

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 138**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C12R 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011 PCT/EP2011/073747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11802426 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2655595**

54 Título: **Nueva bacteria y extractos de dicha bacteria y su utilización en dermatología**

30 Prioridad:

22.12.2010 FR 1061081

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2018

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (33.3%)
45, place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR;
SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LEBARON, PHILIPPE;
BOURRAIN, MURIEL;
CASTEX-RIZZI, NATHALIE;
NGUYEN, THIEN;
CHOL, BERTRAND;
ARIES, MARIE-FRANÇOISE y
RAVARD HELFFER, KATIA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 689 138 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva bacteria y extractos de dicha bacteria y su utilización en dermatología.

5 La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana aislada de agua subterránea. La invención se refiere además a extractos bacterianos y a su utilización en el contexto del tratamiento de inflamaciones.

Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevas composiciones de interés en el tratamiento y la prevención de trastornos inflamatorios, en particular, patologías dermatológicas.

10 Las enfermedades dermatológicas, tales como dermatitis atópica, prurito, eccema y soriasis, son cada vez más frecuentes en niños. La incidencia de la dermatitis atópica se ha duplicado o triplicado en los países desarrollados durante los últimos 30 años: 15% a 30% de los niños y 2% a 10% de los adultos están afectados (Williams H. *et al.*, JACI 2006; 118: 209–13). La dermatitis atópica es la manifestación cutánea de atopia; es una dermatosis inflamatoria crónica o eccema, que se produce debido a un conjunto de circunstancias determinadas genéticamente. Se considera actualmente una preocupación principal de salud pública. La dermatitis atópica a menudo se asocia con otros trastornos atópicos, tales como rinitis alérgica y asma. Esta afección aparece con mayor frecuencia en la niñez temprana, y se caracteriza por repetidos brotes durante varios años. Progresas con exacerbaciones, interrumpidas por remisiones espontáneas.

20 La calidad de vida de los pacientes que sufren de dermatitis atópica se altera profundamente. Los tratamientos aceptados incluyen corticoesteroides tópicos e inmunomoduladores, agentes sistémicos cuyos frecuentes efectos secundarios limitan la utilización a largo plazo, y emolientes. Las terapias actuales son reactivas – tratamiento de los brotes– si bien actualmente se cree que la intervención temprana focalizada en el control de los brotes y de la inflamación cutánea puede ser beneficiosa, tanto en términos del control de la enfermedad, como de la potencial aparición de asma o rinitis (Bieber, T. 2008, *Atopic dermatitis, The New England Journal of Medicine*, vol. 358 (14) 1483–1494), ya que la dermatitis atópica se considera la fase inicial del avance atópico. En la mayoría de los casos, los tratamientos incluyen un componente local, para proporcionar el mejor alivio a los pacientes.

30 Los tratamientos estándares para la dermatitis atópica, particularmente, utilizan corticoesteroides tópicos o inmunosupresores, si bien dichos tratamientos no están libres de efectos adversos, en particular, en niños.

35 La dermatitis atópica es compleja y multifactorial. En la literatura, algunos estudios epidemiológicos han demostrado que el factor de “higiene” en los entornos urbanos favorece la enfermedad, como alergia y autoinmunidad. Por otra parte, en contextos rurales, donde el hombre está en contacto constante con microorganismos y alergenicos, dicha exposición estimula el sistema inmunitario de defensas del hombre desde el nacimiento.

40 En la dermatitis atópica, la función de barrera de la piel es debilitada y alterada, lo que favorece la invasión y la colonización de patógenos (bacterias y virus), en particular, de *Staphylococcus aureus*, que es conocido que predomina entre las bacterias comensales de la piel.

45 Desde el punto de vista de la inmunología, el problema es el desequilibrio de la respuesta inmunitaria. La atopia con frecuencia se describe como una manifestación alérgica (mediada por IgE, dominio de citocinas IL–4, IL–5, IL–13) o de la respuesta Th2. Esta última es más acentuada en presencia de “estímulos antígenicos” de *Staphylococcus aureus*. La inmunomodulación consiste en el retorno de la homeostasis inmunitaria a un equilibrio de Th1/Th2.

50 La inmunidad innata es la respuesta primaria, rápida y no específica de las respuestas inmunitarias en mamíferos. Las primeras barreras de defensa de la célula están compuestas por receptores de tipo Toll (TLR). Cada TLR reconoce específicamente patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) tales como ácidos nucleicos (TLR3), péptidos, proteínas de superficie, ácido lipoteicoico (TLR2), flagelos (TLR5) y lipopolisacáridos (TLR4), que se originan a partir de microorganismos extraños. Una interacción específica entre un motivo (agonista) y un TLR dispara una cascada de complejas reacciones que logran la transcripción de NFκB, seguida de la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias y de quimiocinas (Kang *et al.*, 2006). Otras consecuencias farmacológicas resultantes son la inducción de péptidos antimicrobianos (AMP), que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos (bacterias, virus, parásitos) (Glaser, R. *et al.* 2005, *Nat. Immunol.*, 6: 57–64).

60 La dermatitis atópica a menudo se acompaña de picazón y prurito, de manera que causa incomodidad y molestia en la vida diaria (rascado, pérdida de sueño, etc.). Una de las causas de esta patología inflamatoria se debe a la activación de un receptor acoplado a proteína G denominado PAR2 (receptor 2 activado por proteasa) (Steinhoff, M. *et al.*, 2003, *J. Neurosci.*, 23: 6176–6180). El PAR2 se expresa sobre la superficie de muchas células, en particular, queratinocitos, células endoteliales, miocitos colónicos, enterocitos, neuronas entéricas y células inmunitarias. Las proteasas (tripsina, triptasa), presentes en abundancia en la epidermis, disocian el PAR2 en el

término N, de manera que se expone un péptido específico que activa este mismo receptor (fenómeno de autoactivación) (Vergnolle, N., 2009, *Pharmacol. Ther.*, 123: 292–309). Este proceso involucra la activación del gen NFκB, seguida de la inducción de citocinas proinflamatorias, de modo que se dispara la inflamación. En este contexto, el desarrollo de antagonistas de PAR2 o inhibidores de proteasa tiene un alto potencial para el tratamiento del prurito patológico.

La soriasis es también una enfermedad inflamatoria cutánea con un avance crónico; afecta al 2% de la población. Junto con la dermatitis atópica, la soriasis es una de las enfermedades inflamatorias cutáneas crónicas más comunes. Se caracteriza por el crecimiento anormal de células epidérmicas asociadas con una reacción inflamatoria. El mecanismo central del fenómeno de la inflamación se relaciona con la acción de linfocitos T del sistema inmunitario, principalmente, células Th1 (Wilsman–Theis, D. *et al.*, *Eur. J. Dermatol.*, vol. 18 (2) 172–180), que inician y mantienen el proceso inflamatorio y estimulan la excesiva proliferación de queratinocitos, que entonces proceden a través de una fase de diferenciación acelerada e incompleta. Los queratinocitos expresan receptores que los hacen sensibles a la señales inflamatorias y liberan mediadores proinflamatorios. La inflamación soriásica es así mantenida por la mutua estimulación de linfocitos T y queratinocitos.

Por lo tanto, la enfermedad debe ser tratada a largo plazo. En consecuencia, existe una necesidad y una alta demanda de la búsqueda de alternativas terapéuticas para estas dermatosis inflamatorias.

Puede mencionarse el documento de patente EP 2 018 891 (Guéniche A., 2009) y el documento de Guéniche A. *et al.*, 2006 (*European Journal of Dermatology*, 16, 4, 380–384), que describen la utilización de un extracto bacteriano de *Vitreoscilla filiformis* (*V. filiformis*) para el tratamiento de la dermatitis atópica. Dicho extracto presenta la ventaja de requerir el cultivo de dicha bacteria filamentosa *V. filiformis* en un medio que contiene agua mineral libre de azufre.

En este contexto, la presente invención proporciona una solución para el tratamiento de estos trastornos inflamatorios mediante el aislamiento, la caracterización y el fraccionamiento de una nueva bacteria no descrita hasta el momento.

Por primera vez, y de manera sorprendente, en el contexto de la presente invención se consigue el aislamiento de una cepa que pertenece a una nueva especie bacteriana de agua subterránea, en el que dicha nueva cepa bacteriana (o bacteria) se denomina LMB64.

Esta bacteria LMB64, además de haber sido aislada, fue caracterizada y definida de manera que pertenece a la clase de *Betaproteobacteria*, una subfamilia de *Neisseriaceae*, y probablemente, de un nuevo género aún no definido. El análisis de la secuencia de genes que codifica el ARN ribosómico (ARNr) 16S hizo posible la colocación de esta bacteria en proximidad a los géneros *Chromobacterium*, *Paludimonas*, *Lutelia* y *Glubenkiana*, con los cuales comparte 95% de similitud de secuencia.

Esta bacteria no patógena es Gram–negativa, y se describirá con mayor detalle en los ejemplos. Esta bacteria presenta además la característica de ser no filamentosa. Asimismo, esta bacteria presenta la ventaja de que puede ser cultivada en un medio que contiene cualquier tipo de agua, y más en particular, agua común. A título de ejemplo, en contraste a *V. filiformis*, el cultivo de la bacteria LMB64 de la presente invención no requiere condiciones de cultivo particulares, y más en particular, no requiere un medio que contenga por lo menos un tipo libre de azufre de agua mineral o térmica. Esto representa una clara ventaja, tanto en términos de condiciones de cultivo como de facilidades, y desde el punto de vista económico.

El gen que codifica el ARNr 16S ha sido secuenciado casi por completo (1487 p. b., correspondientes a la secuencia de SEC ID nº 1). La bacteria LMB64 presenta un plásmido circular de 10948 p. b. Este plásmido fue secuenciado por completo, y la secuencia se representa en la secuencia de SEC ID nº 2.

De acuerdo con una primera forma de realización, la presente invención se refiere a una bacteria no patógena Gram–negativa, que pertenece a la clase de *Betaproteobacteria*, una subfamilia de *Neisseriaceae*, cuya secuencia de nucleótidos del gen que codifica el ARNr 16S incluye o comprende la secuencia de SEC ID nº 1, o cualquier secuencia de nucleótidos con por lo menos 80%, preferentemente, 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con dicha secuencia de SEC ID nº 1.

Preferentemente, la presente invención se refiere a una bacteria no patógena Gram–negativa que pertenece a la clase de *Betaproteobacteria*, una subfamilia de *Neisseriaceae*, caracterizada por que la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S de dicha bacteria incluye o comprende la secuencia de SEC ID nº 1.

En el contexto de la presente invención, el “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de ácido nucleico se refiere a un porcentaje de nucleótidos idénticos entre las dos secuencias que deben ser comparadas, obtenido después de la mejor alineación (alineación óptima), en el que este porcentaje es puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen de manera aleatoria y sobre su longitud entera. Las

comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácido nucleico normalmente se realizan mediante la comparación de estas secuencias tras haberlas alineado de manera óptima, en las que dicha comparación puede efectuarse por segmento o por “ventana de comparación”. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [*Ad. App. Math.*, 2: 482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.*, 48: 443], por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. The USA*, 85: 2444] o mediante soporte lógico informático usando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Group Computer, 575 Science Dr., Madison, WI, o el programa informático de comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se determina mediante la comparación de estas dos secuencias alineadas de manera óptima, en el que la secuencia de ácido nucleico que se debe comparar puede incluir adiciones o eliminaciones en relación con la secuencia de referencia, para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad es calculado mediante la determinación del número de posiciones para las cuales el nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, la división de este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventaja de comparación, y la multiplicación del resultado obtenido por 100, a fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, el programa de “secuencias BLAST 2” (Tatusova *et al.*, “Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, *FEMS Microbiol Lett.*, 174: 247–250), que puede obtenerse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, puede usarse con los parámetros por defecto (en particular, para los parámetros de “penalidad de espacio abierto”: 5, y “penalidad de espacio de extensión”: 2; donde la matriz seleccionada es, por ejemplo, la matriz “BLOSUM 62” propuesta por el programa), donde el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se deben comparar es calculado directamente por el programa. Es posible además utilizar otros programas, tales como los programas informáticos “ALIGN” o “Megalign” (DNASTAR).

De acuerdo con otra forma de realización, la bacteria de acuerdo con la invención incluye por lo menos un plásmido que comprende la secuencia de SEC ID nº 2, o cualquier secuencia con por lo menos 80%, preferentemente, 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con dicha secuencia de SEC ID nº 2.

Preferentemente, la bacteria LMB64 incluye por lo menos un plásmido que comprende la secuencia de SEC ID nº 2.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la bacteria LMB64 se caracteriza por que es no filamentosa.

Otras características de dicha bacteria LMB64 se detallarán a continuación, en los ejemplos.

Además, la bacteria LMB64 de la presente invención ha sido depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest a nombre del Solicitante, en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* (CNCM), Institut Pasteur, Paris, el 8 de abril de 2010, con la referencia I-4290.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es la bacteria depositada en la CNCM el 8 de abril de 2010, con la referencia I-4290, o un homólogo, un descendiente o cualquier otra mutante.

El término “mutante” se refiere a cualquier bacteria que surge directamente de la cepa I-4290, y puede comprender mutaciones naturales o recombinaciones, por ejemplo, cualquier recombinación relacionada con la proliferación celular, la división celular (mutación debida a errores que se producen durante la división bacteriana o la replicación de ADN) o cualquier otro mecanismo de selección natural, tal como la selección de mutantes que son resistentes o devienen resistentes a un compuesto determinado. Se incluyen entre estas mutantes cualquier bacteria que se obtenga a partir de la cepa I-4290 que comprenda una o más mutaciones en su secuencia genómica (o la de su plásmido), en la que las mutaciones fueron causadas por radiación, por un virus, por transposones o por agentes químicos mutágenos.

