, plasmina y trombina, que a su
vez degradan los factores de crecimiento y sus receptores que son esenciales para la curación (Mast y
10 Schultz 1996).

Además, las concentraciones elevadas de radicales libres de oxígeno y citoquinas inflamatorias condujeron a un daño severo de las células huésped (James et al., 2003, Moseley et al., 2004).

En la técnica anterior se han descrito agentes terapéuticos capaces de eliminar la biopelícula y, de este modo, combatir las causas de heridas crónicas y refractarias.

15 Estado de la Técnica

Las infecciones de las heridas también se tratan de acuerdo con el estado actual de la técnica mediante terapias antibióticas complejas que no siempre ayudan a la curación porque los organismos de la herida mencionados anteriormente no responden a dicho tratamiento debido a su adaptabilidad y mecanismos de resistencia, incluida su capacidad para formar una biopelícula. Se encuentran disponibles productos para el cuidado de la piel tales como geles de ducha de pH optimizado, lociones para lavar, aceites para ducha y lociones corporales para prevenir profilácticamente daños en la piel especialmente en pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo, aquellos con dermatitis atópica, eczema, dermatitis seborreica.

El principal patógeno *S. aureus* es un patógeno de enfermedad que puede sobrevivir sin nutrientes hasta por 7 meses. Sobrevive en la ropa y las manijas de las puertas, los interruptores de luz, el revestimiento del suelo y en el costado de la cama (Julia Bidder 2010). No causa síntomas en personas sanas, pero si el sistema inmunitario se debilita como en el caso de una infección de la herida, el microorganismo proliferará y causará inflamaciones que no sanan bien, úlceras en la piel, furúnculos, infecciones pulmonares, infecciones del tracto urinario y vida amenazando la toxicidad de la sangre, infecciones oculares, infecciones del oído medio. Las infecciones pueden saltar a prácticamente cualquier órgano. Ciertos factores pueden promover una infección con *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, un sistema inmune debilitado, diabetes mellitus, daño preexistente de la piel (descamación o neurodermatitis), lesiones en la piel (por ejemplo, debido a accidentes, cirugía, catéteres), ancianos con úlceras decubitales y pacientes encamados, pacientes obesos cuya propia piel ofrece un reservorio húmedo para el desarrollo de infecciones microbianas.

El antibiótico meticilina ya no es efectivo contra las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM). Lo que esto significa en la práctica es que estas cepas son multirresistentes contra tres o más antibióticos. Solo los llamados antibióticos de reserva son de ayuda ahora contra estas cepas. Las clínicas alemanas estiman el costo incrementado para el tratamiento de un paciente con SARM entre 1600 y 4300 euros por día (Julia Bidder 2010).

Pseudomonas aeruginosa es otro patógeno principal, que también se encuentra con frecuencia en infecciones nosocomiales y tiene múltiples resistencias a antibióticos debido a su metabolismo y su estructura

de la membrana celular. *P. aeruginosa* representa casi el 10% de todas las infecciones hospitalarias y es uno de los microorganismos nosocomiales más comunes en Alemania. El espectro de enfermedades causadas por estas bacterias es extenso. La capacidad de hemólisis es uno de los primeros factores desencadenantes de ello, al igual que los factores de patogenicidad como la exotoxina A (ADP ribosil transferasa) y las citotoxinas exoenzima S y exoenzima U, que producen la bacteria. La manifestación más común es la

5 neumonía con fibrosis quística, que puede ser especialmente grave en pacientes inmunodeprimidos y pacientes con SIDA. También se pueden desencadenar infecciones del tracto urinario, enterocolitis, meningitis, otitis externa ("oído de nadador"), infecciones de quemaduras o queratitis en usuarios de lentes de contacto.

10 Las bacterias de ácido láctico se usan generalmente como bacterias probióticas para proteger contra la enfermedad gastrointestinal causada por patógenos de enfermedades porque a menudo producen sustancias antibacterianas además del ácido láctico. Estas bacterias de ácido láctico (*Lactobacillales*, lactobacilos o bacterias de ácido láctico) forman un orden de bacterias grampositivas que son siempre anaeróbicas o aerotolerantes y se caracterizan porque degradan el azúcar al ácido láctico (fermentación del ácido láctico).

15 El orden de *Lactobacillales* incluye las familias *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. La especie *Bifidobacterium bifidum* fue clasificada anteriormente con los lactobacilos (*Lactobacillus bifidum*), pero según la información disponible hoy en día, no está estrechamente relacionada con este orden filogenéticamente. Sin embargo, todavía se trata como una bacteria de ácido láctico con respecto al metabolismo. Las bacterias de ácido láctico también son muy

20 importantes en la industria alimentaria, donde se utilizan para producir productos lácteos, pero también pueden aparecer como plagas (por ejemplo, en una fábrica de cerveza. Las bacterias de ácido láctico se clasifican como apatógenas.

El uso de bacterias probióticas para agentes de lavado de vajillas también se conoce en la técnica anterior (por ejemplo, WO 2010/130563), por lo que pueden reducirse los efectos negativos del lavado de vajillas en

25 la piel. También tiene un efecto de cuidado de la piel.

El uso de microorganismos en agentes cosméticos para el tratamiento de la piel ya es conocido. De este modo, el documento US 6,790,434, por ejemplo, describe el uso de dichos microorganismos en agentes cosméticos para el tratamiento de la piel en combinación con un extracto vegetal de la matriz extracelular para contrarrestar el daño cutáneo inducido por la radiación UV. Sin embargo, esta fuente no revela el uso de

30 estos microorganismos en detergentes y agentes de limpieza.

Además, se conoce el uso de ciertas especies de *Bacillus* en agentes de limpieza sanitaria. De este modo, el documento WO 97/25865 describe el uso de especies de *Bacillus* en agentes de limpieza sanitaria porque evitan que los patógenos se reproduzcan y son capaces de degradar la suciedad orgánica. Sin embargo, no describe el uso de microorganismos que tienen un efecto beneficioso sobre la piel.

35 Entretanto, la forma de dosificación oral de bacterias probióticas se describió en el documento WO 2005/117921, donde la forma de dosificación contiene al menos un género de microorganismos probióticos, donde la forma de dosificación y / o la bacteria se proporcionan con un recubrimiento que contiene éter de celulosa.

El documento Soleimani et al. (Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis, African Journal of Microbiology Research, vol. 4, no. 20, 18 October 2010) describe la coagregación de diversas cepas de *Lactobacillus* con *Staphylococcus aureus*.

40

La técnica anterior también describe composiciones y uso de bacterias de ácido láctico que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, en particular *Staphylococcus aureus*, en la piel (WO 2008/064893 A1).

5 El objeto de la presente invención es proporcionar un agente o composición para el tratamiento agudo y profiláctico de infecciones de heridas y enfermedades de la piel y / o irritación de la piel sin tener los inconvenientes o deficiencias de la técnica anterior.

Descripción de la invención

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

10 La presente invención se refiere a un microorganismo perteneciente al orden de las bacterias de ácido láctico en el que el microorganismo se selecciona del grupo que comprende los siguientes microorganismos que se han depositado en la Colección Alemana para Microorganismos y Cultivos Celulares DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908, DSMZ 25909, DSM 25910, DSM 25911, DSM 25912, DSM 25913, DSM 25914 y DSMZ 25915 o un derivado, mutante, lisado celular o combinación de los mismos, en el que el microorganismo o
15 lisado celular, derivado, mutante o combinación por lo tanto puede coagregarse con al menos un microorganismo patógeno en el que el microorganismo patógeno se selecciona del grupo que comprende *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*. Fue completamente sorprendente que las nuevas bacterias de ácido láctico que se agregan con cepas bacterianas infecciosas en particular puedan proporcionarse, en particular coagregándose con ellas y reduciendo así la concentración local de los
20 microorganismos, inhibiendo su crecimiento o incluso matándolos o previniendo la formación de una biopelícula. Esto constituye un alejamiento de la técnica anterior con algunas ventajas importantes en comparación con las opciones de tratamiento tradicionales de la técnica anterior debido a que no es necesario un tratamiento con antibióticos, sino que se pueden usar las bacterias de ácido láctico patógenas. Además, la producción de bacterias específicas de ácido láctico constituye una alternativa económica en
25 comparación con la producción de antibióticos y el siguiente costo del tratamiento. El tratamiento con bacterias de ácido láctico que se derivan específicamente contra estos microorganismos y no causa ninguna resistencia adicional de los microorganismos es un enfoque único en la lucha contra los microorganismos patógenos.

30 En el sentido de la presente invención, la coagregación describe una adhesión o unión particular de especies bacterianas genéticamente diferentes entre sí, mientras que la cohesión se refiere en particular a la adhesión o unión de especies bacterianas genéticamente idénticas. Por lo tanto, a este respecto, fue aún más sorprendente que las bacterias de ácido láctico se puedan unir a las bacterias patógenas, lo que da como resultado la coagregación a través de la unión específica en particular.

35 La invención se refiere en particular a uno de dichos microorganismos o a un lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos, en el que existe la capacidad de coagregar al menos un microorganismo patógeno incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico. Con el microorganismo o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos preferida, la capacidad para la coagregación del al menos un microorganismo patógeno preferiblemente existe incluso a un pH de entre aprox. 3 y aprox. 8. En una realización preferida, el microorganismo o el lisado celular, derivado, mutante o combinación de los
40 mismos en particular tiene la capacidad de inhibir la formación de una biopelícula del al menos un microorganismo patógeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos uno de dichos microorganismos o lisados celulares, derivados, mutantes o combinaciones de los mismos. El término composición en el sentido de la presente invención se puede usar como sinónimo del término formulación. La composición preferida también puede contener un vehículo o excipiente seleccionado del grupo que comprende vehículos o excipientes cosméticamente aceptables, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o vehículos o excipientes dermatológicamente aceptables.

La composición puede estar preferiblemente en forma de polvo, barra, pulverizador de aerosol, pulverizador de bomba, crema, dispersión, emulsión, espuma, pomada, pulverizador, aerosol, polvo, barra, paños, loción, suspensión, solución, gel o sobre un sustrato. En particular, es preferible que una composición esté en forma de una crema para la piel, una loción para el lavado de la piel o una pomada para la piel.

En una realización preferida, la composición puede estar presente en forma sólida, líquida, viscosa o como un aerosol. Además, la crema para la piel, la loción para el lavado de la piel o la pomada para la piel preferidas pueden estar presentes en particular en forma sólida, líquida o viscosa o como un aerosol.

La composición preferida también puede comprender preferiblemente probióticos, antisépticos u otras sustancias antibacterianas, por lo que en una composición preferida es una composición farmacéutica, veterinaria, cosmética o alimenticia.

En otra realización preferida, la composición preferiblemente también comprende sustancia adyuvante, agentes tensoactivos, enzimas, compuestos de peróxígeno orgánicos y / o inorgánicos, activadores de peróxígeno, disolventes orgánicos miscibles en agua, agentes de secuestro, electrolitos, reguladores de pH, espesantes, agentes de liberación de suciedad, abrillantadores ópticos, inhibidores de envejecimiento, inhibidores de transferencia de colorantes, reguladores de espuma y / u otros agentes colorantes.

Además, puede ser preferible que la composición comprenda al menos una sustancia seleccionada de los grupos

a. Ingrediente activo que tiene una influencia positiva en la condición de la piel, en particular ingredientes activos para tener una influencia positiva en la piel anciana, en particular en combinación con bioquinonas, en particular ubiquinonas Q10, creatina, creatinina, carnitina, biotina, isoflavona, cardiolipina, ácido lipoico, proteínas anticongelantes, arctinina, lúpulo y extractos de malta de lúpulo,

b. Agentes para promover la reestructuración del tejido conectivo, en particular isoflavonoides,

c. Ingredientes activos para apoyar las funciones de la piel en la piel seca, en particular, vitamina C, biotina, carnitina, creatina, ácido propiónico, extracto de té verde, aceite de eucalipto, urea y sales minerales, en particular NaCl, minerales marinos y osmolitos,

d. Ingredientes activos para aliviar y / o tener una influencia positiva en afecciones de la piel irritada, en particular sericosidas, diversos extractos del regaliz, licochalconas, en particular licocalcona A, silimarina, silfos y / o dexpanthenol.

Es preferible que el microorganismo esté presente en la composición en forma inactiva, viable o no viable. Además, el microorganismo puede estar presente en la composición preferiblemente en forma encapsulada, secada por pulverización y / o liofilizada. También es preferible que el microorganismo esté presente en particular en forma de un lisado celular en la composición. En una realización preferida, el microorganismo está presente en la composición en particular en una cantidad con una cantidad en peso de 0,001% en peso

a 10% en peso, preferiblemente 0,005% en peso a 5% en peso, especialmente preferiblemente 0,01% en peso a 3% en peso.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la composición preferiblemente a partir de la producción de un fármaco, un producto médico o un cosmético para el tratamiento o prevención de enfermedades de la piel, en particular síndrome de la piel escaldada por estafilococos, impétigo contagioso, foliculitis superficial, impetiginización, abscesos, furúnculos, carbunclos, abscesos, flemones, piel seca, picazón en la piel, piel enrojecida, piel irritada, piel extremadamente grasa, acné, pie diabético, úlcera decúbito, neurodermatitis, linfadenitis aguda, quistes pilonidales, fístulas pilonidales, seno pilonidal, pilonidal fístula, quistes pilonidales, infecciones locales de la piel y el tejido subcutáneo, pioderma, dermatitis purulenta, dermatitis séptica, dermatitis supurativa, dermatitis y eczema, eccema atópico, eczema seborreico, 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, enfermedades de la piel papulescamosas, psoriasis, parapsoriasis, enfermedades de los apéndices integumentarios, cicatrices de alopecia, folliculitis decalvans, así como otras enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo, úlceras crurales, lesiones de la piel, restos y costras, heridas después de accidentes o cirugías.

En una realización preferida, la composición se puede usar para producir un agente de limpieza o desinfectante para el tratamiento de la superficie. Además, la composición también se puede usar ventajosamente para producir un producto que se usa en el área de la higiene física, productos médicos y profilaxis.

La composición se usa preferiblemente para producir una loción, una mezcla de agitación, un polvo, un hidrogel, una crema, cresa, ungüento, ungüento graso o pasta para aplicación a la superficie de la piel.

Se ha encontrado ventajosamente que la composición puede usarse preferiblemente para producir un aditivo antimicrobiano que tiene una acción específica para el tratamiento local de infecciones de la piel y para acelerar la cicatrización de heridas crónicas. La composición puede usarse preferiblemente de forma profiláctica o curativa. Además, la composición se puede aplicar preferiblemente por vía tópica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para un tratamiento de higiene que comprende microorganismos o la composición y dispositivos o equipos de higiene física, enjuagues y / o pastas.

En una forma de aplicación preferida, la invención puede usarse como un aditivo antimicrobiano para una solución de rociado o lavado para animales, en particular para perros, caballos, gatos y roedores (conejos, liebres, hámsteres, conejillos de Indias) y animales comerciales tales como pollos, cerdos y ganado para reducir significativamente la carga microbiana en la piel, pieles y plumas.