De acuerdo con una primera forma de realización de la invención, a partir de un cultivo bacteriano, puede aislarse la biomasa entera por medio de diversos métodos conocidos, tales como la filtración, la coagulación con un alcohol (etanol, isopropanol, isobutanol), el secado sobre un cilindro con una precapa raspada, etc., y a continuación, puede usarse en forma liofilizada o inactivada por calor.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la invención se refiere, de manera general, a un extracto bacteriano, también denominado una fracción bacteriana, obtenido a partir de una suspensión de bacterias como se describe anteriormente, a decir, la bacteria LMB64.

El término “extracto bacteriano” se refiere a cualquier extracto o fracción de la biomasa bacteriana, o cualquier fracción activa de dicho extracto. Por ejemplo, dicho extracto puede obtenerse a partir de un cultivo de la bacteria LMB64, en el que el método de preparación comprende por lo menos una etapa de lisis de la bacteria y una etapa de separación de las diversas fracciones de las cuales está constituida, mediante la centrifugación o la filtración.

De una manera no limitativa, el extracto de acuerdo con la invención puede consistir en células bacterianas aisladas del medio de cultivo, que han sido concentradas, por ejemplo, mediante la centrifugación; o células bacterianas concentradas que han sido sometidas a una operación en la cual la envoltura celular ha sido interrumpida por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, tal como la acción de ultrasonido o autoclave; o el sobrenadante obtenido mediante la filtración.

Una etapa importante del método de preparación de extracto de acuerdo con la invención consiste en la eliminación de los diversos componentes intracelulares, tales como ácidos nucleicos (ADN cromosómico, ADN circular extracromosómico, plásmidos), ribosomas y sustancias almacenadas intracelulares tales como glucógeno, almidón y poli-β-hidroxibutirato, etc.

Preferentemente, el extracto bacteriano de acuerdo con la invención se obtiene tras el tratamiento de dicha suspensión bacteriana de manera que se eliminan los componentes intracelulares.

El resultado es que el extracto de acuerdo con la invención incluye principalmente componentes que se originan en la membrana, el espacio periplásmico o el espacio extracelular.

Más particularmente, dichos componentes intracelulares comprenden por lo menos los ácidos nucleicos.

Además de la eliminación de compuestos intracelulares, y como un ejemplo no limitativo, es también posible sin dificultad, para los expertos en la materia, separar, tras la lisis de las bacterias y la centrifugación, los componentes del sobrenadante de cultivo (en la presente memoria en adelante, la fracción S0) y los componentes que constituyen la miniesfera (en la presente memoria en adelante, E0). Por ejemplo, puede sugerirse que el umbral de separación entre los constituyentes de S0 y E0 sea de un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. En consecuencia, los constituyentes de la fracción S0 presentan, en su mayoría, un peso molecular inferior a 100 kDa, mientras que los componentes de la fracción E0 presentan, en su mayoría, un peso molecular superior a 100 kDa.

Más particularmente, es posible, en consecuencia, mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, extraer y separar las biomoléculas halladas en el sobrenadante de cultivo (S0) de las principalmente compuestas por proteínas de superficie, y proteínas ubicadas en el espacio periplásmico de la bacteria (E0).

De acuerdo con una forma de realización de la invención, el extracto bacteriano incluye una fracción E0 que comprende por lo menos proteínas de membrana, proteínas periplásmicas y proteínas que se originan a partir del flagelo.

Las proteínas periplásmicas incluyen proteínas alojadas en el espacio periplásmico de bacterias Gram-negativas, que pueden liberarse por choque osmótico o mediante la incubación en un medio que contiene un agente caotrópico o detergentes (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition: Sambrook and Russell. CSHL Press).

Las proteínas que se originan a partir del flagelo incluyen proteínas multiméricas del flagelo o fragmentos del flagelo. Los métodos para el aislamiento y la purificación de flagelos bacterianos enteros con detergentes, y a continuación, mediante separaciones de ultracentrifugación (en presencia de un gradiente CsCl) se describen en la literatura. En la invención, los ejemplos de métodos de extracción hicieron posible la recuperación de fragmentos de flagelos.

Las proteínas de membrana incluyen proteínas que están ancladas en la membrana y de las cuales una parte se expone sobre la superficie (proteínas de membrana externa, u Omp), proteínas que se adhieren a la superficie de la membrana, lipoproteínas y porinas (Ward J. B., *Microbial adhesion to surfaces*, 1980).

Preferentemente, dichas proteínas de membrana consisten en porinas, OmpA [proteína de membrana externa A], lipopolisacáridos y/o lipoproteínas.

Más particularmente, el extracto bacteriano de acuerdo con la invención incluye una fracción S0 que comprende por lo menos péptidos y proteínas secretados y metabolitos secundarios.

Los péptidos y proteínas secretados incluyen péptidos y proteínas que son naturalmente producidos y secretados por la bacteria LMB64, y que pueden recuperarse mediante la centrifugación o la filtración.

Los metabolitos secundarios incluyen las moléculas pequeñas que la bacteria LMB64 produce y secreta en el medio de cultivo.

5 Debe mencionarse en la presente memoria la presencia de lipopolisacáridos dentro de la fracción S0. De hecho, los lipopolisacáridos, si bien se encuentran principalmente en la fracción E0, se encuentran también, sin embargo, en cantidades menores en la fracción S0.

10 De una manera ventajosa, las fracciones E0 y S0 pueden combinarse para obtener una fracción ES0, por ejemplo, mediante la incubación del medio de cultivo y la reacción en un medio básico (pH 9 a 11) durante aproximadamente 5 horas a una temperatura de 4°C, mediante la centrifugación y la filtración en un filtro de 0,2 µm, para obtener una solución transparente de ES0.

15 El extracto bacteriano ES0, en consecuencia, está compuesto, entre otros componentes, por proteínas de membrana, lipopolisacáridos, proteínas periplásmicas, fragmentos de proteínas del flagelo y metabolitos primarios y secundarios producidos por la bacteria.

20 De manera preferida, el extracto ES0 presenta un perfil de proteína que comprende por lo menos, de acuerdo con la técnica SDS-PAGE, doce bandas que incluyen tres bandas principales que corresponden, respectivamente, a pesos moleculares (pesos moleculares aproximados en relación con los modelos moleculares, proporcionados principalmente por Bio-Rad Laboratories) comprendidos entre:

- banda 1: 30 kDa y 36 kDa, preferentemente, 34 kDa;
- banda 2: 41 kDa y 45 kDa, preferentemente, 43 kDa;
- banda 3: 47 kDa y 51 kDa, preferentemente, 49 kDa.

30 De acuerdo con otra forma de realización de la invención, el extracto bacteriano incluye una fracción ES0 que comprende por lo menos la fracción E0 y la fracción S0.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el extracto bacteriano incluye una fracción ES0 con un perfil de proteína, obtenido por SDS-PAGE, que incluye tres bandas principales que corresponden a pesos moleculares comprendidos entre 30 kDa y 36 kDa, 41 kDa y 45 kDa y 47 kDa y 51 kDa, respectivamente.

35 De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el extracto bacteriano incluye una fracción ES0 con un perfil de proteína, obtenido por SDS-PAGE, que incluye tres bandas principales que corresponden a pesos moleculares de 34 kDa, 43 kDa y 49 kDa, respectivamente.

40 De acuerdo con otro aspecto, la invención describe un método para la preparación de un extracto bacteriano que comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar la bacteria LMB64 en un medio adecuado; y
- b) eliminar los componentes intracelulares.

45 De acuerdo con otra forma de realización, el método de acuerdo con la invención consiste en un método para la preparación de un extracto bacteriano S0, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) cultivar la bacteria LMB64 en un medio adecuado;
- b) centrifugar dicho cultivo; y
- c) recuperar el sobrenadante S0.

55 De acuerdo con otra forma de realización, el método de acuerdo con la invención consiste en un método para la preparación de un extracto bacteriano E0, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) cultivar la bacteria LMB64 en un medio adecuado;
- b) centrifugar dicho cultivo y eliminar el sobrenadante;
- c) tratar la biomasa resultante de la etapa b) para eliminar los componentes intracelulares; y
- d) recuperar la base E0.

65 De manera preferida, la etapa c) consiste en el tratamiento ultrasónico de la biomasa resultante de la etapa b), y

a continuación, una centrifugación inicial destinada a la eliminación de la miniesfera que comprende dichos componentes intracelulares; y a continuación, una segunda centrifugación del sobrenadante.

5 De acuerdo con otra forma de realización, el método de acuerdo con la invención consiste en un método para la preparación de un extracto bacteriano E0, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) cultivar la bacteria LMB64 en un medio adecuado;
- b) centrifugar dicho cultivo y eliminar el sobrenadante;
- 10 c) tratar, con ultrasonido, la biomasa resultante de la etapa b);
- d) centrifugar dicha biomasa tratada con ultrasonido, y eliminar la biomasa obtenida;
- 15 e) centrifugar el sobrenadante resultante de la etapa d); y
- f) recuperar la base E0.

20 Debe apreciarse que los diversos métodos descritos anteriormente son proporcionados únicamente a título ilustrativo, y que puede utilizarse cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia.

Como resulta evidente a partir de los ejemplos expuestos a continuación, en el contexto de la presente invención se han demostrado, además de las actividades esperadas para este tipo de extracto, varias nuevas actividades, sin describir anteriormente.

25 Un primer aspecto conveniente de la invención, relacionado con la inmunomodulación, se basa en la propiedad de modulación de las citocinas proinflamatorias. Más particularmente, la utilización de una bacteria o de un extracto de acuerdo con la invención induce de manera significativa las citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α , que, preferentemente, participan en la respuesta inmunitaria Th1, e inhibe significativamente las citocinas IL-4 y IL-6. El resultado es la activación de células de Langerhans y un retorno al equilibrio de Th1/Th2.

30 Además, otra observación demostró que la utilización de una bacteria o de un extracto de acuerdo con la invención posibilita disminuir en gran medida la expresión de receptores IgE, que resulta de interés ya que IgE potencia los fenómenos alérgicos.

35 Otra ventaja de la invención consiste en que, como resulta evidente a partir de los ejemplos, la utilización de una bacteria o de un extracto de acuerdo con la invención induce la producción de péptidos antimicrobianos, por ejemplo, los péptidos hBD-2, hBD-3, S1007A y LL-31.

40 Más particularmente, como se menciona anteriormente, se conoce un extracto de la bacteria *Vitreoscilla filiformis* (Guéniche A. *et al.*, *Eur. J. Dermatol.*, 2006; 16: 380) con actividad en TLR2, debido a la presencia de OmpA, y en TLR4, debido a la presencia de lipopolisacáridos. Debido a la ausencia de flagelos en la bacteria *V. filiformis*, el extracto obtenido de *V. filiformis* no presenta actividad en TLR5.

45 Por primera vez, el solicitante describe un extracto bacteriano de acuerdo con la invención que presenta, además de la actividad en TLR2 y TLR4, actividad en TLR5.

50 Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de una bacteria o de un extracto bacteriano, tal como se describe anteriormente, como un activador de TLR2, TLR4 y TLR5.

De manera preferida, dicho extracto bacteriano activador de TLR2, TLR4 y TLR5 consiste en un extracto que comprende la totalidad o parte de las proteínas que se originan a partir del flagelo. En este caso, a título de ejemplo, dicho extracto es, preferentemente, el el extracto ES0.

55 Dicha actividad de activación de TLR5 es de interés significativo ya que es conocido que TLR5 inducen ciertos péptidos antimicrobianos tales como soriasina (S100A7) y hBD-2 (Glaser *et al.*, *Journal of Investigative Dermatology* (2009) 129, 641-649). Además, los agonistas de TLR5 actúan en sinergia con los de TLR2 y TLR4, de manera que posibilita la potenciación de la producción de péptidos antimicrobianos. Se ha demostrado que mediante el bloqueo de TLR5 con un anticuerpo, estos se producen en pequeña medida, o no se producen.

60 Este aspecto es, en consecuencia, particularmente innovador en términos de aplicaciones de inmunomodulación para la bacteria o los extractos de acuerdo con la invención.

65 Además, de una manera no esperada, el solicitante además ha demostrado, en contraste con los extractos bacterianos descritos hasta el momento, una actividad antagonista hacia PAR2. Esta actividad es de interés significativo en el contexto de los tratamientos antiinflamatorios.

Por lo tanto, la invención se refiere, muy particularmente, a la utilización de una bacteria o de un extracto bacteriano como se describen anteriormente, como antagonista de PAR2.

De una manera preferida, dicho extracto bacteriano antagonista de PAR2 consiste en el extracto ES0.

El PAR2 es sobreexpresado en células endoteliales, miocitos colónicos, enterocitos, neuronas entéricas, células inmunitarias y queratinocitos. Las proteasas (tripsina, triptasa) presentes en abundancia en el entorno disocian el PAR2 en el término N, de manera que se expone un péptido específico que activa este mismo receptor (fenómeno de autoactivación). En consecuencia, éste activa la producción de citocinas proinflamatorias y dispara la inflamación (Vergnolle, N., 2009, *Pharmacol. Ther.*, 123: 292–309). Este fenómeno es observado en el ratón silvestre, si bien no aparece en el ratón KO (deficiente en PAR2). El tratamiento con una antiproteasa o un antagonista de PAR2 hace posible evitar este fenómeno de inflamación.

La combinación y la sinergia de todas estas actividades proporcionan a esta bacteria LMB64, o a cualquier extracto que se origine a partir de esta misma bacteria, un alto potencial para tratar enfermedades inflamatorias, y muy particularmente, enfermedades inflamatorias en las cuales participa PAR2, o en las cuales el sistema inmunitario está debilitado, alterado o desequilibrado.

La invención, por lo tanto, se refiere a la utilización de una bacteria tal como se describe anteriormente, o de un extracto bacteriano que se origina a partir de dicha bacteria, para la preparación de una composición destinada al tratamiento o a la prevención de trastornos inflamatorios dermatológicos.

De una manera preferida, dichos trastornos inflamatorios dermatológicos consisten en dermatitis atópica, prurito, eccema y soriasis.

De acuerdo con otra forma de realización, la invención de la presente solicitud de patente se refiere a una composición que comprende, como principio activo, por lo menos una bacteria o un extracto bacteriano según la invención.

Por lo tanto, la invención se refiere, preferentemente, a una composición cosmética o dermatológica.

La composición según la invención se refiere al tratamiento de trastornos inflamatorios dermatológicos.

De una manera preferida, dichos trastornos inflamatorios dermatológicos consisten en dermatitis atópica, prurito, eccema y soriasis.

La composición de acuerdo con la invención puede contener, en particular, aditivos y auxiliares de la formulación tales como emulsionantes, espesadores, agentes gelificantes, aglutinantes acuosos, agentes de dispersión, estabilizadores, colorantes, fragancias y conservantes.

La composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la invención comprende además uno o más excipientes típicos dermatológicamente compatibles.

La composición de acuerdo con la invención puede prepararse en forma de una emulsión de tipo agua en aceite (W/O) o de tipo aceite en agua (O/W), una emulsión múltiple tal como una emulsión de tipo agua en aceite en agua (W/O/W) o de tipo aceite en agua en aceite (O/W/O); una microemulsión; o en forma de una hidrodispersión o una lipodispersión; un gel o un aerosol.

Los excipientes dermatológica o cosméticamente compatibles pueden ser cualquier excipiente seleccionado de entre los conocidos por un experto en la materia, para obtener una composición para la aplicación tópica en forma de una leche, una crema, un bálsamo, un aceite, una loción, un gel, un gel espumante, una pomada, una pulverización, etc.

Además de composiciones dermatológicas y cosméticas, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas para su utilización como un fármaco.

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria, el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un compuesto o una combinación de compuestos que forman parte de una composición farmacéutica, que no producen reacciones adversas, y que, por ejemplo, facilitan la administración de los compuestos activos, aumentan su vida media o eficacia en el organismo, aumentan su solubilidad en solución o mejoran su conservación. Dichos portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos, y serán adaptados por el experto en la materia de acuerdo con la naturaleza y el modo de administración de los compuestos activos seleccionados.

Preferentemente, dichos compuestos pueden administrarse sistémicamente, por las vías intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la vía oral. La composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención puede administrarse en varias dosis, repartidas en el tiempo.

- 5 Los modos de administración óptimos, los esquemas de dosificación, y las formas galénicas pueden determinarse de acuerdo con los criterios generalmente considerados en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente, por ejemplo, la edad o el peso del paciente, la gravedad del estado de salud general del paciente, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados.
- 10 La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos expuestos a continuación, que ilustran la invención, sin limitar su alcance.

Descripción de las figuras:

- 15 La figura 1 ilustra la posición filogenética de la secuencia que codifica el ARNr 16S de la cepa LMB64. Las secuencias que aparecen en este árbol son secuencias de la base de datos GenBank más próximas a la secuencia de LMB64.
- 20 Las figuras 2A y 2B presentan imágenes de la bacteria LMB64 bajo el microscopio electrónico de transmisión (A) y el microscopio electrónico de barrido (B).
- La figura 3 presenta el crecimiento óptimo determinado como una función de la temperatura, el pH y la salinidad del medio de cultivo R3.
- 25 La figura 4 ilustra la inducción de citocinas IL-10 e IL-12 por el extracto E0 (efecto dependiente de la dosis).
- La figura 5 ilustra la inducción de moléculas de superficie CD80, CD86, CD83 y CD54 por el extracto E0 (efecto dependiente de la dosis).
- 30 La figura 6 ilustra la inhibición de receptores IgE por el extracto E0.
- La figura 7 ilustra la activación de TLR2 por el extracto ES0.
- La figura 8 ilustra la activación de TLR4 por el extracto ES0.
- 35 La figura 9 ilustra la activación de TLR5 por el extracto ES0.
- La figura 10 ilustra la actividad antagonista de PAR2 específica por el extracto ES0.
- 40 La figura 11 ilustra la inducción de proteínas y péptidos antimicrobianos por el extracto ES0.
- La figura 12 consiste en un gel de SDS-PAGE del extracto ES0.

Ejemplo 1: Selección y caracterización de la bacteria LMB64.

- 45 La bacteria AV13 se aisló de agua subterránea.
- La posición taxonómica de la nueva bacteria LMB64 se propone en la figura 1.
- 50 Más particularmente, la bacteria LMB64 presenta forma de varilla, con una longitud de aproximadamente 2,3 μm ($\pm 0,3$) y un ancho de aproximadamente 1,0 μm ($\pm 0,1$). Una característica distintiva de esta bacteria es la presencia de un flagelo polar (figuras 2A y 2B). Como puede apreciarse además en estas imágenes, la bacteria LMB64 es una bacteria no filamentosa.
- 55 Como se menciona anteriormente, la bacteria LMB64 presenta un plásmido circular de aproximadamente 11 kpb. Ese plásmido fue secuenciado por completo (SEC ID n° 2).
- El gen que codifica el ARNr 16S también fue secuenciado (SEC ID n° 1). La bacteria se cultivó en un fermentador en un medio sintético. La tasa de crecimiento es más alta cuando el medio presenta una baja concentración de sustratos de carbono.
- 60 Los medios de cultivo sometidos a ensayo son R3, MS-glucosa y medios LB cuyas composiciones se describen a continuación, en las tablas 1a, 1b y 1c, respectivamente.

65

Tabla 1a

COMPOSICIÓN DE MEDIO R3	
Extracto de levadura	1 g/l
Difco proteosa peptona	1 g/l
Casamino ácidos	1 g/l
Glucosa	1 g/l
Almidón soluble	1 g/l
Piruvato sódico	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,6 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g/l

5

Tabla 1b

COMPOSICIÓN DE MEDIO MS-GLUCOSA	
Glucosa	6.0 g/l
Ácido cítrico	0,84 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g/l
NH ₄ Cl	1,06 g/l
K ₂ HPO ₄ anhidro	8,75 g/l
Sal sódica de ácido pirúvico	0,5 g/l
Sulfato de cinc, 7H ₂ O	4 mg/l
Cloruro de cobalto, 6H ₂ O	3,5 mg/l
Molibdato sódico, 2H ₂ O	3,5 mg/l
Sulfato de manganeso, 1H ₂ O	5 mg/l
Ácido bórico	2 mg/l
Ácido clorhídrico concentrado	50 mg/l
Sulfato de cobre, 5H ₂ O	4 mg/l
Cloruro de hierro, 6H ₂ O	27 mg/l

Tabla 1c

COMPOSICIÓN DE MEDIOS LB	
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

10 Las tasas de crecimiento de la bacteria LMB64 como una función del medio de cultivo se presentan en la tabla 2, expuesta a continuación.

Tabla 2

Tasa de crecimiento (/h)	
LB	0,25 (±0,05)
LB (½ dilución)	0,46 (±0,11)
LB (1/5 dilución)	0,60 (±0,14)
LB (1/10 dilución)	0,69 (±0,15)
MS-glucosa	0,13 (±0,04)
R3	0,62 (±0,14)

15

El crecimiento óptimo se determinó como una función de la temperatura, el pH y la salinidad del medio de cultivo R3 (figura 3).

20

Las fuentes de carbono asimilables por la bacteria se caracterizaron usando una galería API 50CH (temperatura de incubación: 25°C). Los resultados se resumen en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3

	Tiempo de incubación	
	4 días	5 días
1. Glicerol		
2. Eritritol		
3. D-arabinosa		

ES 2 689 138 T3

	Tiempo de incubación	
	4 días	5 días
4. L-arabinosa		
5. D-ribosa		
6. D-xilosa		
7. L-xilosa		
8. D-adonitol		
9. Metil-β-D-xilopiranosida		
10. D-galactosa		
11. D-glucosa	+	+
12. D-fructosa	+	+
13. D-manosa		
14. L-sorbosa		
15. L-ramnosa		
16. Dulcitol		
17. Inositol	1	+
18. D-manitol		
19. D-sorbitol		
20. Metil-α-D-manopiranosida		
21. Metil-α-D-glucopiranosida		
22. N-acetilglucosamina		
23. Amigdalina		
24. Arbutina		
25. Esculina/citrato de hierro		
26. Salicina		
27. D-celobiosa		
28. D-maltosa	1	+
29. D-lactosa (origen bovino)		
30. D-melibiosa		
31. D-sacarosa	+	+
32. D-trehalosa	1	+
33. Inulina		
34. D-melezitosa		
35. D-rafinosa		
36. Almidón		
37. Glucógeno		
38. Xilitol		
39. Gentiobiosa		
40. D-turanosa	1	+
41. D-lixosa		
42. D-tagatosa		
43. D-fucosa		
44. L-fucosa		
45. D-arabitol		
46. L-arabitol		
47. Gluconato de potasio		
48. 2-Cetogluconato de potasio		
49. 5-Cetogluconato de potasio		
+: sustrato utilizable, 1: bajo uso		

Las actividades enzimáticas demostradas sobre la galería API ZYM son: fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa/lipasa (C8), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y α-glucosidasa.

5

La bacteria LMB64 es sensible a todos los antibióticos sometidos a ensayo, como puede apreciarse en la tabla 4 expuesta a continuación.

Tabla 4

Antibióticos sometidos a ensayo	Zona de diámetro de inhibición (mm)			Actividad inhibitoria
	R3	LB 1/2	LB 1/5	
Ampicilina (10 µg)	29	28	29	+
Cloranfenicol (30 µg)	29	26	24	+
Ciprofloxacina (5 µg)	38	34	34	+
Kanamicina (30 µg)	27	30	27	+
Penicilina (6 µg)	21	26	20	+
Polimixina B (50 µg)	11	15	13	+
Rifampicina (30 µg)	20	19	15	+
Tetraciclina (30 µg)	30	25	20	+
Estreptomina (10 µg)	25	25	24	+
Vancomicina (30 µg)	20	21	21	+

Ejemplo 2: Método para la extracción de fracciones E0, S0 y ES0.

5

Precultivo: La cepa AV13 se inoculó en un matraz de Erlenmyer que contenía 250 ml de medio MS glucosa piruvato (ver tabla 5 a continuación), y a continuación, se realizó la incubación con agitación durante aproximadamente 40 horas a 30°C (pH 7) y a 200 r. p. m. hasta obtener una $OD_{600} \approx 1,5$.

10

Tabla 5

MS Glucosa Piruvato	
Ácido cítrico	0,84 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g
NH ₄ Cl	1,06 g
K ₂ HPO ₄ anhidro	8,75 g
Sal sódica de ácido pirúvico	0,5 g
Mezcla oligo	1 ml
ddH ₂ O qsp	1000 ml
Verificar pH	7
Autoclave	121°C 30 min
Después de autoclave agregar:	
20% glucosa	30 ml
MEZCLA OLIGO	
Disolver en 100 ml de agua destilada:	
Sulfato de cinc, 7H ₂ O	4 g
Cloruro de cobalto, 6H ₂ O	3,5 g
Molibdato sódico, 2H ₂ O	3,5 g
Sulfato de manganeso, 1H ₂ O	5 g
Ácido bórico	2 g
Ácido clorhídrico concentrado	50 g
Sulfato de cobre, 5H ₂ O	4 g
Disolver en 50 ml de agua destilada:	
Cloruro de hierro, 6H ₂ O	27 g
ddH ₂ O qsp	1000 ml

15

Cultivo: El precultivo fue entonces inoculado en un fermentador (Applikon) que contenía 3,7 l de medio MS piruvato + 114 ml de solución de glucosa al 20%. Un sensor de temperatura regulaba la temperatura, preferentemente, próxima a los 30°C. Se usó un sensor de oxígeno (AppliSens) para mantener la concentración de oxígeno disuelto en el medio a 18–25%. Se utilizó un sensor de pH (AppliSens) para mantener el pH a 7 mediante la adición de NH₄OH al 10% por medio de una bomba de caudal fijo. Se usó un sensor analítico

Wedgewood Analytical con el objetivo de controlar los cambios en la densidad óptica en tiempo real. El cultivo se programó en modo de alimentación de lotes; mediante una bomba de caudal variable, se suministró al cultivo una solución de glucosa al 20%. La fermentación se detuvo cuando la $OD_{600} \approx 22-26$, en general, después de aproximadamente 30 horas.

5 Extracción S0: El sobrenadante se separó de la biomasa mediante la centrifugación durante 1 hora a 4°C y 4000 g.

10 Extracción E0: La biomasa húmeda se recogió en solución de NaCl (1 M). Después de la centrifugación durante 15 minutos a 4°C y 9000 g, el sobrenadante se desechó, y se recogió la miniesfera en solución de NaCl, 1 M. El tubo de muestra entonces fue sumergido en un baño ultrasónico enfriado con un parámetro de potencia establecido de 50–60 W, durante varios minutos. Después de la centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 6000 g, la miniesfera se descartó, y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron dos volúmenes de etanol frío, y la suspensión se dejó durante la noche a 4°C. Después de la centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 6000 g, el sobrenadante se desechó, y la miniesfera se recogió en regulador Tris, 25 mM, pH 8,8.

15 Extracción ES0: El cultivo se llevó a pH básico (pH 9–11) con un regulador base. La siguiente etapa fue la incubación con agitación durante 5 horas a una temperatura de 4°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se prefiltró para eliminar los restos de biomasa restantes, y a continuación se filtró en un filtro de 20 0,2 µm. Se obtuvo una solución de color amarillo claro (ES0).