La presente invención también se refiere a nuevos microorganismos, lisados celulares, mutantes o derivados de los mismos, así como a composiciones que los contienen, en particular para su uso en el tratamiento o prevención en bebés, niños pequeños, niños, personas sanas, ancianos, personas inmunodeprimidas, personas con cambios de piel patológicos (en particular, síndrome de la piel escaldada estafilocócica, impétigo contagioso, foliculitis superficial, impetiginización, abscesos cutáneos, furúnculos (furunculosis), carbunclos (abscesos), flemones, piel seca, picazón en la piel, piel enrojecida, piel irritada, piel extremadamente grasa, acné, pie diabético, úlceras decubitales, neurodermatitis, linfadenitis aguda, quiste pilonidal (incluidas fístulas pilonidales, seno pilonidal, fístula coccígea, quistes coccígeos), otras infecciones locales de la piel y el tejido subcutáneo (p. ej., pioderma, dermatitis purulenta, dermatitis séptica, supuración

dermatitis), también diversas formas de dermatitis y eccema (por ejemplo, eccema atópico, eczema seborreico, dermatitis de pañal, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis seborreica, dermatitis exfoliativa, dermatitis de contacto tóxica, liquen simple crónico, prurigo, prurito y otras formas de dermatitis); también pueden usarse para tratar enfermedades de la piel papuloescamosas (psoriasis, parapsoriasis),
 5 enfermedades de los apéndices integumentarios (p. ej., alopecia con cicatrización incluyendo foliculitis decalvans), más otras enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (por ejemplo, úlceras crurales), personas con daños preexistentes en la piel (p. ej., piel seca), lesiones en la piel (p. ej., costras, heridas, incluso después de accidentes o cirugía) o en animales comerciales y mascotas domésticas.

Los microorganismos preferidos son los microorganismos que pertenecen al orden de las bacterias de ácido
 10 láctico seleccionadas del grupo que comprende los siguientes microorganismos depositados en la Colección Alemana para Microorganismos y Cultivos Celulares bajo los códigos DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908, DMZ 25909, DSM 25910, DSM 25911, DSM 25912, DSM 25913, DSM 25914 y DSMZ 25915 o lisados celulares, derivados o mutantes de los mismos tienen la capacidad de coagregación en particular, preferiblemente unión específica de al menos un microorganismo patógeno que se selecciona del grupo de
 15 *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Resultó completamente sorprendente que el ácido láctico preferido no cause ninguna coagulación o unión de las bacterias o microorganismos cutáneos comensales tales como *Corynebacterium jeikeium*, *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes* o, en particular, *Staphylococcus epidermidis*. Por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis* es un organismo comensal muy poco notable de la flora de la piel. En la interacción de los diversos microorganismos que se encuentran
 20 en o sobre la piel, la especie está presente en la flora saludable de la piel de muchos mamíferos y se encuentra en un equilibrio microbiano con ellos, al menos en pieles sanas. Por lo tanto, una influencia en esta bacteria, por ejemplo, debido a la agregación y, por lo tanto, a una influencia sobre otros microorganismos usados de manera dirigida en la higiene física no sería preferida dentro del alcance de la presente invención.

En otras palabras, las bacterias de ácido láctico preferidas se coagregan específicamente con las bacterias
 25 patógenas *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Nada semejante se deriva de la técnica anterior. La técnica anterior describe únicamente bacterias de ácido láctico que también exhiben una unión a microorganismos comensales de modo que no pueden usarse sin causar efectos adversos. En contraste con aquellos, las bacterias de ácido láctico preferidas no exhiben ninguna unión o coagregación de bacterias de la piel comensales u otros microorganismos patógenos que pueblan la flora de la piel. De acuerdo con otra
 30 realización preferida, las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención no tienen la capacidad de unirse a microorganismos comensales en la piel.

Es conocido por los expertos en la técnica que la piel sana está densamente ocupada con microorganismos
 tales como bacterias y hongos en forma de comensales o mutuos. Estos microorganismos son un componente natural de la superficie de la piel y se resumen con el término flora de la piel. Los
 35 microorganismos incluidos bajo el término flora de la piel son un prerrequisito importante para proteger la piel misma y el cuerpo como un todo de organismos patógenos y son parte del biodoma. A este respecto, es especialmente ventajoso que las bacterias de ácido láctico preferidas no lleven la flora de la piel fuera de equilibrio, sino que simplemente se unan a las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* y / o se coagren junto con ellas.

40 Los microorganismos tienen propiedades adhesivas específicas en particular y forman coagregados con los microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, también

es preferible que las bacterias de ácido láctico se coagren también específicamente con otras especies patógenas de los microorganismos *Staphylococcus* o *Pseudomonas* o que al menos interactúen con ellas.

No menos importante, todos los microorganismos de acuerdo con la invención tienen propiedades para prevenir la formación de una biopelícula. Debido al hecho de que las bacterias de ácido láctico preferidas se coagran con las bacterias patógenas y / o tienen propiedades adhesivas con respecto a ellas, los microorganismos patógenos pueden enmascarse, lo que conduce a la ocultación de muchos factores de patogenicidad y, por lo tanto, a una reducción de la carga bacteriana y / o a la inhibición de la formación de la biopelícula, por ejemplo, enmascarando y / o uniendo las correspondientes adhesinas superficiales de las bacterias patógenas.

Aunque la invención se refiere en particular a un grupo de bacterias de ácido láctico, todavía hay uniformidad de las enseñanzas de acuerdo con la solicitud de patente. Los microorganismos reivindicados tienen una propiedad o efecto común. La suma de las características comunes estructurales o funcionales conduce a la relación funcional entre la coagregación de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, la no unión de microorganismos comensales de la piel y la prevención de la formación de biopelícula y / o la destrucción de biopelículas establecidas por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, estas características comunes no constituyen una suma arbitraria de características sino, por el contrario, de la huella común de los microorganismos reivindicados, por así decirlo, que permite y caracteriza ventajosamente la idoneidad de estos microorganismos para este fin.

Las bacterias de ácido láctico preferidas se seleccionan del grupo que comprende las cepas DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908, DMZ 25909, DSM 25910, DSM 25911, DSM 25912, DSM 25913, DSM 25914 y DSMZ 25915 o derivados, lisados celulares o mutantes de los mismos; estos microorganismos se asocian a través de la relación funcional entre sí para formar una idea uniforme de la invención, de modo que comparten las propiedades y / o efectos, a saber, que se coagrenan específicamente con las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, no se une a cualquier microorganismo comensal de la piel y / o las membranas mucosas y también previene la formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Fue completamente sorprendente que un grupo de bacterias de ácido láctico pudiera identificarse que tuviera propiedades ventajosas idénticas. No se han descrito bacterias, en particular, ninguna bacteria de ácido láctico que combinen todas estas propiedades a la vez que sean apatógenas y no causen ningún daño o influencia en la flora natural de la piel. También se ha encontrado que la aplicación de las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención, ya sea como composición o de otro modo, evita la unión e invasión de las células huésped por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. La causa de esto es hasta ahora desconocida, pero debe identificarse mediante experimentos adicionales.

Otra ventaja sorprendente de las bacterias de ácido láctico de la invención es que también se pueden usar profilácticamente. Otra ventaja sorprendente de los microorganismos preferidos en particular las bacterias de ácido láctico es que también pueden usarse profilácticamente. En otras palabras, las bacterias de ácido láctico y / o una composición que las contiene pueden aplicarse profilácticamente a un área de la piel en riesgo y / o a grupos de personas o animales en riesgo sin producir ningún daño a la piel o la flora cutánea. Se sabe, por ejemplo, que las heridas abiertas pueden desarrollarse en puntos de presión en personas que deben estar postradas en cama durante un período de tiempo prolongado. Los experimentos iniciales han demostrado que un tratamiento profiláctico de estas regiones puede prevenir el desarrollo de heridas abiertas

o al menos proteger contra infecciones adicionales causadas por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*.

En un sentido de la presente invención, la piel en las realizaciones preferidas se entiende en particular que es el órgano externo del cuerpo humano o animal que sirve para delimitar el interior del exterior. Un área de piel en el sentido de la presente invención incluye en las realizaciones preferidas 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 consta de las siguientes capas según la invención: capa córnea (estrato córneo), capa lúcida (estrato lúcido), capa granular (estrato granuloso), capa de células espinosas (estrato espinoso) y / o capa basal (estrato basal). Cada modificación de las células en esta área constituye una modificación celular en un área de la piel en el sentido de la presente invención. La dermis o corion que también puede ser un componente del área de la piel de acuerdo con la invención preferiblemente consiste en fibras de tejido conjuntivo y sirve para proporcionar alimento y anclaje para la epidermis. El sistema de vasos capilares en la zona límite con la epidermis también pertenece a un área 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, un área de piel en el sentido de la invención puede ser cualquier área, es decir, cualquier ubicación en o sobre el tejido subcutáneo (hipodermis) o tejido en el interior del cuerpo o cualquier órgano o componente de órgano. Una barrera de tejido que delimita un órgano de las estructuras circundantes puede ser una piel en el sentido de la presente invención. Además, el concepto inventivo de un área de la piel también puede entenderse que incluye apéndices integumentarios tales como cabello, glándulas sebáceas, músculos arrectores pilorum, uñas, cuernos y glándulas sudoríferas, en particular las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, sino también las glándulas mamarias. Cualquier modificación celular, en particular un crecimiento celular que se desvíe de lo normal, se puede tratar con los agentes de acuerdo con la invención, preferiblemente sin limitarse a las áreas externas de la piel. Sin embargo, las áreas de la piel en el sentido de la presente invención también pueden incluir la piel inguinal tal como la de los dedos o las plantas de los pies o la piel y los apéndices de la piel asociados con ella.

La tolerabilidad de las bacterias de ácido láctico de la piel es un requisito previo para el tratamiento exitoso de infecciones de la piel y las infecciones bacterianas en heridas u otras enfermedades o síntomas en los que se producen microorganismos de los grupos estafilocócicos o pseudomónicos.

La composición preferida puede estar contenida en particular en un jabón, una loción, un polvo, un syndet, una espuma, una barra, una emulsión, una pulverización, una crema, un gel, un champú, un jabón líquido o un desodorante. También es preferible que la composición se use en particular como un probiótico que se puede añadir como detergente, agente de enjuague, agente de limpieza o desinfectante (por ejemplo, jabones, polvos, pastas, soluciones, emulsiones, lociones), limpieza y / o toallas desinfectantes, champús, enjuagues o aplicaciones para la piel, cabello y / o cuero cabelludo, cremas, ungüentos, lociones para la limpieza de la piel y / o lociones para el cuidado de la piel, soluciones (por ejemplo, como gotas, aerosoles, enjuagues) para usar en los ojos, orejas, boca, nariz o garganta y / o pueden incorporarse en vendajes o vendajes para suprimir la formación de microorganismos patógenos, unirlos, eliminarlos como un agregado y / o inhibirlos o matarlos y, por lo tanto, reducir sus números.

Resultó completamente sorprendente que las ventajas de la composición según la invención pudieran mejorarse una vez más incorporándola 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 en sustancias para vehículos, por ejemplo, tales como emulsiones u otros productos para aplicación dérmica, por ejemplo, formas líquidas que pueden ser preferiblemente anhidras o hidratadas, donde las formas acuosas se pueden dividir de acuerdo con la invención en sistemas monofásicos y sistemas multifásicos. Además, se pueden usar formas semisólidas que son anhidras o hidratadas, donde nuevamente es posible dividirlos en sistemas monofásicos y sistemas multifásicos en los que también son posibles formas semisólidas que contienen agua. Preferiblemente también se pueden usar formas sólidas que son lipófilas o hidrófilas. Los ejemplos de tales formas incluyen, por ejemplo, ungüentos a base de grasa, espumas, polvos, barras, cremas de gel, geles de hidrodispersión, emulsiones acuosas, lociones, ungüentos, aerosoles y cremas además de las formas ya mencionadas anteriormente. Los expertos en la materia son conscientes de que tales sustancias vehiculares pueden diferenciarse primero en aquellas que son ricas / valiosas y aquellas que son frescas y livianas basadas en la sensación sobre la piel y en segundo lugar pueden diferenciarse en aquellas con baja viscosidad y otras con una alta viscosidad en términos de la viscosidad, mientras que los hidrogeles o hidrocremas y / o emulsiones O / W o emulsiones W / O tienen una alta viscosidad. Cuando se usan formas líquidas de aplicación, se pueden subdividir, como se explicó anteriormente, en sistemas hidratados y anhidros. De los sistemas anhidros, los sistemas apolares, los sistemas polares sin emulsionantes y los sistemas polares con emulsionantes son especialmente preferidos. De los sistemas hidratados, se prefieren sistemas monofásicos tales como soluciones y microemulsiones; de los sistemas multifásicos, se prefieren emulsiones W / O de múltiples emulsiones o emulsiones O / W. 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 tales vehículos. Con las emulsiones O / W, las sustancias farmacéuticas líderes preferidas incluyen emulsionantes O / W, emulsionantes W / O, ingredientes hidrófilos líquidos e ingredientes lipófilos líquidos. Con las emulsiones W / O, las sustancias farmacéuticas líderes preferidas incluyen emulsionantes W / O, emulsionantes O / W, ingredientes lipófilos líquidos y semisólidos, agentes formadores de gel, ingredientes hidrófilos líquidos y / o sales.

De las sustancias vehiculares preferidas semisólidas, los sistemas anhidros, así como los sistemas hidratados son preferidos para diversas aplicaciones. Los sistemas anhidros pueden consistir en sistemas apolares o sistemas polares sin emulsionantes tales como geles de lipogeles, oleogeles o polietilenglicol y / o pueden consistir en sistemas apolares con emulsionantes en bases de absorción O / W o bases de absorción W / O. Los sistemas hidratados pueden consistir preferiblemente en sistemas monofásicos tales como hidrogeles o geles en microemulsión o sistemas multifásicos tales como cremas O / W, cremas W / O o sistemas anfífilos. Las preparaciones semisólidas preferidas son preparaciones esparcibles para aplicar a la piel en el rango de temperatura entre temperatura ambiente y temperatura de la piel o para aplicación a las membranas mucosas, donde tienen un efecto tópico, donde transportan los ingredientes activos o tienen un efecto suavizante o protector en la piel. Las preparaciones preferidas incluyen ungüentos en sentido estricto, cremas, geles y / o pastas. Además de las pomadas, cremas, geles y pastas, los oleogeles también se pueden usar como sistemas monofásicos semisólidos transparentes. Los expertos en la materia conocen diversos compuestos anhidros para formular sistemas semisólidos a partir de la patente US 6,187,323 o Aiache et al. 2001, que incluye, por ejemplo, el compuesto de una oleogel y un hidrogel, que se puede denominar bigel de acuerdo con la presente invención. Además, pueden usarse geles de hidrodispersión o diversos lípidos para proporcionar sustancias vehiculares de acuerdo con la invención. Cuando se usan lípidos, se pueden usar compuestos de organosilicio y compuestos de organocarbono para suministrar fases lipídicas en sistemas dispersos, donde los compuestos de organocarbono pueden suministrarse con la ayuda de lípidos no hidrolizables o lípidos hidrolizables (glicerol) o ésteres de cera, por ejemplo. Las ventajas de

tales sistemas incluyen una flexibilidad mejorada de la piel y un aumento en la 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 sabrán qué lípidos deben usar para aumentar o disminuir la penetración dentro de un parámetro de tiempo, por ejemplo.