25 Las proteínas se sometieron a ensayo de acuerdo con el protocolo del kit de ensayo de proteína DC (Bio–Rad). Los azúcares se sometieron a ensayo en equivalente de glucosa de acuerdo con el método de fenol/ácido sulfúrico (Dubois, M. *et al.*, 1956).

30 A título de ejemplo, la tabla 6 expuesta a continuación presenta ciertas características específicas del extracto ES0, obtenido en las condiciones que se describen anteriormente.

Tabla 6

	Lote de ensayo	Lote preclínico 1
Características organolépticas	Líquido homogéneo y translúcido amarillo–anaranjado Densidad próxima a la del agua	
pH (en presencia de regulador base)	10,0	10,2
Residuo seco (termoequilibrio)	5,9%	5,1%
Perfil de proteína (SDS–PAGE)	12 bandas detectables (que incluyen 3 bandas principales de aproximadamente 34 kDa, 43 kDa y 49 kDa de tamaño, respectivamente)	
Ensayo de proteína total (µBCA)	2,9 mg/ml	3,0 mg/ml

Se aprecia claramente que los datos anteriores se presentan en la presente memoria únicamente a título ilustrativo.

35 Más particularmente, los datos se refieren a un perfil de proteína obtenido por SDS–PAGE que exhibe tres bandas principales.

Protocolo de SDS–PAGE:

40 El extracto ES0 se recogió en regulador (Tris, 20 mM–HCl, pH 8,0; EDTA, 1 mM; 2,5% SDS y 0,01% azul de bromofenol) y DTT, 1 M (1,4–ditiotreitól). La muestra y la mezcla de marcadores de peso molecular (WesternC, Bio–Rad) se depositaron, respectivamente, en receptáculos de un gel de acrilamida SDS–PAGE 8–16% (GeBaGel, Gene Bio–Application). El regulador de migración contenía Tris, 2,5 mM, glicina, 19,2 mM y SDS al 0,01% (p/v). La migración se deja continuar con un voltaje constante de 160 V durante aproximadamente 1 hora 45 (sistema GeBaGel). Las bandas de proteína se tiñeron a continuación con azul de Coomassie (Instant Blue, Expediton). Se calcularon los tamaños en relación con modelos conocidos (STD).

El gel obtenido se presenta en la figura 12.

50 De acuerdo con una forma de realización de la invención, estas tres bandas presentan unos pesos moleculares de aproximadamente 34 kDa, 43 kDa y 49 kDa, respectivamente.

Ejemplo 3: Demostración de las actividades farmacológicas de las fracciones E0 y ES0.

55 Se generaron células de Langerhans (LC) *in vitro* a partir de monocitos humanos aislados de sacos Buffy–Coat del Servicio Nacional de Sangre Francés (*Etablissement Français du Sang (EFS) Pyrénées Méditerranée*):

aislamiento en un gradiente Ficoll (medio de separación de linfocitos, densidad 1,077 g/ml) y purificación por inmunoselección magnética (Miltenyi Biotec); la diferenciación de LC se llevó a cabo durante 6 días en presencia de un cóctel de citocinas (GM-CSF/IL-4/TGF β). Las LC distribuidas en placas de 24 receptáculos en medio de cultivo RPMI-5% FCS se incubaron durante 24 horas con extracto ES0.

Las moléculas de superficie se analizan por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) con triple o cuádruple tinción: CD1a/CD54/CD80/CD83/CD86/Fc ϵ RI; las citocinas secretadas en los sobrenadantes de cultivo se analizan con la matriz de perlas de citometría (cat. no. 550749, BD) en citometría de flujo: IL-6, IL-8, TNF, IL-4, IL-10, IL-12.

3.1. Inducción de citocinas clave para la polarización Th1.

El extracto E0 induce, con un efecto dependiente de la dosis, la expresión de citocinas IL-10 e IL-12 por células de Langerhans (Figura 4). Estas citocinas favorecen la inducción de la polaridad TH1 de linfocitos T sin tratamiento previo.

3.2. Maduración de células de Langerhans e inhibición del receptor IgE (Fc ϵ RI).

El extracto E0 induce la maduración de células de Langerhans observada por la inducción dependiente de la dosis de moléculas de superficie CD80, CD86, CD83 y CD54 (Figura 5). De manera similar, el extracto E0 inhibe la expresión de receptores IgE (Fc ϵ RI) de acuerdo con un efecto dependiente de la dosis (Figura 6).

3.3. Activación de receptores de tipo Toll (TLR).

La actividad TLR de ES0 fue evaluada en TLR2, TLR4 y TLR5 usando el modelo de células HEK293 cotransfectadas por el gen para TLR2, TLR4 o TLR5 y por el gen indicador NF κ B-sAP (fosfatasa alcalina secretada). La unión de un ligando a su TLR conduce a la activación del factor de transcripción NF κ B; el gen sAP se coloca bajo el control de un promotor que puede ser inducido por NF κ B. Este gen indicador hace posible controlar la señalización celular mediante TLR: la liberación de sAP inducida por ES0 y medida por el ensayo colorimétrico hace posible determinar la actividad de este principio activo como un agonista de TLR2, TLR4 o TLR5.

El estudio se llevó a cabo en las siguientes estirpes celulares de riñón embrionario humano (HEK293):

- células HEK-Blue™-2 para TLR2,
- células HEK-Blue™-4 para TLR4,
- células HEK-Blue™-5 para TLR5.

Estas estirpes celulares se mantuvieron en medio de cultivo HEK-Blue™ Selection 10% FCS y a continuación se distribuyeron en placas de 96 receptáculos en medio de detección HEK-Blue™, en presencia de ES0 durante 18 horas. Las placas se leyeron usando calorimetría a 620 nm.

3.3.1. Activación de TLR2.

El extracto ES0 induce la activación de TLR2 de acuerdo con un efecto dependiente de la dosis, con una actividad máxima a 100 ng/ml (Figura 7).

3.3.2. Activación de TLR4.

El extracto ES0 induce la activación de TLR4 con una actividad máxima a 10 ng/ml (Figura 8).

3.3.3. Activación de TLR5.

El extracto ES0 induce la activación de TLR5 de una manera dependiente de la dosis. Esta actividad es inhibida en presencia de anticuerpo anti-TLR5, lo que demuestra la especificidad de activación del extracto ES0 sobre TLR5 (Figura 9).

3.4. Inhibición del receptor 2 activado por proteasa (PAR2).

La inhibición de receptores activados por proteasa por el extracto ES0 es evaluada en queratinocitos humanos a partir de una estirpe celular (HaCaT) mediante la medición de la afluencia de calcio intracelular inducida después de la estimulación específica de PAR2 con la enzima triptica del estrato córneo (SCTE). Se usa la sonda fluorescente Fluo-4/AM: su forma esterificada facilita su penetración por la difusión pasiva en la célula; solo la forma desesterificada ligada a iones de calcio es excitable bajo 485 nm de fluorescencia, y emite a 535 nm.

La sonda fluorescente es incorporada durante 30 minutos en células inoculadas en placas de 96 pocillos, y a continuación el extracto ES0 es incubado durante 30 minutos. Se mide el flujo de calcio pocillo por pocillo en tiempo real de acuerdo con la cinética, antes y después de la inyección de SCTE. Las placas se leen usando un lector Mithras LB940™ (Berthold Technologies®).

5 El extracto ES0 inhibe de manera dependiente de la dosis la activación de PAR2 inducida por SCTE humana (Figura 10).

3.5. Modulación de blancos de dermatitis atópica en queratinocitos.

10 El estudio se llevó a cabo en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK, medio de cultivo K-SFM) en el contexto de la inducción de un fenotipo de dermatitis atópica. La actividad de ES0 se estudió en queratinocitos que exhibían un fenotipo de dermatitis atópica tras la estimulación durante 24 horas con Poly I: C + IL-4 + IL-13 + TNF-α, y se analizó por medio de una serie de PCR [reacción en cadena de la polimerasa] sobre la expresión de un panel de 32 genes seleccionados.

15 Sobre los queratinocitos, el extracto ES0 inhibió, con un efecto dependiente de la dosis, 15 dianas entre los mediadores involucrados en la patología de dermatitis atópica, como puede apreciarse claramente en la tabla 7 a continuación (los resultados indican, para cada gen blanco, el porcentaje de inhibición obtenido).

20 **Tabla 7**

		ES0			Dexametasona
		10 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	2 µM
Citocinas	TSLP	56%	75%	92%	91%
	IL-1α	35%	46%	59%	54%
	IL-18	27%	44%	65%	44%
	IFN-β1	66%	82%	90%	49%
Quimiocina	IL-8	37%	55%	88%	75%
	MIP-1α	10%	43%	75%	76%
	RANTES	15%	44%	65%	12%
	MCP-3	43%	63%	88%	Pro 20%
	TARC	58%	64%	39%	Pro 20%
	MIP-3α	41%	61%	80%	40%
	MDC	16%	44%	58%	45%
	Quimiocina de piel	28%	32%	39%	59%
Receptores	IL-4-R	30%	45%	69%	75%
	RARRES3	30%	47%	63%	28%
	TLR3	22%	50%	60%	pro 29%

25 3.6. Inducción de péptidos antimicrobianos.

La actividad del extracto ES0 sobre la expresión de proteínas y péptidos antimicrobianos se estudió en la estirpe celular de queratinocitos HaCaT: después de 3 horas de tratamiento en presencia de ES0, las células se recuperaron para el análisis de la expresión de blancos antimicrobianos mediante la RT-PCR [reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real] cuantitativa; se extrajo el ARN total y se somete a ensayo; tras la transcripción inversa del ARNm en ADNc, se llevó a cabo la etapa de amplificación de PCR cuantitativa en placas de 96 pocillos, en un sistema de PCR cuantitativa iCycler (Bio-Rad). Los resultados obtenidos se expresaron como la cantidad relativa (CR) de ARNm tras el tratamiento por ES0 en relación con el control, sin el principio activo. Se usó IL-1β de forma paralela como inductor positivo de referencia de la expresión de péptidos antimicrobianos. La expresión del gen de interés se consideró regulada cuando RQ≥2 (inducción) o RQ≤0,5 (inhibición).

El extracto ES0 induce la expresión de proteínas y péptidos antimicrobianos hBD2, hBD3, S1007A, LL37, PI3, RNasa 7 y NOD2 (Figura 11).

40 **Ejemplo 4: Formulación de una crema para “el cuerpo y el rostro” que comprende el extracto bacteriano ES0.**

Extracto ES0:	0,1–5%
Aceite de onagra:	1–3%
Glicina:	0,1–0.4%
Ceramidas:	0,1–0.3%
Humectantes:	5–20%

ES 2 689 138 T3

Emulsionante: 2-7%
Triglicéridos cápricos/caprílicos: 1-10%
Conservantes
Agua c. s. p. 100%

Ejemplo 5: Formulación de un gel de limpieza para “el cuerpo y el rostro” que comprende el extracto bacteriano ES0.

Extracto ES0: 0,1-5%
Aceite de onagra: 0,5-2%
Glicina: 0,1-0.4%
Ceramidas: 0,1-0.4%
Tensioactivo: 10-20% en materia activa
Humectantes: 5-15%
Conservantes
Agua c. s. p. 100%

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE
 UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

5 <120> Nueva bacteria y extractos de dicha bacteria y su utilización en dermatología

<130> D29306

<150> FR 1061081

<151> 2010-12-22

<160> 2

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1487

<212> ADN

<213> artificial

15 <220>

<223> Nuevas bacterias LMB64, que pertenecen a la clase de betaproteobacterias, de agua subterránea

<400> 1

agtttgatca tggctcagat tgaacgcggg cggcatgctt tacacatgca agtcgaacgg	60
cagcacgggc ttcggcctgg tggcgagtgg cgaacgggtg agtaatgctg cggaacgcgc	120
cgagtagtgg gggataacgc agcgaagct gtgctaatac cgcatacgtg ctgaggtaga	180
aagtggggga ccttcgggcc tcacgctatt cgagcggccg acgtctgatt agctagttag	240
tggggtaaag gcccaccaag ggcgacgatca gtagcgggtc tgagaggatg atccgccaca	300
ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat tttggacaat	360
gggcgcaagc ctgatccagc catgccgcgt gtctgaagaa ggccttcggg ttgtaaagga	420
cttttgccg ggagcaaagc ctgcttgta ataccgagtg gggatgagag taccggaaga	480
ataagcaccg gctaactacg tgccagcagc cgcggaata cgtagggtgc aagcgtaat	540
cggaattact gggcgtaaag cgtgcgcagg cggttgtgca agtctgatgt gaaagccccg	600
ggctcaacct gggaacggca ttgggactg cacggctaga gtgcgtcaga ggggggtaga	660
attccacgtg tagcagtgaa atgctgtag atgtggagga ataccgatgg cgaaggcagc	720
cccctgggat gacactgacg ctcatgcagc aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac	780
cctggtagtc cacgccctaa acgatgtcaa ttagctgttg ggggttgaa tccttgtag	840
cgaagctaac gcgtgaaatt gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaag	900
gaattgacgg ggaccgcac aagcgggtga tgatgtggat taattcgatg caacgcgaaa	960
aaccttacct gctcttgaca tgtaccgaag cctgaagaga tttgggtgtg cccgaaaggg	1020
agcggtaaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag	1080

ES 2 689 138 T3

tcccgcaacg agcgcgaaccc ttgtcattag ttgccatcat ttggttgggc actcctaatga 1140
gactgccggg gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcctcat ggcccttatg 1200
agcagggctt cacacgtcat acaatggtcg gtacagaggg tcgccaagcc gcgaggtgga 1260
gccaatctca gaaagccgat cgtagtccgg atcgactct gcaactcgag tgcgtgaagt 1320
cggaatcgct agtaatcgca gatcagcatg ctgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtag 1380
acaccgcccg tcacaccatg ggagtggggg ataccagaag tgggtaggct aaccgcaagg 1440
gaggccgctt accacggtat gcttcatgac tggggtgaag tcgtaac 1487

<210> 2
<211> 10948
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Nuevas bacterias LMB64, que pertenecen a la clase de betaproteobacterias, de agua subterránea

<400> 2
gggcgagca ccatcgcca ggccaaaagc caccctgcc gattcggcgg cctgttgctc 60
gcgctcaatg cgctgcgctt ggtcgccaa gtcggcggct tgctgctcgg ccttgcccgc 120
caggggtgca cgctcgcggg tcagttccgc cacctgctcg gctagggcat cgcgctcggc 180
ctcgatcacc tcaccagcgg ccgccagctc ggcggttcg ctctgcgctt ggaccaagcg 240
gccctcgacc tcggcgcggg cctgggcggc tgcgcgctcg atctcgcgcg caatggcggc 300
ggtcaatgcc tggggcagtt ccggcgagc agcagcggcc accggccggg cctctcgcca 360
ggcagtaga tgcttgtaga cggattcgg gctgcccgtg cccaaacgct cgcgcatcgc 420
gcgcatagtc ggtgctgctc cttcgccgac cagcgcacca gcggcgcgcg cgaacgggtg 480
gcccgtgcag aggcccgcgt cgagcagatc gagcagcagg ccgccaaggc ggcacaggcc 540
cacgaagaag cccgcgcccg cgccacgcag gaagcccggc aagtgcaagc cgaacgcgac 600
gaagcccgca aggtggccgc cgagggcgcg gagcagaccg cgcgcctggc tgggcaactc 660
gaagccctca ccgcaagga gcgaaaagcc gatgaaagac cgtgaccaca acgaagcgat 720
ggccggcatg tttcaggccg acccccgatt tgccgcccgc tatctgcgcc aggtgttggc 780
cgatggcgag cctaccgacg tgcgcgccgg cttgcggcaa atggcggatg tgctgcgctg 840
cagtcaggcc gccgcgccga ccgattctgc gccttcggcg ggctctttg accgggcccg 900
cgtgcgctac gaagtggcgt gcgatgtgat cggggcgctt attgcccatt acgccgaaat 960
catgggacgg gaacgcgagc aggcgcagcc gaatgaggcg gttttgcgcg tggccggagc 1020
catgaaggcg gcgctggccc gggagcggga tgatctcgat ccgcgcgata gcgccggcat 1080
10 cgagggcgcg atttcgctct atgcgccact ggcgcgccgg ctgtatggcc aggctgaaaa 1140

ES 2 689 138 T3

cgaccacgcc cgccaggaac agcgtcgcgc cgatttcgac caggtgcatg cttcgtggc 1200
 cttggagggg ctggccatga gcgcggacga tttggcggtt caggcgctgc tgatccggg 1260
 cgacattacc cacgatgagg cggtgacagt ctaccgcatc ctgcatcgcc atgcgcggta 1320
 aaaccgactg gccgcccag gtggccggtg tgctgggttt gctcgaatcg cagccgccag 1380
 aggcggcgat gctggtgggc tgttttctgg cggcggtagc ccatcccgat catgcggccg 1440
 aattggcgat gttcgacaaa ttgccgccag cggcccggat ggtcgtcggg cgatttttcc 1500
 tcgtttttct ggccggcggc ctggacgatg cggggcgcga aaaactgcat tcgcacatgc 1560
 aggcattggt tgtccgtcag cggcgttttc ggtgaatggc ttgcctcacc cactagggcc 1620
 gggcaagggg tgaacagcgg gcgatgctgg cttgcgggac gaccccgcac ccccgaaaa 1680
 cttgtcacac accacgcaac tcccgttgct tcgctaaaag ccttgtgccg caaggctttt 1740
 agcgaggcga caccgaagac acatcgcggc gacaccgaaa gggccgaacc ggcctaaaac 1800
 ccttgcctgc caaggagaac agccgcgctt tcgcgcgcga aagtgcctca aatgcctgac 1860
 ggcacacgca gggataggat cggcacgccg aaggcgttgg cgatgcgctc caggttgtcc 1920
 aaggagatgt ttctgacttg gcgctcgag tcgcgaacga aggtgcgatg taggccgcac 1980
 tcaaaggcga gcgcttcttg tgaccagcct ctttcccggc gtaatcggat catggtggcc 2040
 gcgagcacgg cccgcgcgga atgcgcgggt ggtgcgggag gttgagcggc gggagacatg 2100
 caaacagtc tctgatgatg ccgcttttac gtcagccgtg ttaagtac aatatggttt 2160
 tctcatagag aaagacggcg tgacgatggg cagaaaaaca gcaatcaggc gagggggtgc 2220
 cgtgttggcc agcctgttga tttgcgcaat tgaaccggtc ggcgcggcct ccctggtcgg 2280
 cgggtcaaacc gatgattccg tgtgcgacct gggcagcgcg ccacagaacg cccggaagct 2340
 gtcggcagcg ggcgacttca tccgcgcgca gtgcaaaaaa ggtcaaatgt tgggtgggtc 2400
 cggcatcgtg cctgccggcg ggtttgactc ggaagtggg cgctggcgc gcacctctg 2460
 ccgatggcg gacattcaga ctgcgcgcac gcagggcaac atggccggcc tcgtcatgga 2520
 gatcgacgag gtacgggtgca tcatcgggaa gttgccgaca tgagaaaagc gatggtggct 2580
 ggctttctgg ccggttgggt ggccaacgtg gttgccgctg agggcgggtc gcccttgcgc 2640
 ggcggtggtt gcacgcgacc gttccgtggc gctgattccg tcgtgactg cgagcacatc 2700
 ggcaaggtga cgatccgcca gattacgaa aaggccttc ggtcgttca catgcaggac 2760
 gacaagaaca cagccagcta cgttgtgctg gttatcagg agcagggcgc atgagggcga 2820
 aagcgtggcg gatgctgttt gccggcggc gctgggtgct ctggcttccc gtgccggcgt 2880
 cggtatggct ggcactgccc gaatggcagc acattcccgc catggtgttg ggcggcctga 2940
 tcgtgtggat tcccttctgg ctgcgctggt ggctcagtga tggcttcgcg ggcattgtca 3000

ES 2 689 138 T3

ggtggccagc aaccggcgca cctgcggtat ctggcggggt gaacccgcac accggcaagc 3060
 catgcacggt gtatcaccag ccgtggggag ataccttcgt gggaggagac tgattatttg 3120
 attgaggaac gatgacaagg gccagcaaca agctggccct tgtcgttttc tggactgttt 3180
 taccacaac atccgctctg ctgctgaatt ggcggacatg gcaccgagcc gaacgaacag 3240
 aacacgcagc aatcccccg cttggggcgc agcagcgtat ggcaggccgg gcaactcgtag 3300
 tagaactggc aggcgtccgt gggcatgggt tcctgctgtg cgtggccgca gtgcgggcag 3360
 gtcagcacgg attcagagaat gacggcgctc atcgtggcgt tacctctgca cggaggacgg 3420
 atagcctgcg ttcgctggtt ccgaggtcaa cgcttcgggc ttggccttgt cggcgtcata 3480
 ggtgacgggt gccgttttct tgtcgaatc gaccttgacg gcgctcacac cgggcacttt 3540
 ctccagcgac ttcttgactg tgatcgggca tagctcgcag gtcatttctt gaacggccag 3600
 cgtgacgggt ttcggggtgg cggccagcac ggcgagcggc acggcagcca gcagagcaat 3660
 cagcagtttg cgcattgggag tctcctttca atagaacagc ggggcgaacc acggcacggc 3720
 caacagggca agcaacagca cagtgcagat ccagaacgtc aggcgctgcc gctggcgtgt 3780
 gcgcggatca gcgcatggcg tgccggcgtg gcagacctgc ggcaccagat agagcttgcg 3840
 gaaggccagt ccgagaaaga gcagcgtcat gccgatgaaa aagggccggg acggctccat 3900
 cgcggtcagg ctgccaaacc atgagccacc aatgccaaagc accagcagga caagcggccc 3960
 gacacagcac accgacgcgc cgatggcggg cagtacgctc acgatcaacg agcttttttc 4020
 agtgagtcgt gccatgtcgc tttccttgta cctgtttgcc caagtgttac tctaaatccc 4080
 gtacctaagt acggagtcaa ggggggtgta tgggaacaga actgaccatc ggcaagctgg 4140
 ctgacgctgc cggggtgaat atcgagacga ttcgctacta ccagcggcgc ggctgctgg 4200
 atgagccgcc taaaccgcca ggggggcacg ggcgctatgc gcctgagcag gcaaaacgtg 4260
 tgcgatttat caagcgggca caggcgttg gtttcacgct ggacgaggtg ggcgcgtac 4320
 tgaccctgga tgcggcctgc gcctgcggtg agacgcgagc gctggctgtg cgcgaagctgg 4380
 gtctgatcga gcagaagatg gctgacctcg cggccatgcy gcaggcgtg ggtggattgg 4440
 tgcagcagtg tgatcggggc gacgggtggag ccagctgtcc catcatcgac gtgctggcag 4500
 gtaattagat gtgttcaaaa aatggtggtt ttctggacac atgccggtt gccctgtcct 4560
 gagttgtcct gatgcgttaa agtggtcatt tattcgttca gctttcaatg tggcggaaact 4620
 gttcatgaat caacgcatcg gctatgcccg cgtttcgacc gacgaccaa acctagacct 4680
 gcaacgggac gcaactccggc aggcgtgatg ctcaaccatt tacgaggaag cagccagcgg 4740
 aaagagcgca gcaaggcccg agcttgagca gtgtcgggag gctctccggc ccggcgacac 4800
 gcttggtggt tggcggcttg atcgcttg ggcgagcctg ccgacctgg tgcagatcgt 4860
 ggctgatcct gaacagcgcg gcgtgcattt cgagagcctg accgagaaga tcgagacggg 4920

ES 2 689 138 T3

gagcgcagcg ggtaagctgc aattccatgt tttcgtgca ctgcgagtg tcgagcgcgg 4980
cctgatccgg gagcgaaccc gggcagggct ggatgcagct cgcgccctg gccgatccgg 5040
tggacgcaaa ccgaagctgg acgccaagca gatacgccac attaaggcgc tactacgtga 5100
cccgaatacc tgtgttgctg aactcgcccg tgactacggc gtgtcgagaa caactatcta 5160
taaactactgc ggtgtggttc tgccgcgtac agccgatgaa ggggcaatat gacaaaaaag 5220
acaacagcat tcgatgtatt cgagaaatgc gtccaagcag ttcaggctgg tgaactgatc 5280
gaatccgttt ctgcgaagga caaggaattc catttccaga actggtttca gaagcgcctc 5340
cagagcctgt cgatgcactt cgaggggtcg ggtcgcaaca cctaccgga cttctgcttg 5400
gtagagcaca ccgagggcta cgagatcaag ggtttggcat ggcctggccg cgagcgcgac 5460
tacgactcga acagccaagt gccgactggc tatcacaacg gccgtcaaat cttctactgtg 5520
ttcgggcgct accccgcaga cctgtctggc tatgccgatc agggcaacgg ccgcaggcag 5580
taccgggtgg ttgacctcgt ggtctgccac ggcgacttcc tcaacgccga tcacaactac 5640
gtccataaga acaagagcgt aaagggcttt ggcacctacg gcgacatcat gatccgcgac 5700
cggaagatgt acgtcgcgcc gacgccattt cgcgtgaccg aaggcaccac tggcctgatg 5760
actttgatcc tgccggagaa cttcggcacc gatgaccgtt accaggtggt cggtaacctc 5820
actcgcgtcg aggcggaaac gctggtggtt ggctacaact ttgacctgcg cacgaacgag 5880
ctgagcgcag agcgcgtgcc caatcccaac gcaggcacc agcaccgatt cgtggcctac 5940
cggctcaagg atcaagcgag caagcctgtc tccatgactg gcacccaggt gcagcccgac 6000
gagaacaacc tgccggacga cgaatgaaca ccatcaccga caagatcggg ttcgcttacc 6060
cggttgcagc gaccgcgctg gagtgcgact tcccgtggt cgaatcagc cagatcgccg 6120
agcaggaaaag ttggcgaaaag gagatcaaca ggccgatcta ccacatccac aagtggggg 6180
cgaccagact tgggtcggtg tttcgtggca ttacccttgg tgctttgagt cagcctggta 6240
ctgacctctg ggcgcagttc taaaaaacgc acgacctggc cggtaaggta gtgctcgatc 6300
ccttcatggg cagtggcacg acgcttggcg aggccgtcaa gctgggtgcc aaggccatcg 6360
gctgcgacat caaccagtc agtaccttcc tcgtacgtca ggcgttcacg ccggcgtccg 6420
aggcagagct gcgtgccgct ttcgagcggc tggaaactga cgtggcaccg gagattcggc 6480
gctactacca gacgcgcgat cctaagacgg gcgagctgat tcaggtcttg tactacttct 6540
gggtcaagac ggtgacgacg cccgagggcg aggtaatccc cttgctgtcg cgctacgtgt 6600
tttcacaaga cgctaccgg aagaagaagc cgcgagcga gatcgtgtgc cctggctgct 6660
ggagtgtgct ggaggatcgc tacgatgcca ctgacctgca ctgccagcac tgccggccacc 6720
agttcaatcc gcaggaaggc ccggccgctg gtcagtagt caaaaccaag ggcggtcacc 6780