- 5 Las sustancias vehiculares 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
10 formadoras de sal y emulsionantes W / O, O / W emulsionantes, ingredientes lipófilos líquidos, semisólidos y sólidos, así como sustancias y adyuvantes 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 otras preparaciones farmacéuticas para productos dérmicos. De acuerdo con la presente solicitud de patente, por ejemplo, todos los compuestos farmacéuticos descritos en la cita de Daniels y Knie en JDDG; 2007, 5: 367-383. Los expertos en la materia saben que diferentes preparaciones farmacéuticas tienen diferentes efectos en la piel y aplicarán composición galénica a la piel en diferentes cantidades. El contenido de JDDG; 2007, 5: 367-383 se incorpora aquí en el contenido de 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,
15 suspensiones lipófilas o hidrófilas, preparaciones líquidas especiales, ungüentos hidrófobos o hidrófilos, ungüentos emulsionantes con agua, cremas lipófilas, hidrófilas o anfifílicas, hidrogeles, hidrófobos o pastas y / o polvos hidrófilos.

Los experimentos han demostrado que las bacterias de ácido láctico preferidas, en particular las células de lactobacillus, forman coagregados en contacto con *Staphylococcus aureus* y / o células de *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a la formación de coagregados, se previene que *Staphylococcus aureus* y / o
25 *Pseudomonas aeruginosa* penetren en las heridas de la piel en particular o se posen sobre la piel y formen colonias, y establezcan, adhieran y formen biopelículas. Las células de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en particular su superficie celular están enmascaradas por las bacterias de ácido láctico en células de lactobacilos particulares, de modo que las células de *Staphylococcus aureus* y / o
30 *Pseudomonas aeruginosa* ya no son capaces de unirse a las células epiteliales de la piel. Dado que se impide que *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* se unan a las células epiteliales de la piel, no se producen reacciones inflamatorias y / o se reduce o previene la irritación de la piel. Las células de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, en particular su superficie celular, están unidas por las bacterias de ácido láctico en células de lactobacilos en particular. De este modo, células coagregados que
35 consisten en células de lactobacilos y / o *Staphylococcus aureus* y / o células de *Pseudomonas aeruginosa* que pueden eliminarse (lavarse) más fácilmente y de manera más eficiente y efectiva de la piel, heridas y superficies en general (pelo, plumas, acero, plástico y superficies metálicas) se forman en comparación con las células de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* presentes individualmente o en pequeños agregados.

- 40 En el sentido de la presente invención, los microorganismos probióticos comprenden células que tienen efectos ventajosos sobre los cuerpos humanos y / o animales. Una composición preferida se usa como una composición probiótica y contiene bacterias de ácido láctico, que tienen un efecto ventajoso sobre el cuerpo

humano o animal. Los efectos ventajosos pueden consistir en particular en mejorar la flora de la piel. En particular, los microorganismos no deseados tales como *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en la flora cutánea pueden inhibirse mediante interacciones directas con los microorganismos probióticos y los microorganismos no deseados y en particular mediante interacciones indirectas basadas en la inhibición del metabolismo del microorganismo no deseado debido a los productos de expresión del microorganismo probiótico. Los experimentos han demostrado que el microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* no muestran ningún crecimiento, es decir, no hay más reproducción de la masa celular después de la coagregación por las bacterias de ácido láctico preferidas y en su lugar las células están enmascaradas, unidas en coagregados y / o muertas.

Los mutantes o derivados de las bacterias de ácido láctico descritos aquí que se producen en particular por tratamiento biológico, químico o físico de las bacterias de ácido láctico y exhiben sorprendentemente las propiedades ventajosas incluso después del tratamiento.

Además, fue sorprendente que las bacterias de ácido láctico, derivados, mutantes o combinaciones de los mismos todavía tuvieran las propiedades ventajosas incluso después de la muerte física, química y / o biológica. Por ejemplo, las cepas preferidas, concretamente DSM 25906, DSM 25907, DSM 2598, DSMZ 25909, DSM 25910, DSM 25911, DSM 25912, DSM 25913, DSM 25914 y DSMZ 25915, producen coagregación de los patógenos, evitan la formación de una biopelícula y tampoco presentan ninguna unión de microorganismos comensales, incluso después de un tratamiento térmico a 70 ° C durante 20 minutos o un tratamiento con ultrasonido. Por lo tanto, las bacterias de ácido láctico, derivados, mutantes o combinaciones de los mismos también pueden estar presentes ventajosamente en forma muerta en una realización preferida de la composición. La estabilidad y usabilidad de la composición se puede prolongar sustancialmente de esta manera. Además, la composición también puede usarse en otras áreas de aplicación, que no permiten el uso de microorganismos viables. Resultó completamente sorprendente que las bacterias de ácido láctico en la composición pudieran inactivarse, ser viables o no viables y, sin embargo, ser aún capaces de unión y / o coagregación específica con los microorganismos patógenos. La composición puede usarse ventajosamente como un alimento, aditivo alimentario o agente farmacéutico, producto médico, cosmético, aditivo de agente de limpieza y como alimento o bebida para animales.

Una composición preferida es una que contiene las bacterias de ácido láctico según la invención o lisados celulares, mutantes o derivados de los mismos que tienen la capacidad de coagregar al menos un microorganismo patógeno seleccionado del grupo de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, donde la composición se usa para la higiene física, terapia física y / o prevención.

Los microorganismos preferidos son representantes del género u orden de bacterias de ácido láctico, es decir, bacterias gram-positivas que producen ácido láctico por fermentación de glucosa. Los microorganismos de acuerdo con la invención se caracterizan, por un lado, por el hecho de que tienen la capacidad de coagregación específica de al menos un microorganismo patógeno que se selecciona del grupo de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Esta unión conduce a la formación de agregados de los microorganismos de acuerdo con la invención y a los microorganismos patógenos específicamente unidos. Debido a la formación de coagregados, el último, es decir, los microorganismos patógenos, pueden eliminarse fácilmente de forma mecánica y de forma dirigida, por ejemplo, mediante enjuague, lo que era imposible con las medidas conocidas en el pasado. Los coagregados celulares que consisten en células de *Lactobacillus* y / o *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* pueden eliminarse (lavarse) de la piel, heridas y superficies en general de manera más fácil y eficiente y más eficazmente (pelo, plumas, acero,

plástico y superficies metálicas) en comparación con las células de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* que están presentes individualmente o en pequeños agregados.

El término "unión específica" o "coagregación" en el sentido de la invención, así como en los campos de la microbiología y la higiene en general, en particular la microbiología humana y la higiene física, se entiende que se refiere al reconocimiento mutuo y la adhesión de células pertenecientes genéticamente a diferentes tipos de células. En su superficie celular, las bacterias aquí expresan receptores y estructuras para adhesinas a otros tipos de células que se utilizan para la adhesión entre las células. Esta adherencia juega un papel excelente en la colonización con microorganismos patógenos, así como con microorganismos comensales, de modo que una intervención en la adherencia podría tener consecuencias de gran alcance. Debido al hecho de que los microorganismos de acuerdo con la invención tienen la capacidad de unión específica, en particular, coagregación con al menos un microorganismo del grupo de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, agregados de los microorganismos 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 en otro sitio o reservorio de colonización, de modo que se reduce 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 previene y / o reduce enmascarando las estructuras superficiales de los microorganismos patógenos. Si las células se unen entre sí y forman agregados, este proceso se conoce como agregación, en particular. Si solo una especie celular está involucrada en esta formación de un agregado, ese proceso se denomina autoagregación. Si al menos dos especies celulares diferentes están involucradas 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 en particular con referencia a la propiedad de los microorganismos de acuerdo con la invención para unir al menos una bacteria del grupo de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*.

De acuerdo con una realización preferida de los microorganismos de acuerdo con la invención, también se caracterizan porque la capacidad de unión específica a al menos un microorganismo patógeno existe incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico, por ejemplo, un tratamiento térmico como mínimo a 70 ° C. En otras palabras, las bacterias de ácido láctico preferidas pueden estar presentes preferiblemente en una composición preferida porque la capacidad para una interacción específica o unión a bacterias patógenas, en particular *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, no se ve afectada y, por lo tanto, la unión o interacción pueden ser establecidas.

Las células de bacterias de ácido láctico inactivas o no viables pueden ser especialmente ventajosas debido a que no puede emanar actividad metabólica de estas células de bacterias de ácido láctico.

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

En una realización preferida de una composición, bacterias de ácido láctico que están inactivadas, viables o muertas o son partes y fragmentos de las mismas, por ejemplo, productos de escisión enzimática o mecánica (por ejemplo, prensa French, etc.) o productos metabólicos de estas bacterias, en la medida todavía tienen la capacidad de coagregación y / o prevenir la formación de una biopelícula. También es preferible que las bacterias de ácido láctico se usen en forma encapsulada, secada por pulverización y / o liofilizada, es decir, en forma encapsulada, secada por pulverización y / o liofilizada en una composición preferida. Además, puede ser ventajoso que las bacterias de ácido láctico se usen en forma de células digeridas.

Además, es preferible que la capacidad de las bacterias de ácido láctico según la invención para la unión específica a los microorganismos patógenos persista incluso a un pH entre aprox. 3 y 8. Esto significa que las bacterias de ácido láctico pueden estar en un medio que tiene un pH de 3 a 8 y todavía tienen su capacidad de unirse a *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Los expertos en la materia son conscientes del hecho de que la piel tiene un pH ligeramente ácido. A este respecto, es especialmente ventajoso que las bacterias de ácido láctico preferidas también exhiban su capacidad para la coagregación de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en un amplio intervalo de pH. El pH de la piel puede variar, por ejemplo, debido a productos cosméticos o en diferentes regiones del cuerpo. Las bacterias de ácido láctico preferidas pueden ventajosamente estar en un amplio intervalo de pH y / o tener las propiedades preferidas en el intervalo preferido. Las bacterias de ácido láctico preferidas pueden, por lo tanto, usarse de manera ventajosa universalmente en diferentes áreas del cuerpo.

Además, la invención descrita aquí es una composición, en particular un probiótico innovador, que también tiene propiedades de coagregación después de un tratamiento con proteasa (por ejemplo, tripsina, tripsina tratada con TPCK, lisozima, proteinasa K, pronasa, trombina, PNGasa, pepsina, quimotripsina, papaína).

Las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención exhiben sorprendentemente propiedades de coagregación en particular con *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en un amplio intervalo de temperatura de aprox. 25 ° C - 42 ° C.

Por lo tanto, será evidente para los expertos en la materia que aquí, así como en todas las indicaciones de rango dadas en la presente invención, caracterizadas por términos tales como "cerca de" o "aproximadamente", que el rango numérico preciso no necesita indicarse con la expresión "cerca de" o "aprox. / aproximadamente" pero en cambio incluso desviaciones menores hacia arriba o hacia abajo con respecto al número indicado están todavía dentro del alcance de la presente invención.

La unión de las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención a los microorganismos patógenos enumerados, preferiblemente da como resultado la inhibición del crecimiento de estos microorganismos patógenos.

Fue sorprendente que, debido a la unión de los microorganismos patógenos y las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención, se forma un agregado que está presente como un sedimento, en particular después de 5 a 100 minutos a temperatura ambiente sin agitación.

Las bacterias aeróbicas, principalmente patógenas en heridas son *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en particular. La fase de inflamación de la curación de heridas normalmente sirve para combatir microorganismos potencialmente patógenos y para la regeneración celular. Sin embargo, las heridas refractarias a menudo ocurren en pacientes que ya están inmunológicamente suprimidos y tienen una respuesta inflamatoria reducida. Esta respuesta inmune disminuida ya no puede combatir eficazmente las

bacterias de la herida primaria y, por lo tanto, las bacterias penetran en la herida y forman colonias que se organizan como biopelículas. Estas biopelículas no solo son resistentes al sistema de defensa del huésped, sino que también incluyen células planctónicas o microcolonias.

En una realización preferida, las bacterias, mutantes, derivados o combinaciones de los ácidos lácticos preferidos preferiblemente tienen al menos una de las siguientes características: a) estabilidad térmica o estabilidad después del tratamiento biológico, químico y / o físico o b) capacidad para inhibir la formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Resultó completamente sorprendente que las bacterias de ácido láctico según la invención mantuvieran su capacidad de unirse específicamente a *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* incluso después del tratamiento biológico, químico y / o físico.

Otra propiedad de las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención es la capacidad de inhibir la formación de una biopelícula por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bacterias forman biopelículas extremadamente resistentes que son resistentes a los ultrasonidos, a los detergentes, a las proteasas o al calor y también son resistentes a las sustancias antimicrobianas. Los microorganismos de acuerdo con la invención en particular tienen la propiedad de inhibir la formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a la inhibición de la formación de la biopelícula, estas bacterias patógenas ya no pueden colonizar superficies biológicas o superficies inorgánicas y, en consecuencia, ya no pueden causar enfermedades.

En el sentido de la presente invención, debe entenderse que la frase "inhibición de la formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*" se refiere en particular a la propiedad de las bacterias de ácido láctico según la invención para interactuar con *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*, es decir, para unirse a ellos o de otra manera influir en ellos de tal manera que ya no puedan formar una biopelícula.

Según una realización preferida, los microorganismos de acuerdo con la invención pueden tener al menos una de las propiedades indicadas, es decir, resistencia al tratamiento biológico, químico y / o físico, resistencia al calor, capacidad de unión específica, coagregación a *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. Las combinaciones preferidas de propiedades incluyen, por ejemplo, resistencia al tratamiento biológico, químico y / o físico, resistencia al calor y capacidad para unirse a *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* o resistencia al tratamiento biológico, químico y / o físico, resistencia al calor e inhibición de la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*.

En el presente caso, como ya se ha indicado, la expresión "microorganismo que pertenece al género u orden de bacterias de ácido láctico" también incluye derivados o mutantes, que aún tienen las características y / o características o propiedades de los microorganismos según la invención descrita aquí. Las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención son preferiblemente bacterias de las especies *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus ingluviei*.

Por consiguiente, "un mutante o un derivado" de los microorganismos anteriormente mencionados que pertenecen al género de bacterias de ácido láctico, en particular un mutante o un derivado de *Lactobacilli* sp., y que tiene las mismas características que las reivindicadas para las bacterias de ácido láctico según la invención en el presente caso y las mismas cepas en particular, se reivindica. Esto se referiría, al menos, a la capacidad de coagregación específica de al menos un microorganismo patógeno seleccionado del grupo de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*. 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 *Staphylococcus epidermidis* u otros microorganismos comensales de la piel; (iii) capacidad para unión específica a al menos un microorganismo patógeno, formador de biopelícula; (iv) capacidad para la inhibición de la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*; (v) existencia de la unión específica a pH 3-8. Dichos derivados preferidos se pueden producir mediante ingeniería genética, por ejemplo. El término "producido mediante ingeniería genética" en el sentido de la presente invención incluye en particular todos los métodos con los cuales 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 para que las modificaciones genéticas puedan ser inducidas por tecnologías de ADN recombinante y los genes puedan ser modificados.