ES 2 689 138 T3

gttaccgcat caaggaacta ctgccaaagg acggtacgcc gccctctcat cgaatgtacg 6840
 cgatgatggc cttgcgagcg gatggatcga aggtctatct gccggtgcgg aatgaggact 6900
 tggccctcta cgaggaagcc caagaacgcc ttgctacaga ggcaactgcc ctgccgaaaa 6960
 cctctgttcg acctggccac aacaccgacc aggcgcgcgg ctacaactac acccaatggc 7020
 gcgacttctt caatgcgcgc caactgctgt gccttggcct gctgctgcgg gaaatcctga 7080
 ccatcgacga cctggcagtg caagagcaga tgctgtgctt gttctccagc accttgagt 7140
 tcaacaacct gttttgcagc ttcaagggtg agggaacagg ggccgtgcgg catatgttct 7200
 cgaaccacat cctcaagcca gagcgcaccc cgctggagaa ctccgtgtgg ggcaactggca 7260
 agagcagcgg tacgtttagc acgtttgttc agtctcgcct gctacgtgcg aagcgtacc 7320
 tcgatgagcc gttcgagatc gcgttcgagc atgaccagga cggtaaccgc gcaggctcgc 7380
 gcaagacggt ggctagccat ccgatccgcg cccgtcgcgt cgaaacctgg ccggaattgg 7440
 aggcgcgaga tcatggcctg ctgatcctca acggtgacag ctcgaagctg ccggtgcccg 7500
 ctggttcggt ggatgcctg gtgactgatc cgccctactt cgacttcgtt cactactcgg 7560
 agttgagcga cttctttttt gcttggtcga ccctgtgct gcgccagcgc tatccgtgga 7620
 tggcccgca ggaactcgtc gaccaagggg aggtgcagca caaagacct cgtgtgttcg 7680
 cccgtcagct tgcgtcggtg ttcacggagg cgtgccgcgt gcttaaggac gatggagtgt 7740
 tggcgttcag cttccaccac tcgctgccg agggctgggc ggccatctat gaagcgatca 7800
 acaaggcggg cctggccgta gttgcggctc accctgtcca tgccgagctg cgcgcggcaa 7860
 gtcccaagac tgcggcctaa gaccgatca gccttgatgc gattctggtg tgtcgcaaaa 7920
 aggcgtttgc cctgcaccag tcgcctgcta tccaggatgt ccgccaggct gttgatgcgc 7980
 tggcatcacg gctgcaagct gctggccttc gcatctcggc gggtgaccgc ttcgtgatcg 8040
 gcgcagcgca aaccttgatt gcacgcgctg ctgatgacat gggcttcgac gagatcaagg 8100
 ttgatcttga ggcaattcgg ctggccgtgg ggccaagggc tgcaacatca aaggctgcga 8160
 gtgcgtggga tgacgatgtg cccttctgat tggctgcacg gccttgtcgg cgcgatgcgtt 8220
 ttgatggcag ccgctgcacg caagcccgct ccctccgct aaagttcatt tatacgcaaa 8280
 tacgtatttg cgtgatacaa taacgccata ttaatggagg tgcgtaaatg cggactattg 8340
 ttgtggctag ccaaaaaggt ggcgtcgga agacaacgat tgcaggtcac ttgggtgtca 8400
 tggccgagca gagcaagag gggccagtgg cgctgatcga cacagacca caaggctcgc 8460
 tcgctcctg gtggaatgag cgaaccaatg aggcaccgct gtttgcacgg gtggaaatcg 8520
 gcaagctgac cgagcacctt caggcattgt ccaagggtgg catcaagctg gccatcatcg 8580
 acaccccgcc ctctgttacg gaaatgattc agcaggtgct ccgcaccgcc gaettggtac 8640
 tgateccac cagcccgagt ccgatgact tgcgcgcggt cggatctacc gtcgaactgg 8700

ES 2 689 138 T3

tggagaacgc aggcaagcga atgatcttcg tcatcaatgg ggcggcacct cgcgcgcgga	8760
tcgcgggtga ggctgccgtg gcgctttcgc agcatggcac ggttgcccc gtgacgctgt	8820
accagcgcac cgacttcgcc agctcgatga tcgacggccg caccgtccag gaaatcgacc	8880
ccaaggggcg gtcggccgaa gaaatcgggc agttgtggaa atacgtatct acacaactgc	8940
gtaaaatttg atataatacg tacatgcgta ttaatggaga tacgtaaag gctaaaactg	9000
catctttgac tgccggcctg gtggccaaga aaggggaggc gtcccctgct acggttgcg	9060
cggcacccca ggttcaacct atcgaagtga aggcacggc gactggcggc ggccgggatt	9120
actacaaggc gttgaccgtc aagtggatc gtgaccgcta cgagagtctg aaaagcatgg	9180
gcgtgaagct ggacaagaag agccaggaaa tctttgtcga ggccctggat ttgtggatga	9240
agtcggccgc tggccagcaa cacgcctaag aggccctat gcgttcagtg cgctctgccg	9300
tcgaaactgc caaggagtg gccgaaaaag ccaaggcccg ccgcctagcg gcggaaaaga	9360
acgagctggg acttgaagc ccggcgcagg gcaacgccgg caccactccc agcccggtga	9420
aggttgcggc cgaagtggg ggcgagcagc cggcacgacg caagggagcg ccgaaagggc	9480
cgcgtggcct gatgccgtg catcatccaa accgcgattt cttcttgcg gatctgtttg	9540
actacgccct aaaggatgac ggctgagca tggaggcccc catcttcacc ttggcaacca	9600
ggccggacac ctctgtttg cattgggaaa gcaaggatg gacacgcgcc atcacctca	9660
cgccaagcgt gaaggggag gccacgcagt ttgataagga tttacttatt tacgtagtta	9720
gccagatgac cgaggctatc aatcgcggtc ggcctgatg gaacaatcga accgtgcgct	9780
ttcgcgtcta tgactactg gtctcaacca acaagccgac tggcggcaag gagtaccagc	9840
gactggagga tgccctagac aggtgcggg gtacatcgat caagacgaac atcaagcgg	9900
gtggccagcg tgtgaagaa ggcttcggca tcgctgatag ctggacgatc atcgagaag	9960
ccccgacga tgaccgatg attgccgtc aggtcacgct ctccaagtgg cttttcaatg	10020
cagtgcaggc ccacgaggt ctgaccatca acccggacta tttccggctg cgtaagccaa	10080
ttgagcggc tttgtacgag ctggccagga agcactgtg cgaccaggcc tttttgtga	10140
ttgggctgga actggttcag gacaagtgc gcagcaagtc ggactgttc gagttccgcc	10200
gtgccttgcg cgagatcadc aagccgaca ccttgccaga ctaccgatg acgcttgatg	10260
acgagaaaga ccaggtgatt ttctacacc gcgacacgaa gaagctagcg gcgtctaccg	10320
ctctggccc gcgcttcag tgacgccaa agtattgacg gtcaatactt cgttatttca	10380
cccatgcggg gttaccgctg cgtgttgac gttccctga cctagcggcc gaggcagggc	10440
tttcgcgctt tgcaattgag caccaagtgc gtctcgtcc ttcgagcadc aagccctaac	10500
gcgtttcatg tcactttcgc gcacgaaagt cgaggcaaga ggcttgatc tgtctatcgt	10560

ES 2 689 138 T3

tacatcacc	atgcctgtg	atggacacg	tacatcacc	atgtttctg	tggatgggca	10620
cgttacatca	cccatacctc	acttcgttac	atcgcccatg	cagcgatttg	tggaagcctt	10680
gagcagcaag	gctttacgag	cgttatccac	agccgtaaca	cgcgcgcgcg	atTTTTAAC	10740
ttataaatc	tttaacgcg	ttgCGGACAA	agcccgcgcc	gcctcttggg	ggctacgccc	10800
ccgccggctc	ctacgggccc	caagcggccc	tccgcccgcg	cttcgcgctc	cctcccggca	10860
tccccgaggg	gtttcgcttc	gctgcacccc	tcgcgcttcg	cgctcacccg	catatcgagg	10920
cccccaaagg	gggccggatg	gtgcccc				10948

REIVINDICACIONES

1. Extracto bacteriano obtenido a partir de una suspensión de una bacteria Gram-negativa no patógena que pertenece a la clase de las *Betaproteobacteria*, subfamilia de las *Neisseriaceae*, incluyendo la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S de dicha bacteria la secuencia SEC ID nº 1; en el que dicho extracto está compuesto por proteínas de membrana, lipopolisacáridos, proteínas periplásmicas, fragmentos de proteína del flagelo y metabolitos primarios y secundarios producidos por la bacteria,
- 5
- caracterizado por que la bacteria incluye por lo menos un plásmido que comprende la secuencia SEC ID nº 2, o cualquier secuencia con una identidad de por lo menos 80% con dicha secuencia SEC ID nº 2,
- 10
- caracterizado además por que la bacteria es no filamentosa y
- en el que dicho extracto bacteriano incluye una fracción ES0 obtenible dejando el medio de cultivo de bacterias incubar y reaccionar en un medio básico (pH 9 a 11) durante aproximadamente 5 horas a una temperatura de 4°C, centrifugando y filtrando a 0,2 µm y obteniendo una solución de ES0 clara y en el que la bacteria se deposita en la CNCM el 8 de abril de 2010, con la referencia I-4290.
- 15
2. Extracto bacteriano según la reivindicación 1, caracterizado por que dichas proteínas de membrana consisten en porinas, OmpA, lipopolisacáridos y/o lipoproteínas.
- 20
3. Extracto bacteriano según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que incluye tres bandas principales que corresponden a los pesos moleculares comprendidos entre 30 kDa y 36 kDa, 41 kDa y 45 kDa, y 47 kDa y 51 kDa, respectivamente.
- 25
4. Extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su utilización en el tratamiento de trastornos inflamatorios dermatológicos.
5. Extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su utilización en el tratamiento de trastornos inflamatorios dermatológicos en el que los trastornos inflamatorios dermatológicos consisten en dermatitis atópica, prurito, eccema y soriasis.
- 30
6. Utilización de un extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición destinada a la activación de TLR2, TLR4 y TLR5.
- 35
7. Utilización de un extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición antagonista de PAR2.
8. Utilización de un extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición destinada a tratar los trastornos inflamatorios dermatológicos.
- 40
9. Composición que comprende, como un principio activo, por lo menos un extracto bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 45
10. Composición según la reivindicación 9, para la utilización en el tratamiento de los trastornos inflamatorios dermatológicos.
11. Composición para la utilización según la reivindicación 10, caracterizada por que dichos trastornos inflamatorios dermatológicos consisten en dermatitis atópica, prurito, eccema y soriasis.
- 50
12. Composición cosmética o dermatológica según cualquiera la reivindicación 9, caracterizada por que incluye además uno o más excipientes compatibles dermatológicamente típicos.