Los microorganismos de acuerdo con la invención están preferiblemente en forma aislada o purificada, donde el término "aislado" significa en particular que las bacterias de ácido láctico se derivan de su medio de cultivo, que incluye, por ejemplo, su medio natural. El término "purificado" no está restringido a la pureza absoluta.

Es preferible que, además de los microorganismos de acuerdo con la invención en una forma viable, las formas inactivas de los microorganismos de acuerdo con la invención también estén incluidas dentro del alcance de la presente invención. El término "forma inactiva" aquí denota células inactivadas o muertas que en particular ya no son capaces de formar colonias en las placas de cultivo. Los expertos en la materia están familiarizados con métodos adecuados para la inactivación (por ejemplo, métodos de inactivación biológica, química o física). En el presente caso, sin embargo, los microorganismos también pueden usarse en forma liofilizada. Se puede inducir que las células liofilizadas vuelvan a crecer después de un cultivo adecuado en un medio líquido o sólido.

Los términos "formas inactivadas" o "forma inactiva" y "derivados" o "mutantes" también incluyen en el presente caso sobrenadantes de células y / o fermentaciones, lisados, fracciones o extractos de los microorganismos de acuerdo con la invención, donde estos lisados, fracciones o los extractos tienen preferiblemente las propiedades de las bacterias de 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 del microorganismo de acuerdo con la invención y comprende, por ejemplo, macromoléculas tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos, etc., así como detritos celulares. El lisado preferentemente también incluye la pared celular o los constituyentes de la pared celular. Los métodos para producir lisados son suficientemente conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, el uso de una "prensa French" 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 puede ser inducida por ionóforos, detergentes tales como SDS, ácidos o bases; los métodos físicos también pueden implementarse mediante el uso de altas presiones como la prensa French, osmolaridades, temperaturas o alternancia entre calor y frío. Además, los métodos químicos, físicos y enzimáticos pueden, por supuesto, combinarse.

Las "formas inactivadas" o las "formas inactivas" y los "derivados" o "mutantes" de los microorganismos de acuerdo con la invención preferiblemente tienen las mismas propiedades que las cepas mencionadas anteriormente. La "forma inactivada" o la "forma inactiva" y los "derivados" preferiblemente ya no tienen ninguna actividad metabólica.

Los expertos en la materia pueden suministrar el contenido para términos tales como "derivados" o "mutantes" y pueden interpretar estos términos en el sentido de la presente invención sin ningún gran esfuerzo técnico. Para proporcionar mutantes, lisados celulares o derivados de los microorganismos preferidos, los expertos en la materia pueden confiar en la bibliografía estándar disponible para ellos,
 5 divulgando técnicas que pueden usarse para producir mutantes, lisados celulares o derivados.

Los mutantes y / o las variantes o 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 debido a agentes químicos tales como con metano sulfonato de etilo (EMS). Los cambios en las propiedades
 10 positivas se pueden seleccionar, ya sea de manera dirigida o mediante la evaluación de una pluralidad de mutantes formados. Los mutantes genéticamente alterados contienen células de los microorganismos de acuerdo con la invención e implican ácidos nucleicos recombinantes en sus cromosomas y / o plásmidos bacterianos. Las modificaciones debidas a mutaciones puntuales también pueden tener efectos sobre la expresión / transcripción / traducción, así como mutaciones espontáneas sin manipulación genética directa.

Incluso después de la liofilización (secado por congelación), las células pueden ser viables en algunas circunstancias. Estas células pueden inactivarse a través de procesos especiales de almacenamiento a diferentes temperaturas. Las células inactivadas pueden tener membranas celulares intactas o rotas, por ejemplo, pero no pueden tener ninguna actividad metabólica. Los métodos para obtener células inactivadas pueden incluir tratarlas con perlas de vidrio, por ejemplo, cuando el efecto de las fuerzas de cizallamiento
 15 entre las células y las perlas de vidrio provoca la ruptura de las células. Métodos físicos adicionales tales como prensa French, homogeneización a alta presión, molino de bolas o procesos de congelación-descongelación y autoclave también conducen a la inactivación y a fragmentos de los microorganismos según la invención, así como a la irradiación UV, procesos de autólisis o procesos especiales de almacenamiento a diferentes temperaturas.

El término "células de *Lactobacillus*" en el sentido de la presente invención también puede usarse para referirse a bacterias de ácido láctico o lactobacilos y también comprende microorganismos que requieren carbohidratos en particular glucosa y lactosa para la fermentación de ácido láctico y generalmente utilizan la vía de la biosíntesis de Embden-Meyerhof. Las células de *Lactobacillus* se clasifican taxonómicamente en la familia *Lactobacteriaceae*. Son gram-positivos, no formadores de esporas y generalmente inmóviles. Las
 20 células de *Lactobacillus* viven anaeróbicamente, pero son aerotolerantes, aunque no contienen ninguna hemina (citocromo, catalasa) (Schleifer et al., System. Appl. Microb. 18, 461-467 (1995) o Ludwiq et al., System. Appl. Microb. 15, 487-501 (1992). Las células de *Lactobacillus* y / o la especie pueden determinarse sobre la base del patrón de utilización de hidratos de carbono, en particular, por medio de la prueba API (Biomerieux Co.) y a través de la secuenciación de 16sARN. De acuerdo con la presente invención esto
 25 incluye en particular especies que son adecuadas para la fermentación de ácido láctico homofermentativo o la fermentación de ácido láctico heterofermentativo. Las deposiciones de DSMZ mencionadas anteriormente se realizaron de acuerdo con el Tratado de Budapest con respecto al reconocimiento internacional de la deposición de microorganismos para la deposición de patentes.

Como se explicó anteriormente, la presente invención también se refiere a composiciones que contienen
 30 preferiblemente microorganismos viables o un mutantes de lisado celular o derivados del mismo, así como preferiblemente al menos un vehículo o excipiente que se selecciona de al menos uno de los siguientes: un

vehículo cosméticamente aceptable o excipiente, 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 cualquier composición que tenga al menos un microorganismo de acuerdo con la invención o un derivado, lisado celular o mutante del mismo, así como opcionalmente otros ingredientes tales como vehículos o excipientes u opcionalmente otros ingredientes activos y sales. Estéticamente, se entiende que los excipientes, vehículos o aditivos farmacéuticamente o dermatológicamente aceptables incluyen cualquier sustancia que se use convencionalmente en las áreas cosmética, farmacéutica o dental con el fin de administrar, usar o activar, cosmética o farmacéuticamente, un ingrediente activo o composición, es decir, en el presente caso, al menos un microorganismo o lisado celular o derivado o mutante del mismo.

Es preferible que la composición contenga no solo uno de los microorganismos según la invención o un lisado celular, mutante o derivado del mismo, sino también que contenga una mezcla de microorganismos de acuerdo con la invención o una mezcla de los derivados del lisado celular o mutantes o una mezcla de los microorganismos de acuerdo con la invención y lisados celulares, derivados o mutantes de los mismos.

La composición puede estar preferiblemente en forma sólida o líquida o viscosa o en aerosol y puede usarse, por ejemplo, en forma de polvos, tabletas, soluciones, gránulos, suspensiones, emulsiones, cápsulas, pastas, geles, aerosoles, etc., es decir, en cualquier forma adecuada para administración. También es preferible si la composición comprende probióticos adicionales, antisépticos u otras sustancias antibacterianas y, preferiblemente pero opcionalmente, sacáridos y conservantes, aromatizantes, edulcorantes, vitaminas, minerales, etc. El documento EP 2 133 414 A1 enumera una serie de ingredientes que pueden ser utilizados para composiciones preferidas; se hace referencia explícitamente a esta publicación. Además, pueden estar presentes en una composición preferida rellenos, agentes de control de flujo, modificadores de la reología, suavizantes, estabilizadores, iniciadores o monómeros reticulados reactivamente, por ejemplo, metacrilatos.

La composición de acuerdo con la invención se usa en particular para uso en higiene física, fisioterapia y profilaxis y contiene al menos un microorganismo de acuerdo con la invención o un derivado, mutante o un lisado celular del mismo.

La composición y / o microorganismo también pueden usarse como desinfectante, por ejemplo, como desinfectante de superficie, tal como especialmente como solución limpiadora para lentes de contacto.

La dosificación y la administración para usar la composición de acuerdo con la invención dependen del uso respectivo y del paciente respectivo, en particular la edad, peso, salud general, etc., y están dentro de las capacidades y evaluación de los expertos en la materia que usará la composición.

La composición de acuerdo con la invención puede ser un producto cosmético, un medicamento o un producto farmacéutico. La composición contiene preferiblemente las bacterias de ácido láctico en una cantidad en peso de 0,001% en peso a 10% en peso, preferiblemente de 0,005% en peso a 5% en peso, especialmente preferiblemente de 0,01% en peso a 3% en peso. Fue completamente sorprendente que el uso de una cantidad de 0,001% en peso a 10% en peso en particular daría como resultado que la descomposición fuera utilizable durante un período de tiempo más largo, es decir, permaneciendo estable. Si las bacterias de ácido láctico se usan en una cantidad de 0,005% en peso a 5% en peso, esto sorprendentemente da como resultado un efecto positivo sobre las propiedades reológicas de la composición y hace que la composición tenga una viscosidad menor y se distribuya mejor en la piel o es más fácil de

introducir en la cavidad oral. El uso de las bacterias de ácido láctico en una cantidad en peso de 0,01% en peso a 3% en peso ha resultado sorprendentemente en que los componentes de la composición se unen mejor entre sí y la posibilidad de suministrar una composición homogénea en un tiempo de trabajo reducido, que a su vez conduce a una reducción en los costos de producción. Sin embargo, es evidente que otras
5 cantidades que difieren de las aquí especificadas también se pueden usar para aplicaciones específicas.

Como se explicó anteriormente, de acuerdo con una realización preferida, la composición y / o el microorganismo se pueden usar en el campo de la higiene física para agregar, es decir, para unir los microorganismos patógenos mencionados anteriormente. Estos coagregados se pueden eliminar fácilmente enjuagándolos, por ejemplo, en el caso de una suspensión en particular, de modo que se consigue
10 ventajosamente una reducción en el número de microorganismos patógenos. Por lo tanto, las bacterias de ácido láctico y / o una composición que las contiene pueden usarse de diversas maneras para este fin. Por ejemplo, pueden usarse en geles de ducha, lociones para ducha, lociones corporales, jabones líquidos, jabones, aceites para ducha o soluciones de desinfección, sistemas de filtro en equipos respiratorios, aerosoles nasales, soluciones de limpieza para lentes de contacto, toallas o toallas de limpieza. Por lo tanto,
15 la presente invención también se refiere a todos los productos que se usan en el campo de la higiene física y productos médicos y de prevención y que contienen las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención. Las realizaciones descritas anteriormente también se aplican en consecuencia para el campo de tratamiento, terapia y prevención en mamíferos. Los microorganismos y / o una composición que los contiene pueden, por lo tanto, usarse de varias formas.

Es preferible en particular si la composición según la invención y / o el microorganismo de acuerdo con la invención se usa para producir un fármaco farmacéutico, para el tratamiento o prevención de la diabetes mellitus, enfermedades de la piel, lesiones cutáneas, síndrome de choque tóxico, síndrome de piel escamada por estafilococos así como las infecciones tóxicas causadas por enterotoxinas, furúnculos, carbunclos, sinusitis, osteomielitis como sepsis y posteriormente una meningitis y / o miocarditis y pericarditis causada por
20 *Staphylococcus aureus* y neumonía con fibrosis quística, infecciones del tracto urinario, enterocolitis, meningitis, otitis externa, infecciones en quemaduras por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los agentes se ponen a disposición a través de los microorganismos de acuerdo con la invención y las composiciones que los contienen con las que estas enfermedades se pueden tratar y / o prevenir ventajosamente. Los microorganismos y / o las composiciones que los contienen pueden usarse en medicina
30 humana y veterinaria en particular, como se indicó anteriormente, en perros, monos, gatos, caballos y roedores (liebres, conejos, hámsteres, conejillos de Indias) y animales comerciales tales como pollos, cerdos y vacas, ovejas, cabras y otros animales domésticos y comerciales.

La composición según la invención y / o los microorganismos, o lisados celulares, derivados o mutantes de los mismos, se pueden usar en particular como un aditivo alimentario, como un producto de higiene, como un
35 producto de higiene que contiene el microorganismo o como una preparación farmacéutica. Tales productos de higiene también pueden estar en forma de kits, por ejemplo, que también pueden contener los microorganismos de acuerdo con la invención o composiciones que los contienen además de dispositivos o equipos de higiene física, enjuagues, pastas, etc.

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

ES 2 674 328 T3

La enseñanza de acuerdo con la presente solicitud de patente se caracteriza por las siguientes características:

- Salida de lo que es habitual en el estado de la técnica,
- Nueva declaración de objeto,
- 5 - Existencia de una necesidad urgente de una solución al problema que no se ha resuelto durante mucho tiempo, pero que se soluciona mediante la invención,
- Esfuerzos previos fallidos por parte del mundo técnico,
- La simplicidad de la solución sugiere un paso inventivo, en particular porque reemplaza enseñanzas más complejas,
- 10 - El desarrollo de la técnica científica fue en una dirección diferente,
- Un logro que conduce a un mayor desarrollo,
- Conceptos defectuosos en el mundo técnico sobre la solución del problema correspondiente (perjuicio al progreso técnico, por ejemplo: mejora, aumento del rendimiento, reducción de costes, ahorro de tiempo, material, pasos de trabajo, costes o materias primas difíciles de adquirir, mayor fiabilidad, eliminación de defectos, aumento de calidad, ausencia de mantenimiento, mayor eficacia,
- 15 mayor rendimiento, aumento de posibilidades técnicas, suministro de otro medio, apertura de un segundo camino, apertura de un nuevo territorio, primera solución a un problema, medios de reserva, alternativas, posibilidad de economización, automatización o miniaturización o enriquecimiento de los recursos de drogas,
- 20 - Una casualidad afortunada porque se ha seleccionado una posibilidad específica entre una variedad de posibilidades, los resultados no podrían haber sido pronosticados, así que esta es una casualidad afortunada que puede ser patentada,
- Errores en la literatura técnica y / o presentación muy contradictoria del tema de la invención,
- Nuevo campo de tecnología,
- 25 - Invención combinada, es decir, se combinan múltiples elementos conocidos para producir una combinación que tiene un efecto sorprendente,
- Emisión de licencias,
- Elogios para el mundo técnico, y
- Éxito económico.
- 30 En particular, las realizaciones ventajosas de la invención tienen al menos una o más de las ventajas mencionadas anteriormente.

Descripción de las figuras

La invención se explicará a continuación como un ejemplo sobre la base de figuras y ejemplos, pero sin limitarse a ellos.