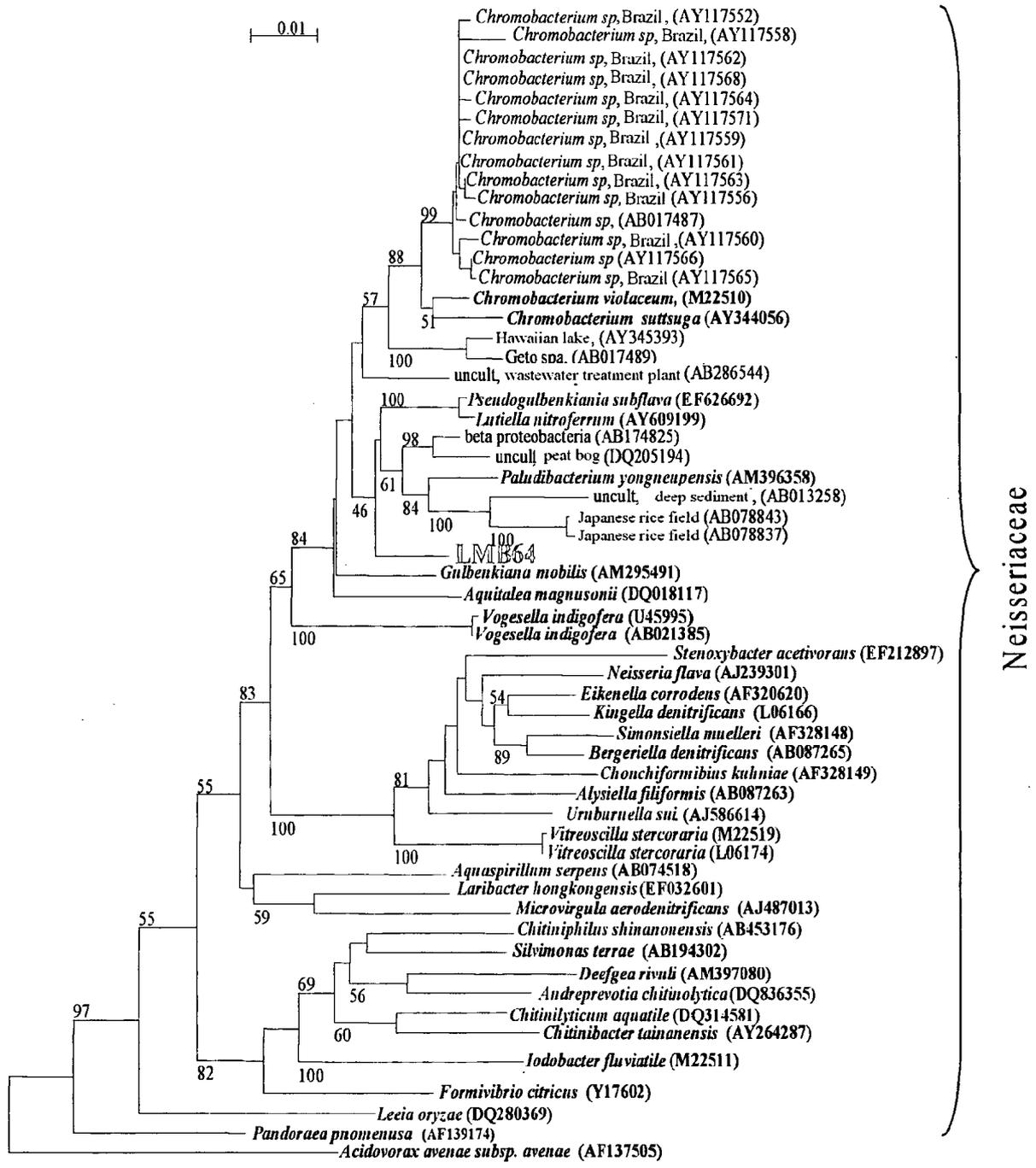


FIGURA 1

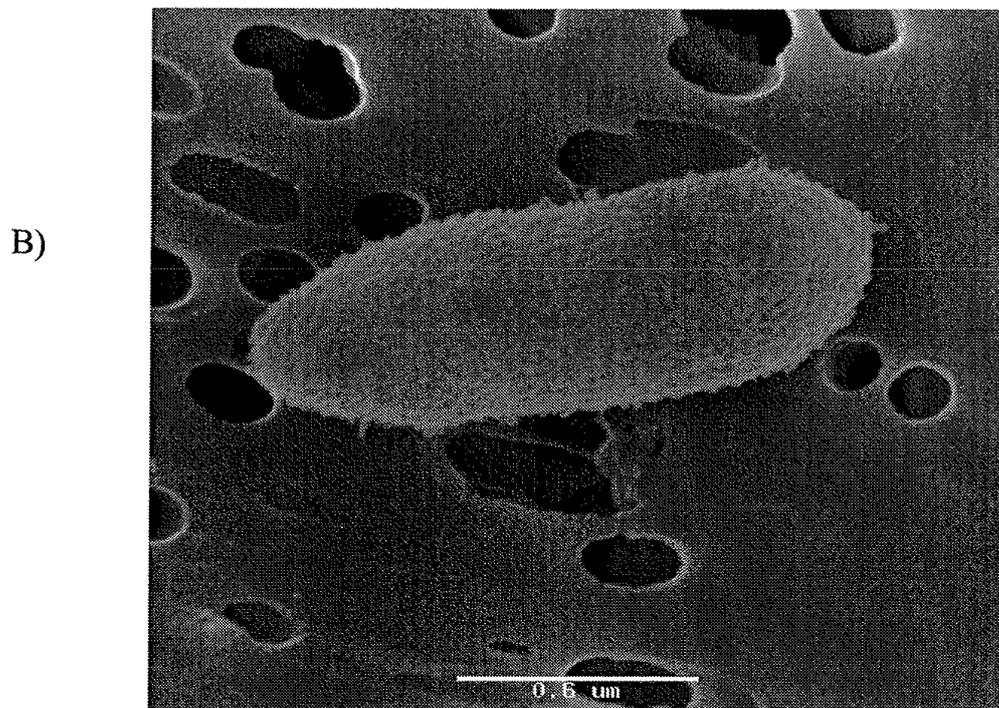
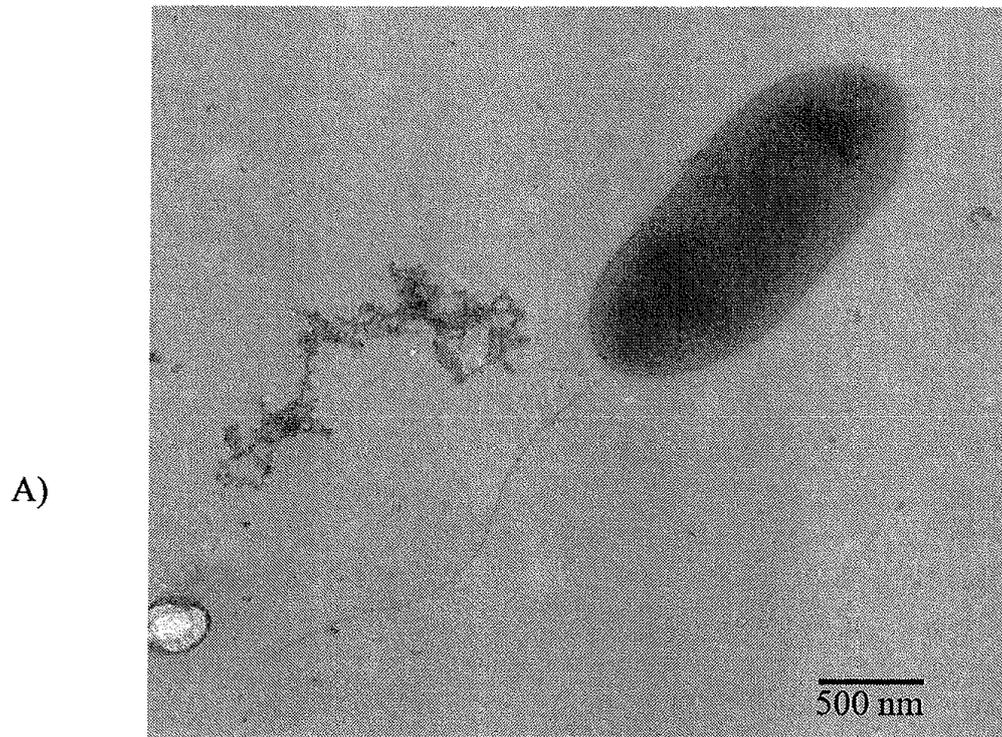


FIGURA 2

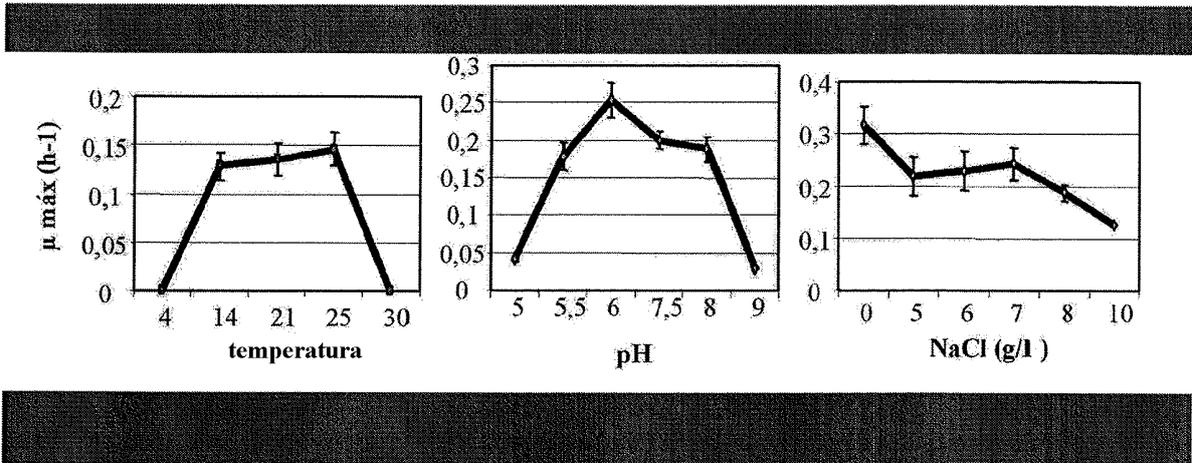


FIGURA 3

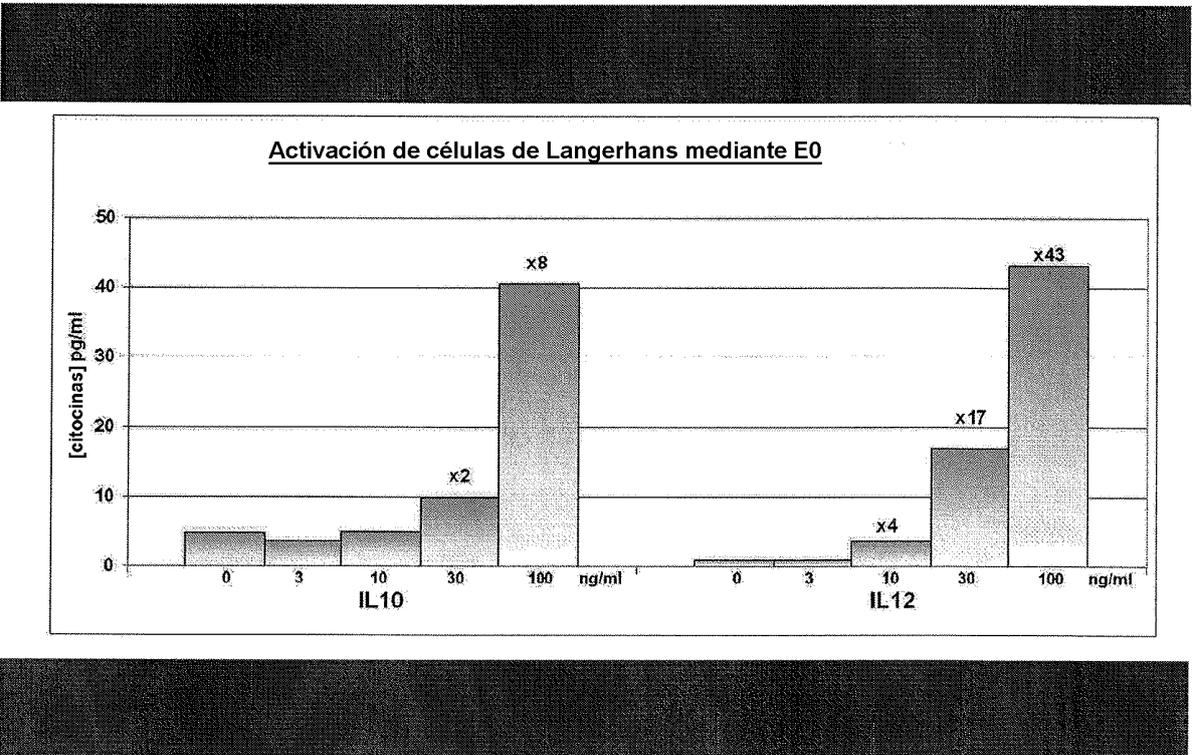


FIGURA 4

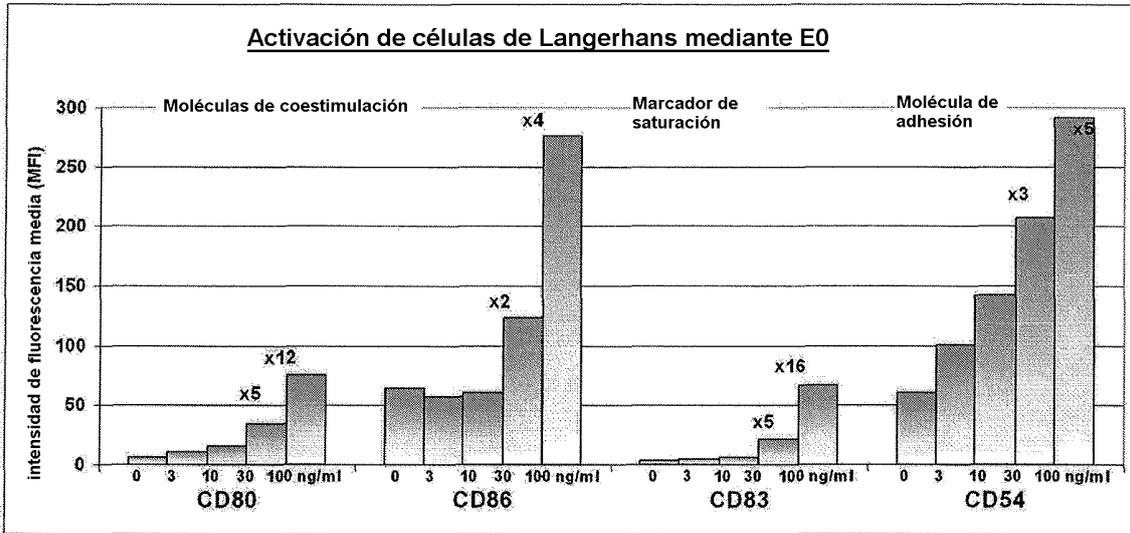


FIGURA 5

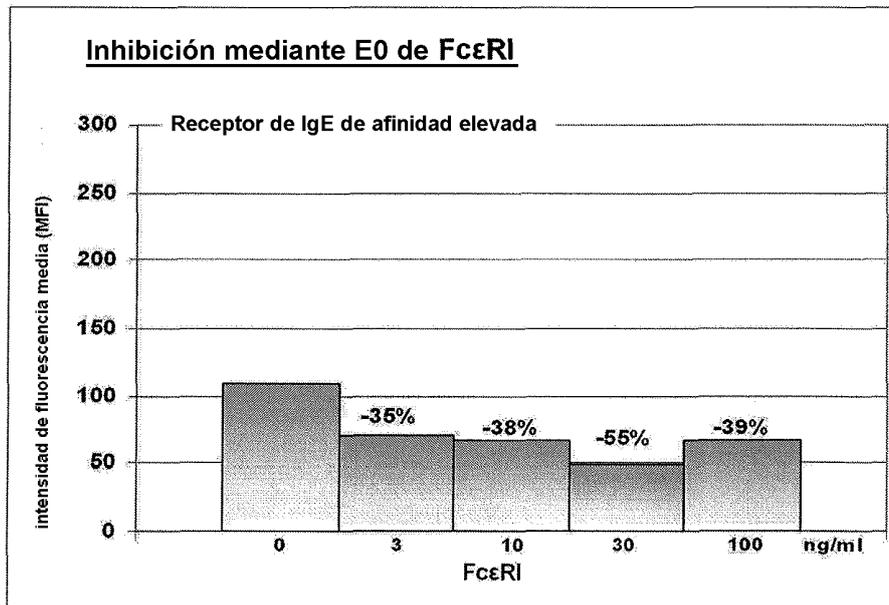


FIGURA 6

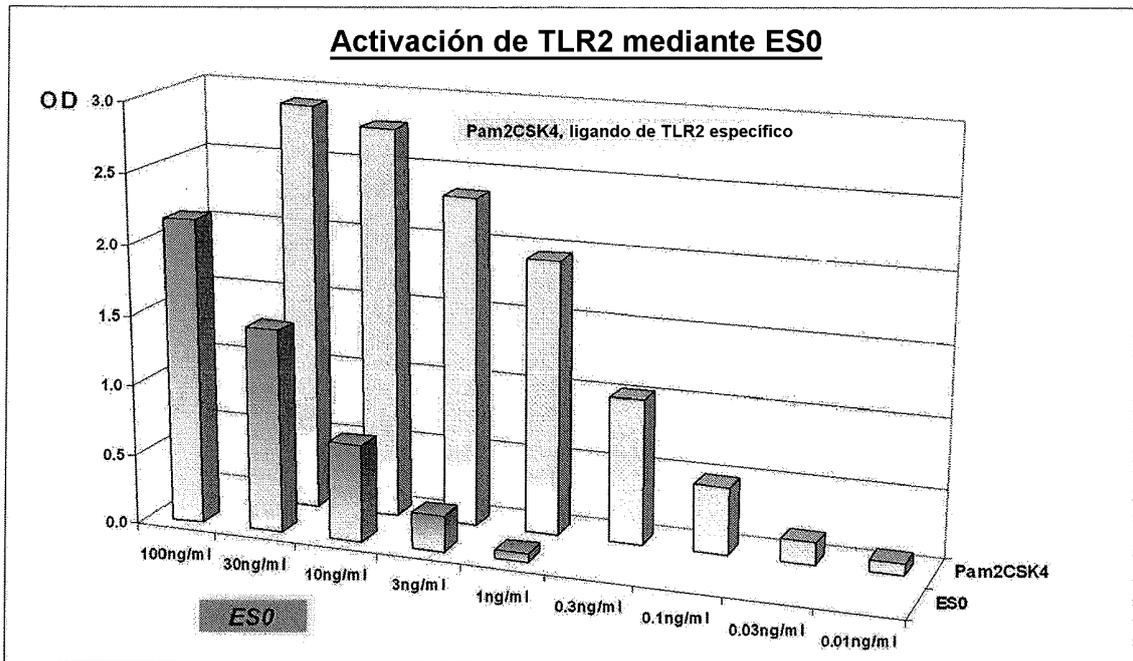


FIGURA 7

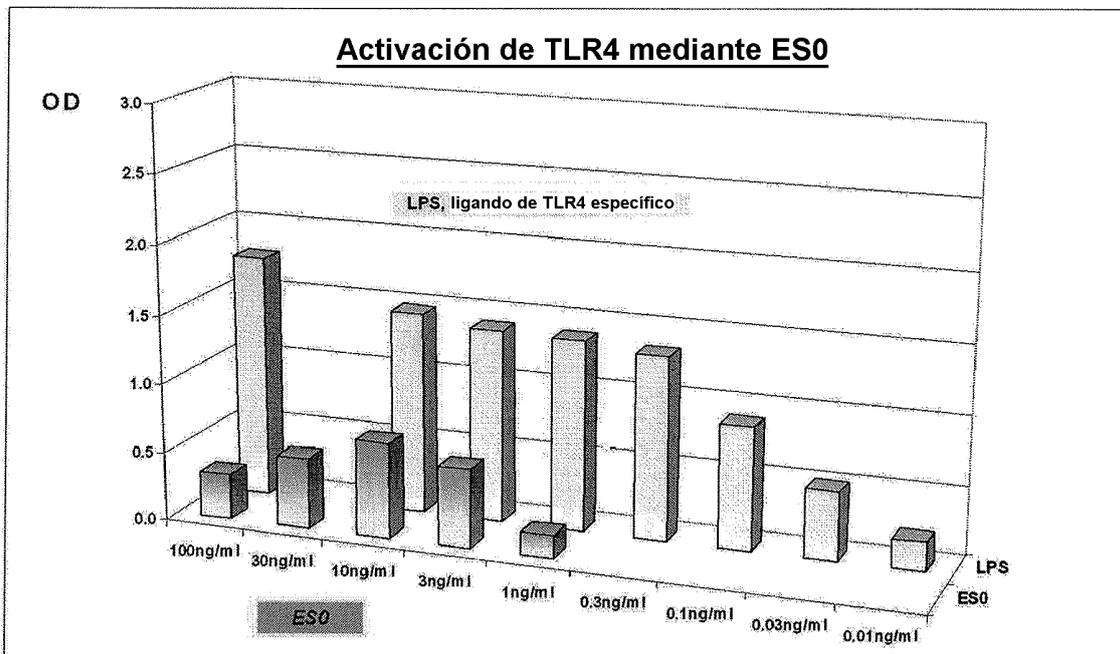


FIGURA 8

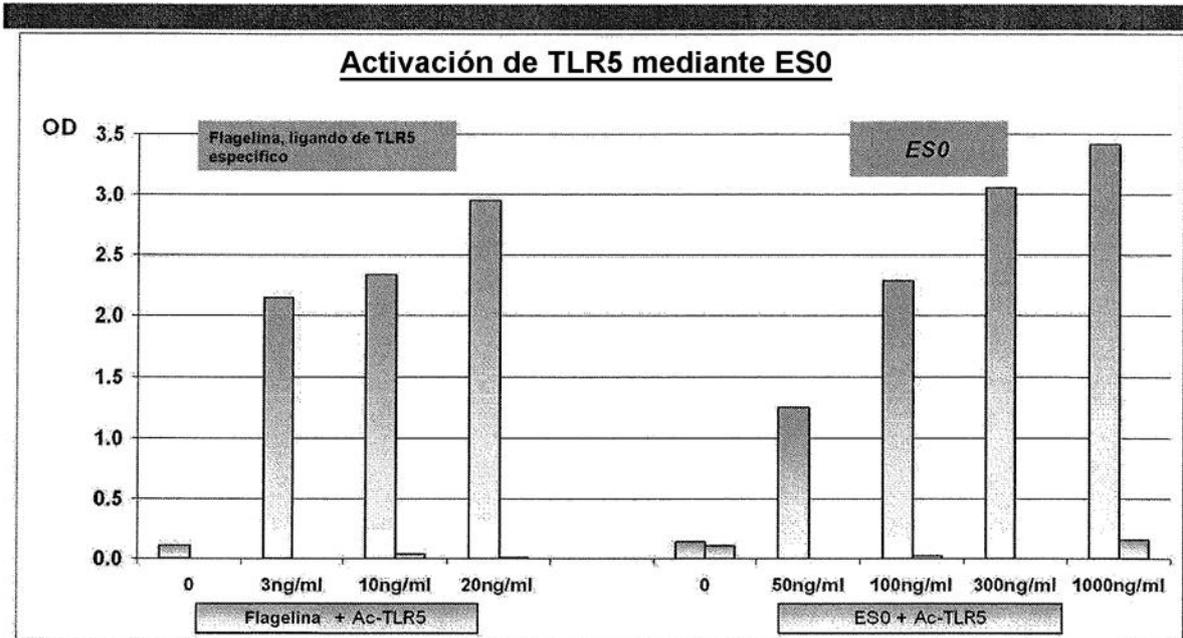


FIGURA 9

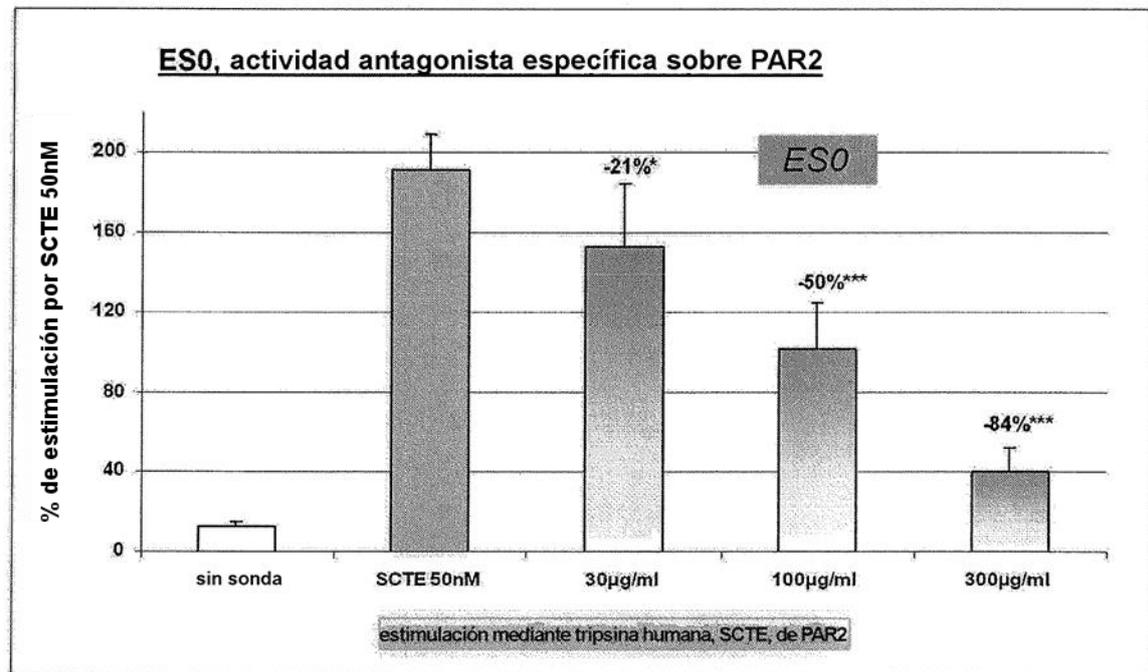


FIGURA 10

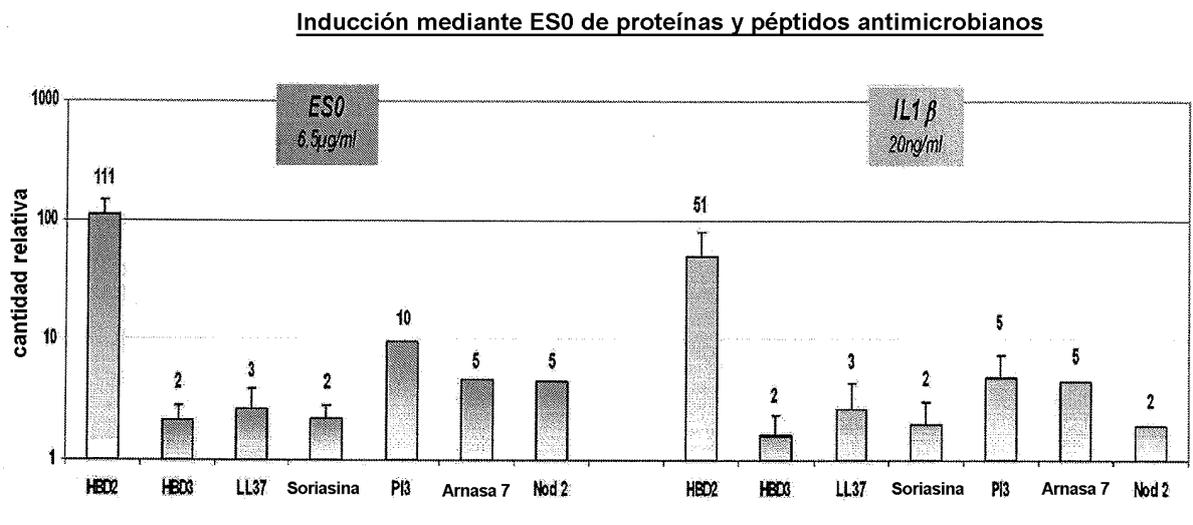


FIGURA 11

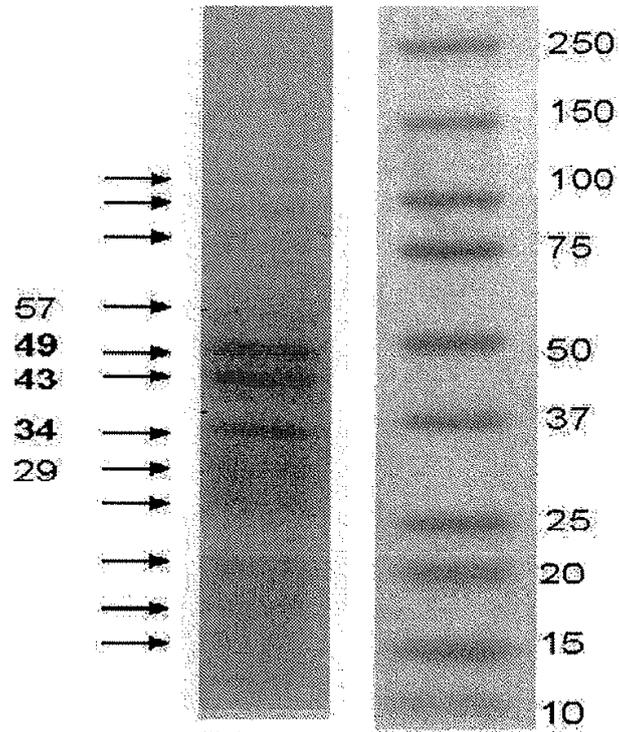


FIGURA 12