Figura 1: La unión específica y / o agregación de una realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908) a una biopelícula formada por *Staphylococcus aureus* (ensayo de unión) después de lavar las células no unidas tres veces y en comparación con cepas de *Lactobacillus* adicionales que no son de acuerdo con la invención y que son capaces de unirse a *Staphylococcus aureus* (especie 1 de *Lactobacillus* y especie 2 de *Lactobacillus* y especie 3 de *Lactobacillus*); cuantificación específica de la unión y / o agregación de cepas de *Lactobacillus* marcadas con CFDA según la invención a la biopelícula en placas de microtitulación de 96 pocillos basándose en la medición de fluorescencia (485/535 nm).

Figura 2: La unión específica y / o agregación de la realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911) a la biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa* (ensayo de unión) después de lavar las células no unidas tres veces y en comparación con las cepas de *Lactobacillus* adicionales que no son de acuerdo con la invención y que no son capaces de unirse a *Pseudomonas aeruginosa* (especie 1 de *Lactobacillus* y especie 2 de *Lactobacillus* y especie 3 de *Lactobacillus*); cuantificación específica de la unión y / o agregación de cepas de *Lactobacillus* marcadas con CFDA de acuerdo con la invención a la biopelícula en placas de microtitulación de 96 pocillos basadas en mediciones de fluorescencia (485/535 nm).

Figura 3: control macroscópico de la unión específica de una realización ejemplar de un microorganismo según la invención (DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911) a células de *Pseudomonas aeruginosa* después de la coagregación y las cepas de *Lactobacillus* según la invención y la cepa objetivo por separado en un sistema de documentación de fotos.

Figura 4: El control microscópico de la unión específica de una realización ejemplar de un microorganismo según la invención (DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911) a células de *Pseudomonas aeruginosa* después de la coagregación y las cepas de *Lactobacillus* según la invención y la cepa objetivo por separado. Micrografía (contraste de fase, aumento 1000x).

Figura 5: control macroscópico de la unión específica de una realización ejemplar de un microorganismo según la invención (DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908) a células de *Staphylococcus aureus* después de la coagregación y las cepas de *Lactobacillus* según la invención y la cepa objetivo por separado en un sistema de documentación de fotos.

Figura 6: El control microscópico de la unión específica de una realización ejemplar de un microorganismo según la invención (DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908) a células de *Staphylococcus aureus* después de la coagregación y las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y la cepa objetivo por separado. Micrografía (contraste de fase, aumento 1000x).

Figura 7: La agregación específica de una realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911) de *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 22644), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Corynebacterium jeikeium* (DSM 7171) y *Micrococcus luteus* (DSM 20030) en ensayo de coagregación; cuantificación específica de la agregación mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm del microorganismo diana por separado, así como la de las cepas de *Lactobacillus* por separado y la del lote de coagregación.

Figura 8: La agregación específica de una realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908) de *Staphylococcus aureus* (DSM 18587), *Staphylococcus*

epidermidis (DSM 20044), *Corynebacterium jeikeium* (DSM 7171) y *Micrococcus luteus* (DSM 20030) en ensayo de coagregación; cuantificación específica de la agregación mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm del microorganismo diana por separado, así como la de las cepas de *Lactobacillus* por separado y la del lote de coagregación.

- 5 Figura 9: la agregación específica de una realización ejemplar de los microorganismos de acuerdo con la invención (DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908) con y sin tratamiento con tripsina de *Staphylococcus aureus* (DSM 18587) en el ensayo de coagregación; cuantificación específica de la agregación mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm del microorganismo diana por separado y la de las cepas de *Lactobacillus* por separado y la del lote de coagregación.
- 10 Figura 10: la agregación específica de una realización ejemplar de los microorganismos de acuerdo con la invención (DSM 25906 y DSM 25907) de *Staphylococcus aureus* (DSM 18587) y *Staphylococcus aureus* (DSM 20232) en el ensayo de coagregación; cuantificación específica de la agregación mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm del microorganismo diana por separado y la de las cepas de *Lactobacillus* por separado y la del lote de coagregación.
- 15 Figura 11: Inhibición de la formación de biopelícula de una realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25914 y DSM 25915) de la biopelícula formada por *Staphylococcus aureus* después de 6 horas de incubación con suspensión de *Lactobacillus* lavada en PBS, suspensión de *Lactobacillus* inactivada por calor y sobrenadantes de la suspensión de *Lactobacillus* inactivada por calor; cuantificación de la biopelícula mediante tinción con cristal violeta en una placa de microtitulación de 96 pocillos sobre la medición de la densidad óptica a 590 nm.
- 20

Figura 12: Inhibición de la formación de biopelícula de una realización ejemplar de los microorganismos según la invención (DSM 25912 y DSM 25913) de la biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa* después de 6 horas de incubación con suspensión de *Lactobacillus* lavada en PBS, suspensión de *Lactobacillus* inactivada por calor y sobrenadantes de la suspensión de *Lactobacillus* inactivada por calor; cuantificación de la biopelícula mediante tinción con cristal violeta en una placa de microtitulación de 96 pocillos sobre la medición de la densidad óptica a 590 nm.

25

Descripción detallada de ejemplos de realización

Ejemplo 1

Para la identificación y selección de microorganismos de acuerdo con la invención, se probaron diversas cepas de un banco de cepas de *Lactobacillus* mediante un proceso de cribado en cuatro etapas en el que se cribaron primero con respecto a la capacidad de unirse a los microorganismos patógenos de la piel (en lo sucesivo también como el "microorganismo diana" (ensayo de unión) y luego las cepas identificadas en el primer paso se probaron en un ensayo de coagregación en una placa de microtitulación, donde la coagregación con el organismo diana respectivo se midió cualitativamente utilizando un estereomicroscopio binocular. Además, se investigaron la intensidad de la coagregación y la estabilidad de la unión al microorganismo diana, así como la capacidad para la prevención de una biopelícula, lo que en última instancia condujo a los ejemplos de microorganismos identificados de acuerdo con la invención (*Lactobacillus*).

30

35

Ensayo de unión

Para poder cuantificar la actividad de unión de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, se estableció un ensayo de unión, que permite 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 organismo diana se correlaciona con la actividad de coagregación y / o la capacidad de coagregación.

5 Esto fue probado experimentalmente a este respecto, la Figura 2 muestra un ejemplo de la coagregación de las cepas de *Lactobacillus* DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911 y *Pseudomonas aeruginosa* DSM 22644, y la Figura 1 muestra cepas de *Lactobacillus* DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908 y *Staphylococcus aureus* DSM 22644.

10 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 organismos 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.

15 Para realizar estos experimentos, los microorganismos diana *Pseudomonas aeruginosa* (DSMZ 22644) y *Staphylococcus aureus* (DSMZ 18587) se cultivaron de acuerdo con métodos estándar usando TSB (caldo tripticasa de soja) para *Pseudomonas aeruginosa* y TSY (medio de extracto de levadura tripticasa de soja) para *Staphylococcus aureus*.

Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron anaeróbicamente en medio MRS a 37 ° C (de Man et al., 1960).

20 Para el tratamiento de los microorganismos diana, las células se recogieron después de alcanzar la fase de crecimiento en estado estacionario incipiente, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se colocaron en PBS. Luego, se colocaron 100 µl de la suspensión en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos.

25 Durante una incubación aeróbica de 6 horas, las cepas diana formaron una biopelícula. Después de la incubación, las células no unidas se eliminaron lavando tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4).

Para el tratamiento de las cepas de *Lactobacillus*, se recogieron y se lavaron tres veces con PBS después de cultivar durante 24 horas, se colocaron en PBS y se marcaron con fluorescencia añadiendo solución de CFDA (Invitrogen).

30 Para realizar el ensayo de unión, se añadieron 100 µL de la suspensión de *Lactobacillus* a las cepas diana unidas en una biopelícula en cada pocillo. Los lotes de control sin la adición de la suspensión de *Lactobacillus* se llevaron en paralelo. Después de incubar durante 1 hora a 30 ° C en una incubadora, las células no unidas se separaron y se lavaron tres veces con PBS. Después de cada etapa de lavado, se midió la fluorescencia en el fotómetro de placa de fluorescencia (Em 485 nm / Ex 535 nm).

35 El aumento de la fluorescencia (Em 485 nm / Ex 535 nm) en el lote que contiene cepas de *Lactobacillus* en comparación con el control 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
40 unión de las células de *Lactobacillus* probadas.

Los experimentos han demostrado que después de la eliminación de las células no unidas, las cepas de *Lactobacillus* probadas condujeron a un aumento de la fluorescencia por un factor de 3 a 17 después de tres lavados debido a la unión de las células *Lactobacillus* marcadas, que están unidas a la biopelícula, para el organismo diana / cepa diana *Pseudomonas aeruginosa* y / o *Staphylococcus aureus* en el ensayo de unión.

5 La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de unión para *Lactobacillus* DSM 25909, DSM 25910 y DSM 25911 con *Pseudomonas aeruginosa* y la Figura 1 para DSM 25906, DSM 25907 y DSM 25908 con *Staphylococcus aureus* como ejemplo para los microorganismos de acuerdo con la invención. Además, para propósitos de comparación, las Figuras 1 y 2 también muestran los datos sobre cepas de *Lactobacillus* no de acuerdo con la presente invención (especies de *Lactobacillus* 1 y 2) que no son capaces de unión específica
10 para el organismo diana.

Ejemplo 2

Ensayo de coagregación

La siguiente verificación en un volumen de 0,8 ml y / o en una placa de 24 pocillos se usa para ilustrar la actividad de coagregación de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

15 En este método, el comportamiento de coagregación de los *Lactobacilli* y de la cepa diana se considera por separado, y finalmente, se considera la coagregación de *Lactobacillus* y la cepa diana reunidas en una mezcla. Este análisis se realiza macroscópicamente mediante el uso de fotografías de la placa de 24 pocillos y microscópicamente.

Para realizar estos ensayos, se cultivó el microorganismo diana *Pseudomonas aeruginosa* (DSMZ 22644) y
20 *Staphylococcus aureus* (DSMZ 18587) según protocolos estándar usando TSB (caldo tripticasa de soja) para *Pseudomonas aeruginosa* y TSY (medio de extracto de levadura tripticasa de soja).

Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron anaeróbicamente a 37 ° C en medio MRS (de Man et al., 1960).

Para el tratamiento de los microorganismos diana, las células se recogieron después de 16 horas, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se ajustaron a OD₆₀₀ = 4 en
25 consecuencia.

Para el tratamiento de las cepas de *Lactobacillus*, se recogieron después de 16 horas, se lavaron dos veces con PBS y luego se colocaron en un volumen de PBS y se ajustaron a una OD₆₀₀ = 8 en consecuencia.

Para realizar el ensayo de coagregación, se colocaron 400 µl de suspensión del microorganismo diana marcado en cada pocillo junto con 400 µl de suspensión de *Lactobacillus* en una placa de 24 pocillos. Se
30 prepararon lotes de control con 400 µl del organismo objetivo respectivo más 400 µl de PBS (control 1) o 400 µl de la suspensión de *Lactobacillus* respectiva más 400 µl de PBS (control 2) en paralelo. Después de incubar durante 30 minutos a 25 ° C en un agitador de escritorio, los lotes se observaron macroscópicamente por medio de un sistema de documentación fotográfica, así como microscópicamente transfiriendo 3 µl del centro de cada pocillo a un portaobjetos de microscopio.

35 Para la cuantificación de la coagregación, los coagregados resultantes se separaron por centrifugación (10 segundos, 300 g). A continuación, se transfirieron 100 µl del sobrenadante a una placa de fondo plano de 96 pocillos y se midió la densidad óptica a 600 nm en el fotómetro de placa.

La siguiente fórmula se utilizó para un cálculo porcentual de la actividad de coagregación:

$$\% \text{ Agregación} = \frac{(\text{OD}_{\text{cepa objetivo por separado}} + \text{OD}_{\text{Lactobacillus por separado}}) - \text{OD}_{\text{coagregación}}}{\text{OD}_{\text{cepa objetivo por separado}} + \text{OD}_{\text{Lactobacillus por separado}}} \times 100$$

La densidad óptica del microorganismo diana, así como la de las cepas de *Lactobacillus* y la del lote de coagregación se usaron para calcular la actividad de coagregación porcentual.

Los experimentos han demostrado que las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas dan lugar a grumos (agregados) en la mezcla para el microorganismo diana / cepa diana *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa* en la coagregación, estos agregados son visibles macroscópicamente debido a áreas oscuras en el pocillo. No se forman agregados en los pocillos que contienen las cepas diana y / o las cepas de *Lactobacillus* según la invención por separado. Esto es visible debido a la ausencia de áreas oscuras formadas en el pocillo. La Figura 5 muestra los resultados macroscópicos en el lote de coagregación para las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas para el microorganismo / cepa diana *Staphylococcus aureus* y la Figura 3 muestra los resultados para la cepa diana *Pseudomonas aeruginosa*. En la observación microscópica, las afinidades no ambiguas para las respectivas cepas diana que conducen a diferentes tamaños de agregado en la consideración microscópica de la coagregación se encuentran en la observación microscópica de todas las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención. La Figura 4 muestra los resultados microscópicos en el lote de coagregación para las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas para los microorganismos diana / cepa diana *Staphylococcus aureus* en la Figura 6 y / o para *Pseudomonas aeruginosa*.

Ejemplo 3

Además, se llevaron a cabo experimentos para mostrar la influencia de las proteasas en las cepas de *Lactobacillus* según la invención y sus propiedades de agregación en los microorganismos diana.

Las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y las cepas diana se procesaron, por lo tanto, como se describe en el Ejemplo 2.

Las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención se trataron con proteasas, mostradas aquí en el ejemplo de proteasa, tripsina. Después de procesar las cepas de *Lactobacillus*, se trataron con tripsina a 37 ° C durante 60 minutos (12,4 unidades / mg, Sigma). Luego, las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y las propiedades de agregación se cuantificaron como se describe en el Ejemplo 2.

Estos experimentos han demostrado que después del tratamiento con proteasa, las cepas de *Lactobacillus* según la invención tienen una agregación del 50-76% en el ensayo de coagregación del microorganismo diana para la cepa objetivo del microorganismo / cepa diana *Pseudomonas aeruginosa* y / o *Staphylococcus aureus*. Como ejemplo, los microorganismos de acuerdo con la invención, la Figura 9 muestra los resultados del ensayo de coagregación para *Lactobacillus* DSM 25906, DSM 25907 y DSM 25908 con y sin tratamiento con tripsina con *Staphylococcus aureus*.

Ejemplo 4

Se llevaron a cabo experimentos con microorganismos comensales adicionales de la piel para mostrar la especificidad de las propiedades de agregación de las cepas de *Lactobacillus* según la invención frente a los microorganismos diana. Se seleccionaron *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Corynebacterium*

jeikeium (DSM 7171) y *Micrococcus luteus* (DSM 20030). Las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención y los microorganismos diana se cultivaron y trataron como se describe en el Ejemplo 2.

Para realizar estas pruebas, todos los microorganismos diana a analizar, es decir, *Pseudomonas aeruginosa* (DSMZ 22644), *Staphylococcus aureus* (DSMZ 18587), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044),
5 *Corynebacterium jeikeium* (DSM 7171) y *Micrococcus luteus* (DSM 20030) fueron cultivados según protocolos estándar, usando TSB (caldo de tripticasa de soja) para *Pseudomonas aeruginosa* y TSY (medio de extracto de levadura de tripticasa de soja) para *Staphylococcus aureus* (DSMZ 18587), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Corynebacterium jeikeium* (DSM 7171) y *Micrococcus luteus* (DSM 20030).

Las cepas diana y el ensayo de agregación C se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.

10 Los experimentos han demostrado que no hay agregación con las cepas diana adicionales investigadas por las cepas de *Lactobacillus* según la invención, sino que estas fueron propiedades muy específicas. La Figura 8 muestra los resultados del ensayo de coagregación para *Lactobacillus* DSM 25906, DSM 25907 y DSM 25908 con *Staphylococcus aureus* para los microorganismos según la invención y la Figura 7 muestra los resultados para *Lactobacillus* DSM 25909, DSM 25910 y DSM 25911 con *Pseudomonas aeruginosa*.

15 Ejemplo 5

Además, se realizaron ensayos con otros microorganismos del mismo género y especies de microorganismos de la piel para determinar la especificidad de las propiedades de unión y / o agregación de las cepas de *Lactobacillus* según la invención contra los microorganismos diana del mismo género y especie. Para este propósito, se seleccionó *Staphylococcus aureus* (DSMZ 20232) para manifestar sus propiedades de
20 agregación con las pruebas con los microorganismos diana.

Por lo tanto, las cepas de *Lactobacillus* según la invención y los microorganismos diana se cultivaron y trataron como se describe en el Ejemplo 2.

Para llevar a cabo estas pruebas, todos los microorganismos diana a investigar, concretamente en este ejemplo, *Staphylococcus aureus* (DSMZ 18587) y *Staphylococcus aureus* (DSMZ 20232) se cultivaron de
25 acuerdo con protocolos estándar usando TSY (medio de extracto de levadura tripticasa de soja).

Las cepas diana se procesaron y el ensayo de coagregación se realizó como se describe en el Ejemplo 2.

Estos experimentos han demostrado que otros microorganismos del mismo género y especie también son capaces de unirse y / o agregarse debido a las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención. La Figura 10 muestra los resultados del ensayo de coagregación para *Lactobacillus* DSM 25906 y DSM 25907 con
30 *Staphylococcus aureus* DSMZ 18587 y DSMZ 20232 que se usan como ejemplos de los microorganismos de acuerdo con la invención.

Ejemplo 6

Inhibición de biopelícula

Para la identificación y selección de microorganismos de acuerdo con la invención, se ensayaron diversas
35 cepas de un banco de datos de *Lactobacillus* en un método de exploración en una escala de placas de microtitulación. El objetivo del cribado fue determinar las propiedades de los microorganismos patógenos de la piel (en lo sucesivo también denominados "microorganismos diana") para prevenir la formación de una biopelícula. La intensidad de las propiedades de prevención de la biopelícula se relacionó cuantitativamente

ES 2 674 328 T3

con la formación no influenciada de la biopelícula de los microorganismos diana y se analizaron, conduciendo finalmente a los microorganismos identificados de acuerdo con la invención (*Lactobacillus*).

Para investigar su efecto sobre la formación de biopelícula por los microorganismos diana patógenos *Staphylococcus aureus* (DSM 18587) o *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 22644), las cepas de *Lactobacillus* y / o sus fracciones se añadieron directamente al microorganismo diana al comienzo de la formación de la biopelícula y se incubaron durante hasta 6 horas. Después de eliminar las células que no estaban unidas y lavar las biopelículas dos veces con PBS, las biopelículas se cuantificaron midiendo la densidad óptica después de la tinción con cristal violeta de todo el lote.

Para realizar estas pruebas, las cepas diana se cultivaron de acuerdo con un protocolo estándar como se describió anteriormente y las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron anaeróticamente en medio MRS.

Para el tratamiento de las cepas de *Lactobacillus*, se lavaron dos veces con PBS después del cultivo y luego se colocaron en PBS.

Algunas de las cepas de *Lactobacillus* se inactivaron por calor pasteurizando durante 30 minutos a 70 ° C después del lavado con PBS.

Además, algunas de las cepas de *Lactobacillus* inactivadas por calor se usaron para obtener los sobrenadantes después del lavado con PBS. Esto se hizo por centrifugación de la suspensión y luego usando los sobrenadantes.

Para el tratamiento de las cepas diana, se cultivaron y cosecharon hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial medio y luego se ajustaron a $OD_{600nm} (mL^{-1}) = 3,5$, se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en PBS.

Para realizar el ensayo de formación de biopelícula, las cepas de *Lactobacillus* se añadieron directamente al microorganismo diana al comienzo de la formación de la biopelícula y se incubaron anaeróticamente a 37 ° C durante 6 horas. Los lotes de control sin la adición de la suspensión de *Lactobacillus* se llevaron en paralelo. Después de eliminar las células planctónicas y lavar las biopelículas, las biopelículas se cuantificaron mediante tinción con cristal violeta (0,1%, Merck) del microorganismo objetivo unido con y sin *Lactobacillus* y / o fracciones de *Lactobacillus*. Para hacerlo, las células unidas de los lotes respectivos se disolvieron por medio de ácido acético después de la tinción con violeta cristal y luego se colocaron en suspensión y se midieron a una densidad óptica de 590 nm. La reducción en la densidad óptica a 590 nm en comparación con el control del microorganismo diana sin lactobacilos se correlacionó con la intensidad del obstáculo de la biopelícula. Esta reducción se representa como el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas en relación con el microorganismo diana sin lactobacilos. Como ejemplos de los microorganismos según la invención, la Figura 11 muestra el resultado de la inhibición de biopelícula de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus* DSM 25914 y DSM 25915 y por *Pseudomonas aeruginosa* por DSM 25912 y DSM 25913, como se muestra en la Figura 12. Los experimentos han demostrado que esto conduce a un 56-93% de inhibición de la formación de biopelícula por las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo con la invención, con y sin la inactivación de las actividades metabólicas de las cepas de *Lactobacillus* y / o sus fracciones de *Staphylococcus aureus* y / o *Pseudomonas aeruginosa*.

Estos experimentos y ejemplos han mostrado solo una selección de microorganismos preferidos en los que las propiedades ventajosas de la unión se han confirmado experimentalmente para todos los microorganismos preferidos. Los expertos en la materia aprenderán de los ejemplos y las figuras cómo

proceder para reproducir la invención y, por ejemplo, reproducir las propiedades ventajosas compartidas de los microorganismos preferidos.

Referencias

5 Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Hill CM, Harding KG and Thomas DW (2004) Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol* 42, 3549-57.

10 Fux, CA, Costerton, JW, Stewart, PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 34-40.

15 James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen* 2003; 11(3): 172-6.

James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16, 37-44.

20 Kirketerp-Moller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser, C, Tolker-Nielsen, T, Hoiby N, Givskov M, and Bjarnsholt T (2008) Distribution, Organization, and Ecology of Bacteria in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 46, 2717-2722.

Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4): 411-20.

25 Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 2004; 12(4): 419-29.

Sheldon AT (2005) Antiseptic "resistance": real or perceived threat? *Clin. Infect. Dis.* 40, 1650-1656.

30 Julia Bidder, MRSA, http://www.focus.de/gesundheit/arzt-klinik/klinik/tid-9019/mrsa-krank-durch-die-klinik_aid_262385.html, 26.02.2010

35 Bingham R. J.; Rudino-Pinera E.; Meenan N. A. G.; Schwarz-Linek U.; Turkenburg J. P.; Hook M.; Garman E. F.; Potts J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 12254-12258. O'Neill E.; Pozzi C.; Houston P.; Humphreys H.; Robinson D. A.; Loughman A.; Foster T. J.; O'Gara J. P. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 3835-3850.

de Man et al., (1960) "A medium for the Cultivation of Lactobacilli", *J. Appl. Bact.* 23(130-135)

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria de ácido láctico o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos, en la que el microorganismo, lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos puede coagregarse con al menos un microorganismo patógeno, seleccionándose el microorganismo patógeno del grupo que comprende
- 5 *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* y en donde la bacteria de ácido láctico se selecciona del grupo que comprende los siguientes microorganismos depositados en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares con el número DSM 25906, DSM 25907, DSM 25908, DSM 25909, DSM 25910, DSM 25911, DSM 25912 , DSM 25913, DSM 25914 y DSMZ 25915.
2. La bacteria del ácido láctico o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos según la
- 10 reivindicación 1 o 2, donde la capacidad de coagregación del al menos un microorganismo patógeno existe incluso después de un tratamiento biológico, químico o físico y / o
- donde la capacidad de coagregación del al menos un microorganismo patógeno existe a un pH entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8.
3. La bacteria de ácido láctico o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos según una o
- 15 más de las reivindicaciones anteriores, donde la bacteria de ácido láctico o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos tiene la capacidad de inhibir la formación de una biopelícula del al menos un microorganismo patógeno.
4. Una composición que comprende al menos una bacteria de ácido láctico o lisado celular, derivado, mutante o combinación de los mismos según una o más de las reivindicaciones anteriores donde la composición
- 20 comprende un vehículo o excipiente seleccionado del grupo que comprende vehículos o excipientes cosméticamente aceptables, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o vehículos o excipientes dermatológicamente aceptables y / o en el que la composición está en forma de polvo, barra, spray aerosol, pulverizador de bomba, crema, dispersión, emulsión, espuma, pomada, pulverizador, aerosol, polvo, barra, paños, loción, suspensión, solución, gel o en un sustrato y / o
- 25 está presente y / o como
- donde la composición está presente en forma sólida, líquida, viscosa o como un aerosol y/o una crema para la piel, una loción de lavado para la piel, o ungüento para la piel
- y / o
- donde la composición comprende probióticos, antisépticos u otras sustancias activas antibacterianas.
- 30 5. La composición según la reivindicación anterior, donde dicha composición es una composición farmacéutica, veterinaria, cosmética o alimenticia.
6. La composición según la reivindicación 4 o 5, que además comprende al menos una sustancia, seleccionada de los grupos
- a. ingredientes activos que tienen una influencia positiva en la condición de la piel, en particular ingredientes
- 35 activos que tienen una influencia positiva en la piel de los ancianos, en particular en combinación con bioquinonas, en particular ubiquinona Q10, creatina, creatinina, carnitina, biotina, isoflavona, cardiolipina, ácido lipoico, proteínas anticongelantes, arctiina, lúpulo y extractos de lúpulo-cebada,

b. agentes de promoción para la reestructuración del tejido conectivo, en particular isoflavonoides,

c. ingredientes activos para apoyar las funciones de la piel en el caso de la piel seca, en particular vitamina C, biotina, carnitina, creatina, ácido propiónico, extractos de té verde, aceite de eucalipto, urea y sales minerales, en particular NaCl, minerales marinos y osmolitos,

5 d. ingredientes activos para aliviar y / o tener una influencia positiva en afecciones de la piel irritada, en particular sericosidas, diversos extractos de regaliz, licochalconas, en particular licocalcona A, silimarina, silfos y / o dexpanthenol.

7. La composición según una o más de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la bacteria de ácido láctico está presente en forma inactiva, viable o no viable en la composición y / o

10 en la que la bacteria del ácido láctico está presente en forma encapsulada, secada por pulverización y / o liofilizada y / o

en la que la bacteria del ácido láctico está en forma de un lisado celular y / o

en la que la bacteria de ácido láctico está presente en una cantidad con una porción en masa de 0.001 por ciento en peso a 10 por ciento en peso, preferiblemente 0,005 por ciento en peso a 5 por ciento en peso, en particular preferiblemente 0,01 por ciento en peso a 3 por ciento en peso.

8. Uso de la bacteria de ácido láctico según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según una o más de las reivindicaciones 4 a 7 para producir un fármaco, producto médico o cosmético para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la piel, en particular, síndrome de la piel escaldada estafilocócica, impétigo contagioso, abscesos, piel, foliculitis cutánea superficial, impetiginización, furúnculos de la piel, carbunclos, abscesos, flemones, piel seca, piel enrojecida, piel irritada, piel extremadamente grasa, acné, pie diabético, úlceras decúbito, neurodermatitis, linfadenitis aguda, quistes pilonidales, fístula pilonidal, seno pilonidal, fístula coccígea, quiste coccígeo, infecciones locales de la piel y tejido subcutáneo, pioderma, dermatitis purulenta, dermatitis séptica, dermatitis supurativa, dermatitis y eccema, eccema atópico, eczema seborreico, dermatitis exfoliativa, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis seborreica, dermatitis exfoliativa, dermatitis de contacto tóxica, liquen simple crónico, prurigo, prurito y otras formas de dermatitis, enfermedades papuloescamosas de la piel, psoriasis, parapsoriasis, enfermedades de los apéndices integumentarios, alopecia con cicatrización, folliculitis decalvans, así como otras enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo, úlcera crural, lesiones cutáneas, abrasiones, heridas, incluidas aquellas después de accidentes o cirugía.

9. Uso de la bacteria de ácido láctico según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según una o más de las reivindicaciones 4 a 7 para producir un agente de limpieza o desinfectante para el tratamiento de superficies.

10. El uso de la bacteria de ácido láctico según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según una o más de las reivindicaciones 4 a 7 para producir un producto que se usa en el campo de la higiene corporal, productos médicos y profilaxis

11. El uso de la bacteria de ácido láctico según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según una o más de las reivindicaciones 4 a 7 para producir un aditivo antimicrobiano de acción específica para el tratamiento local de enfermedades de la piel y para acelerar la curación de heridas crónicas.

12. El uso según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la composición se usa profilácticamente o de forma curativa.
13. El uso según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición se aplica tópicamente.
- 5 14. Kit para tratamiento de higiene que comprende bacterias de ácido láctico según las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según las reivindicaciones 4 a 7, y dispositivos o equipos de higiene física, enjuagues y / o pastas.

Figura 1

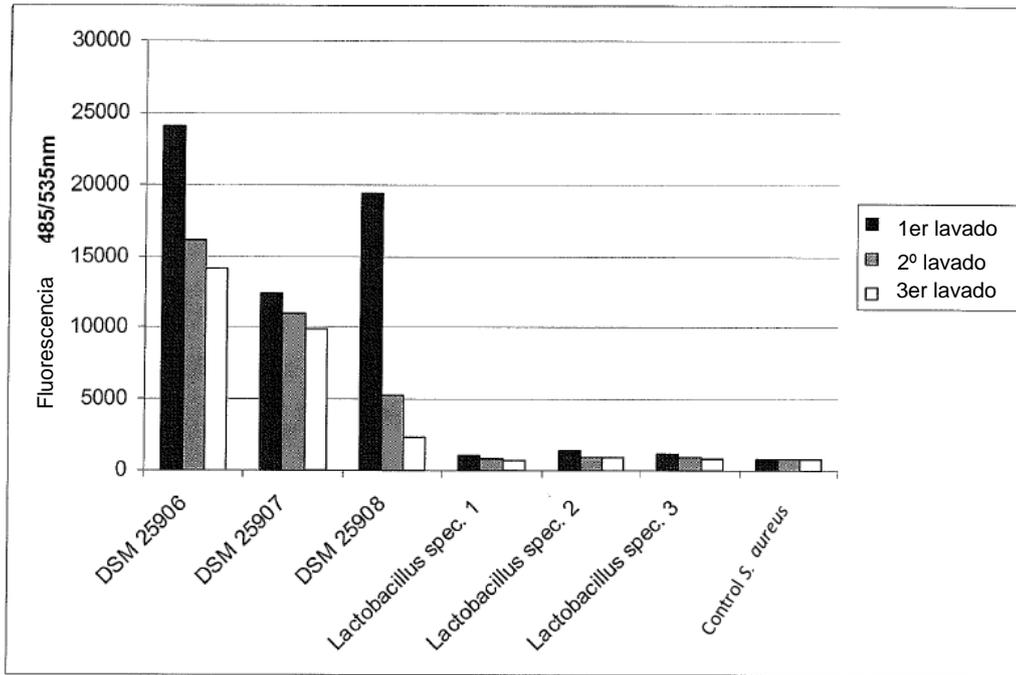


Figura 2

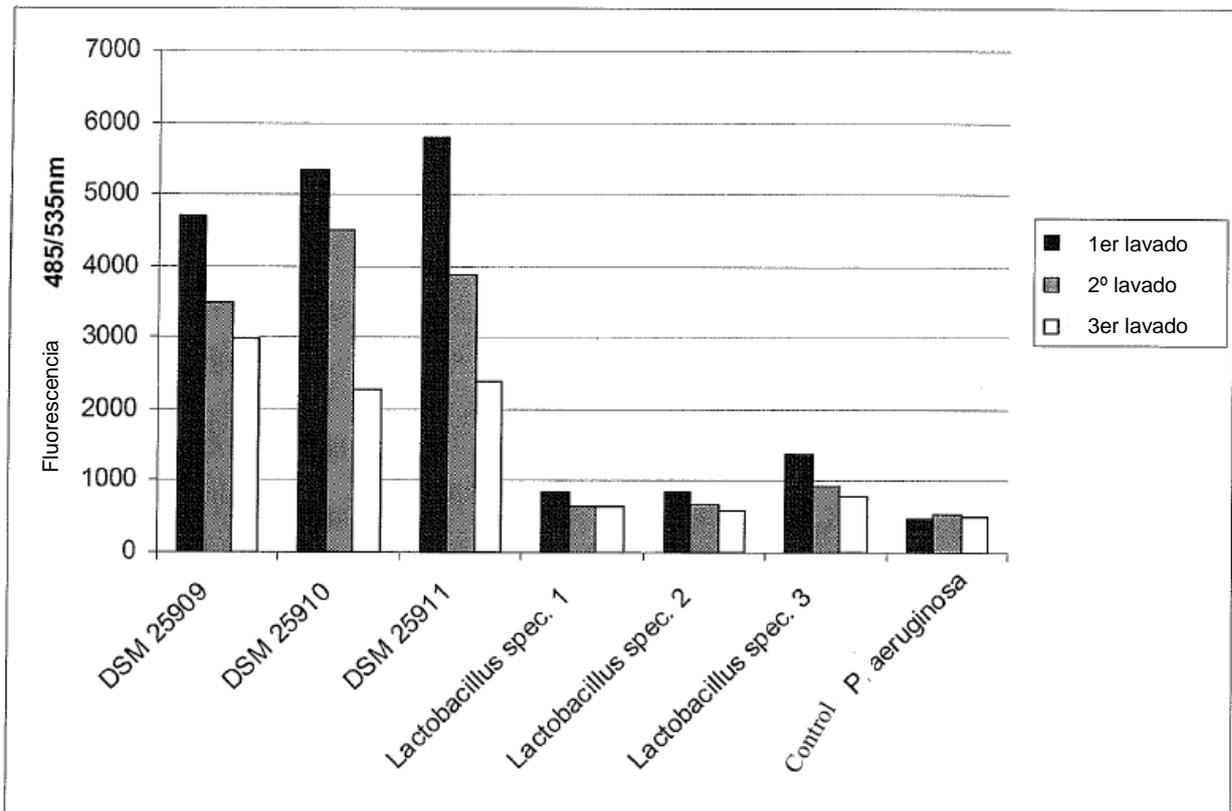


Figura 3

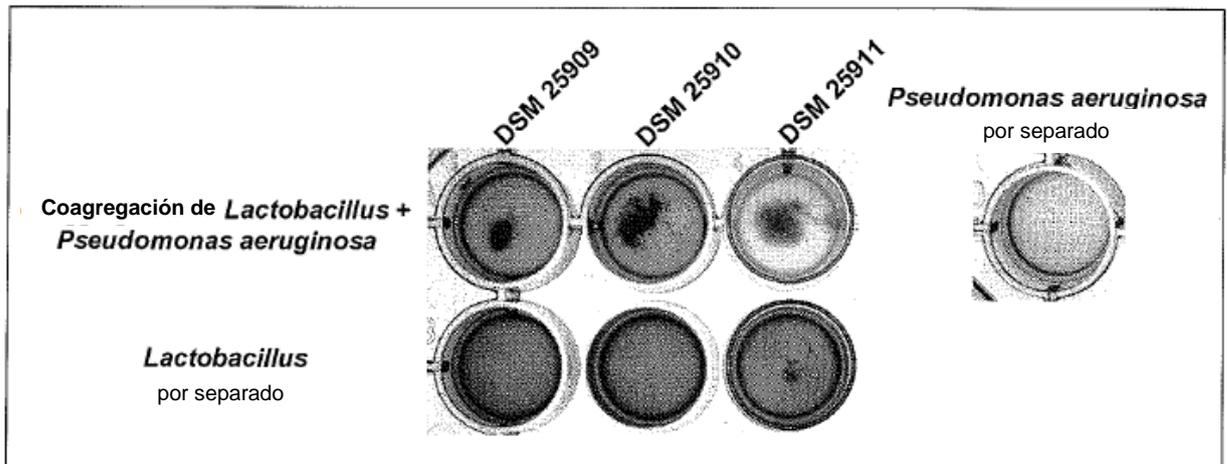


Figura 4

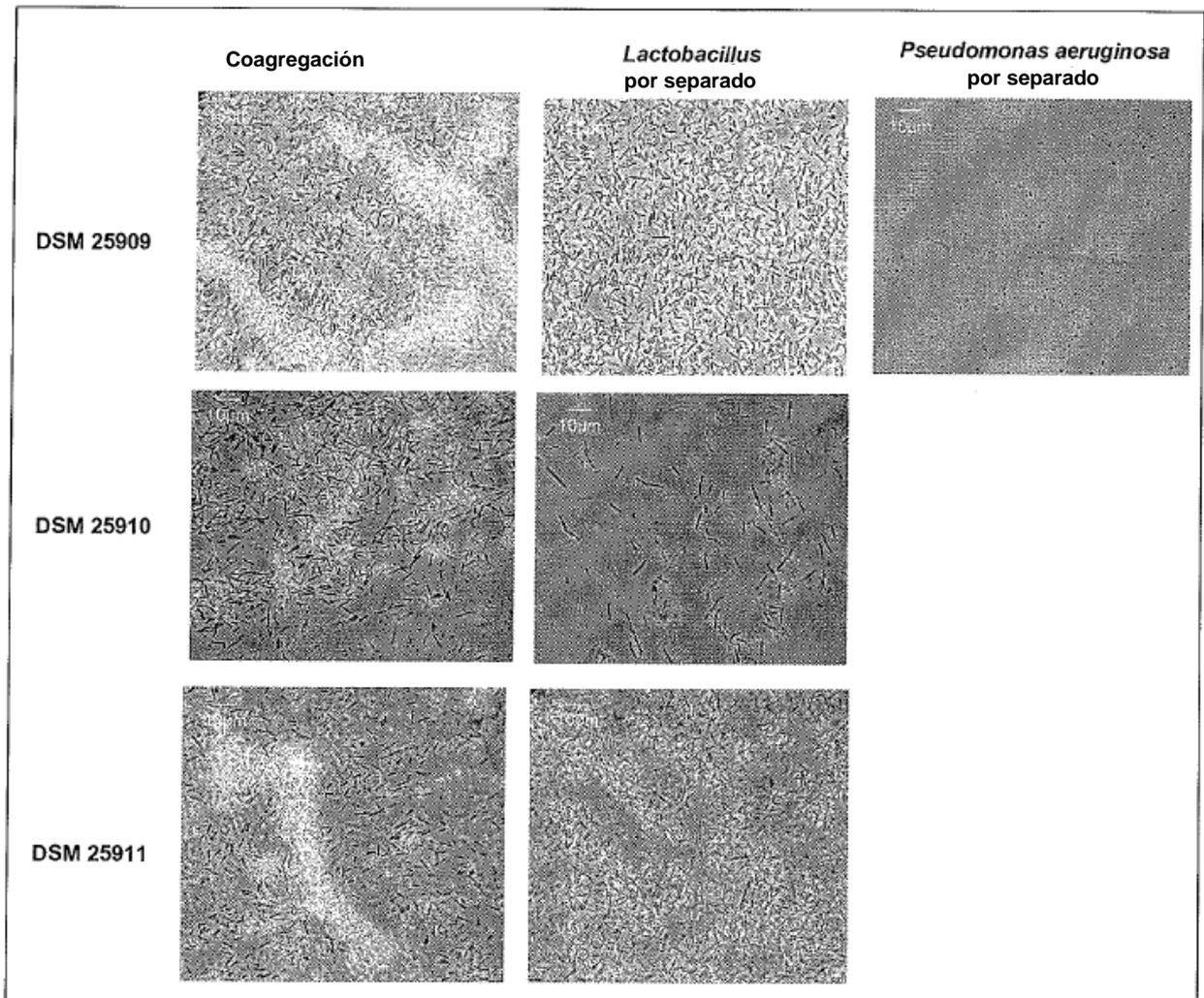


Figura 5

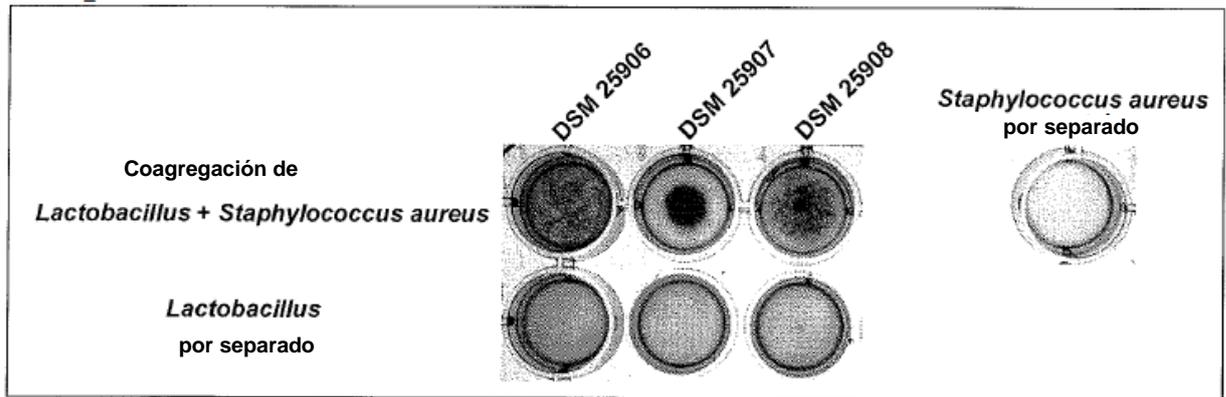


Figura 6

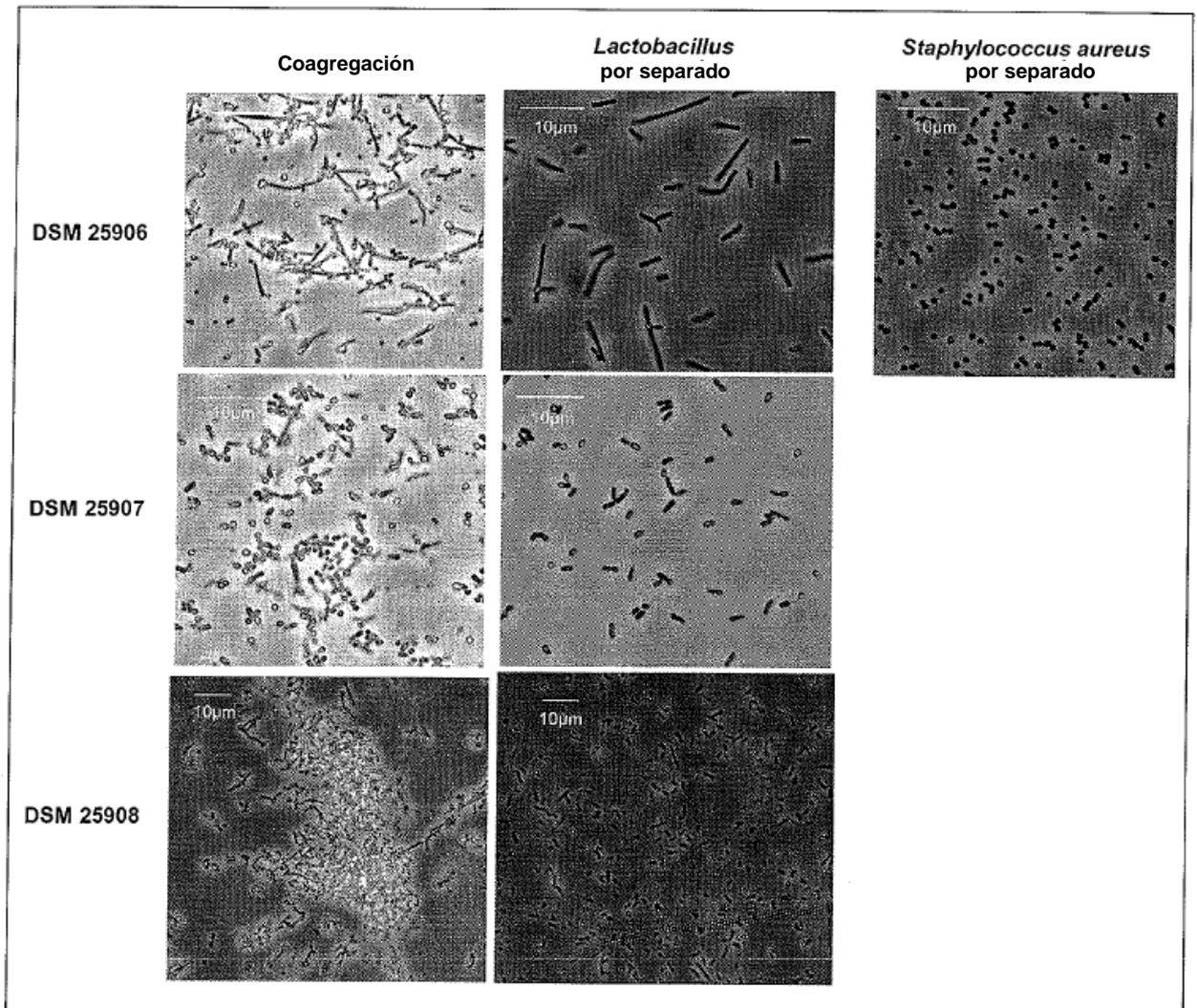


Figura 7

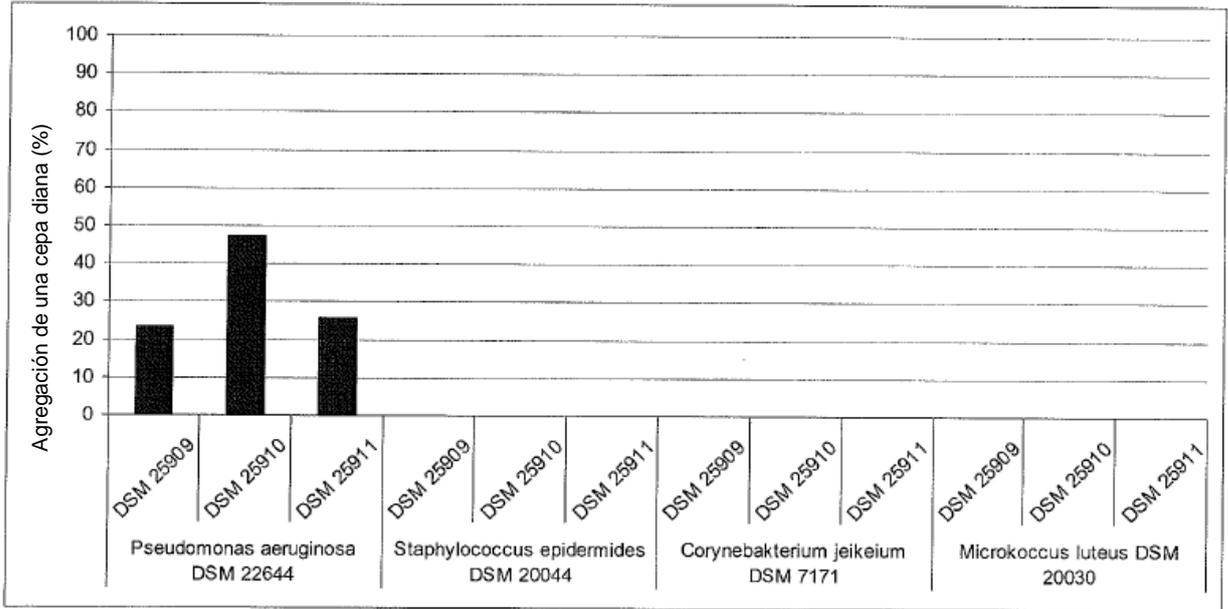


Figura 8

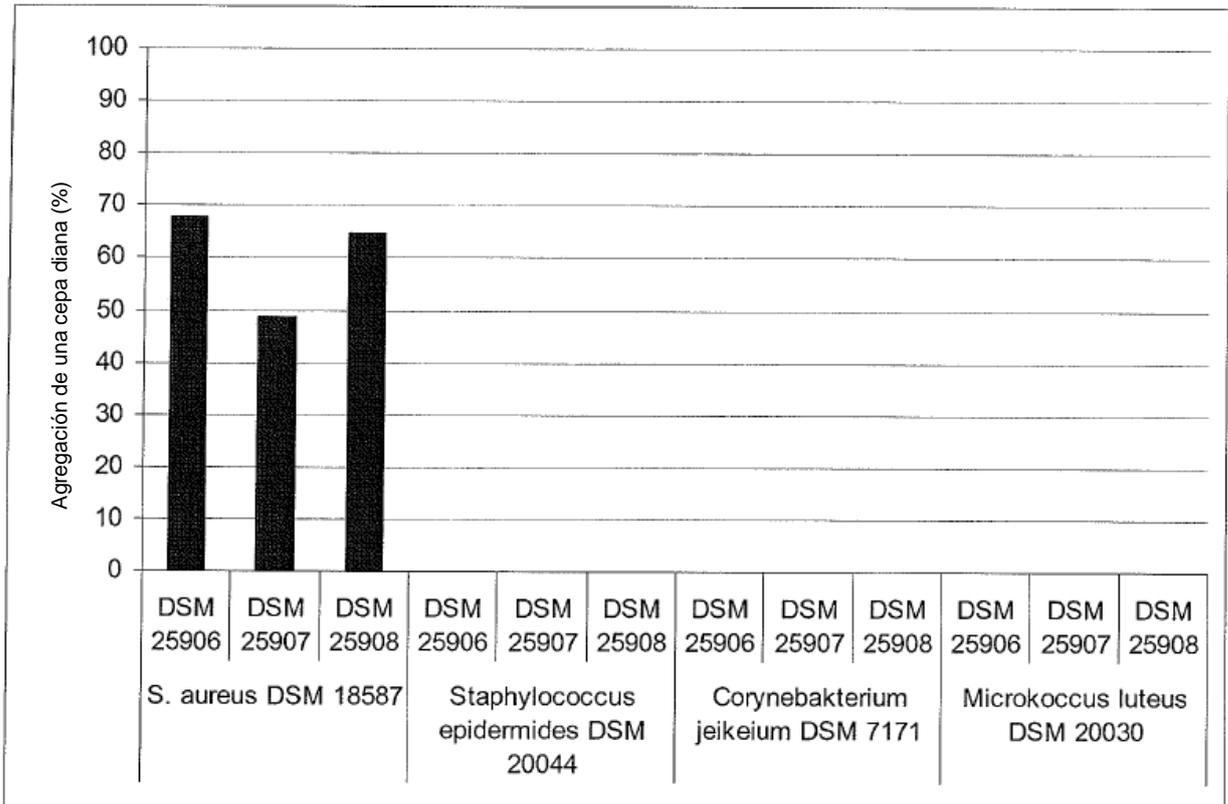


Figura 9

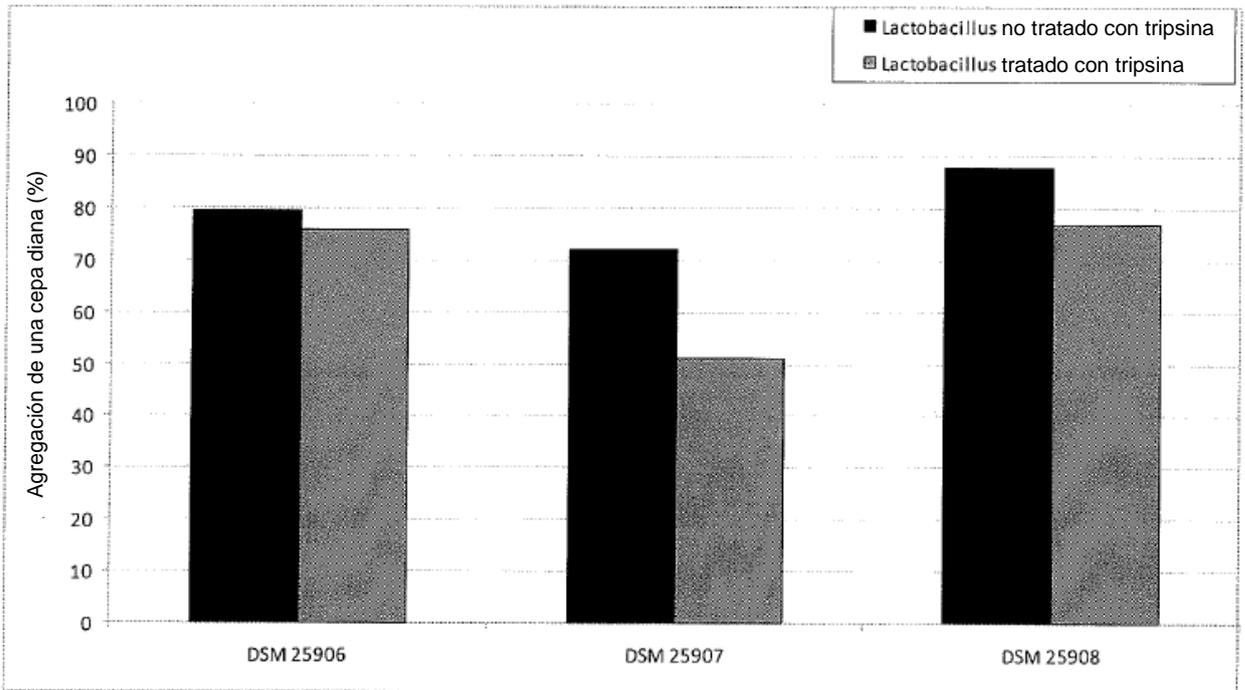


Figura 10

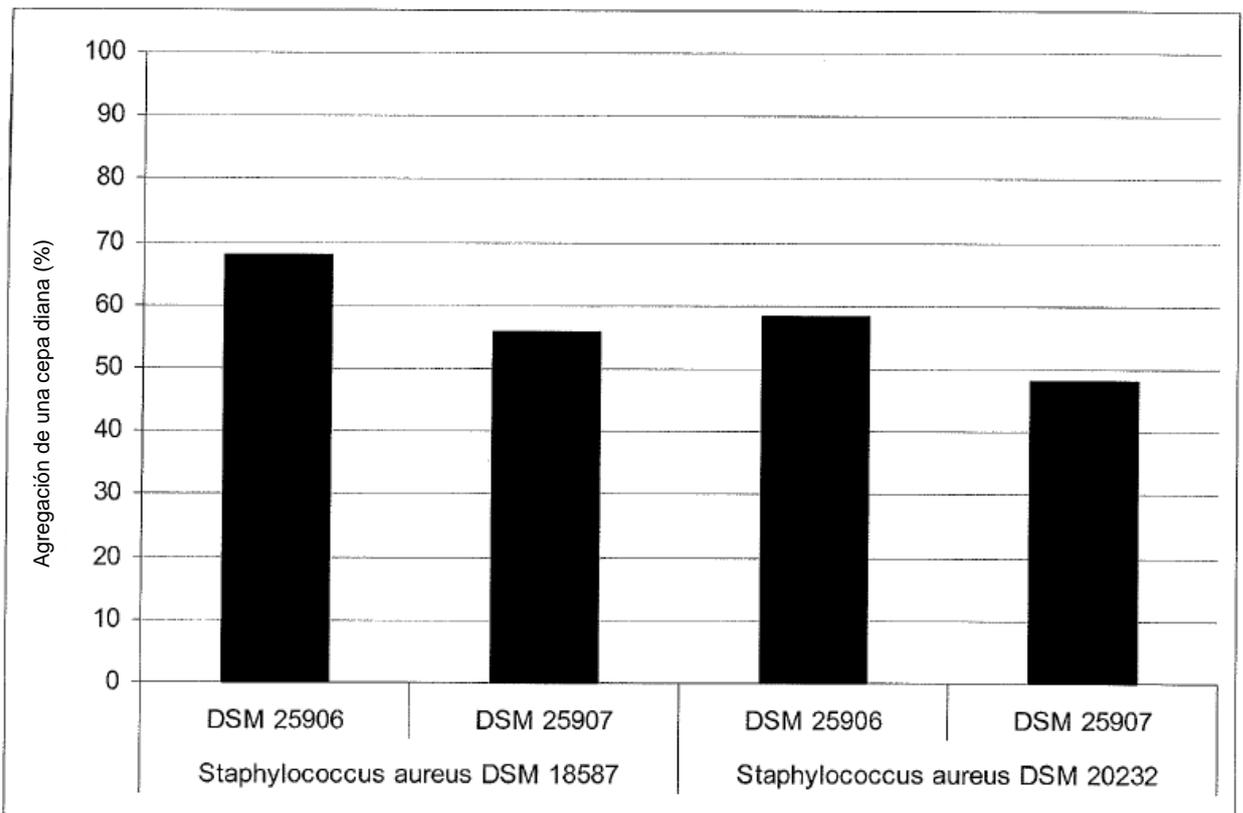


Figura 11

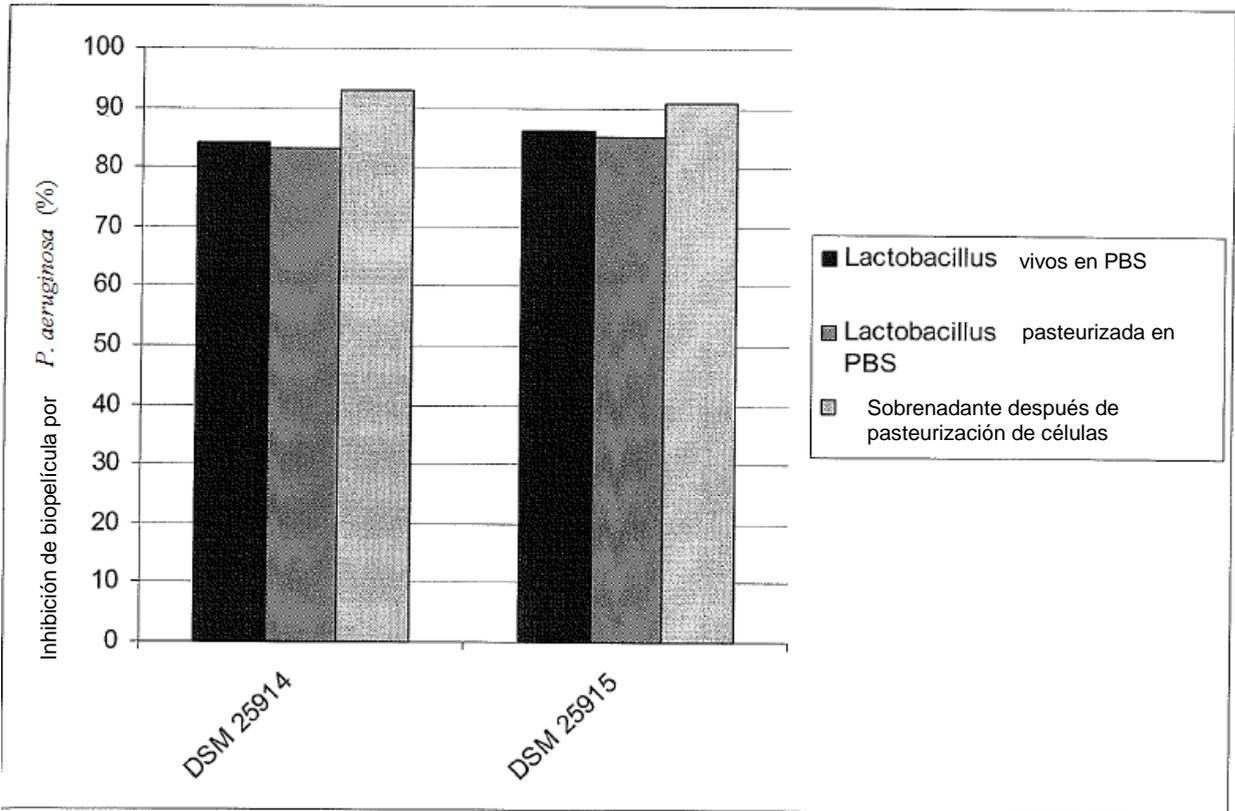


Figura 12

