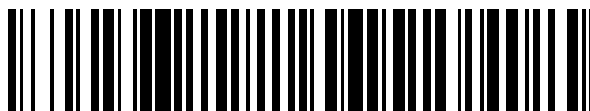


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 490**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)  
**A61K 35/744** (2015.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61P 17/18** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/EP2012/058047**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150269**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12730161 (2)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2704704**

54 Título: **Bacterias probióticas para el tratamiento tópico de trastornos de la piel**

30 Prioridad:

**03.05.2011 EP 11164534**

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

**01.03.2019**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**  
**Langebrogade 1**  
**1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**PUTAALA, HELI;**  
**OUWEHAND, ARTHUR;**  
**TIIHONEN, KIRSTI y**  
**RAUTONEN, NINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 702 490 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

Bacterias probióticas para el tratamiento tópico de trastornos de la piel

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a bacterias probióticas y/o metabolitos solubles de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la función de la Unión Estrecha. En particular, las bacterias probióticas, el metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica se formulan para la administración tópica.

## Antecedentes de la invención

La epidermis, el epitelio estratificado escamoso de la piel, consiste en múltiples subcapas y es una de las barreras más importantes del cuerpo con el mundo exterior. El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y la última etapa anucleada en la diferenciación de queratinocitos de las células en las capas epidérmicas nucleadas. Aunque el estrato córneo es reconocido como la barrera física más importante, las capas epidérmicas nucleadas también tienen una función de barrera significativa, como lo demuestran los estudios con víctimas de quemaduras (1, 2). En conjunto, la barrera cutánea protege contra la pérdida extensa de agua en una dirección (barrera interior-exterior) y contra la invasión de sustancias nocivas del entorno (barrera exterior-interior) (2). El mantenimiento de la barrera también es importante para una proliferación equilibrada en la capa basal y la conservación del gradiente de iones calcio y, por tanto, la diferenciación epidérmica adecuada (3).

En la epidermis de mamíferos, las uniones estrechas (UE) se encuentran principalmente en el estrato granuloso o la capa granular del epitelio, que se encuentra debajo de la capa córnea (4). Las UE son uniones célula-célula dinámicas que conectan las células vecinas, controlan la vía paracelular de las moléculas que actúan como barreras y tienen una función de cerco al separar las membranas celulares apicales de las membranas celulares basolaterales (5). Son importantes no solo en la función de barrera interior-exterior, sino también en la función de barrera exterior-interior.

Los probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud en el hospedador" (13). Se han realizado anteriormente investigaciones de los efectos de la administración oral de probióticos sobre la epidermis. Se ha sugerido que los probióticos modulan la inmunidad sistémicamente y se han sugerido para su uso profiláctico para aliviar el eccema atópico en niños (17).

Se han realizado pocos estudios para estudiar cómo afectan los probióticos a los queratinocitos cuando se administran por vía tópica. Sin embargo, en un estudio, se ha observado que lisados sometidos a ultrasonidos de *Streptococcus thermophilus* aumentan el nivel de ceramidas en el estrato córneo *in vitro* e *in vivo* (22).

## 40 Sumario de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los inventores de que la administración tópica de bacterias probióticas y/o metabolitos solubles de bacterias probióticas y/o lisados celulares de bacterias probióticas puede mejorar la función de Unión Estrecha (UE) en el epitelio.

La importancia de la función de UE como parte de la función de barrera epidérmica de la piel ha sido verificada por el descubrimiento de que la deficiencia de la proteína de UE claudina 1 (*cldn-1*) da como resultado la pérdida de agua epidérmica fatal en ratones recién nacidos (4). En diversas enfermedades de la piel con función de barrera alterada, tales como la psoriasis, la proteína 1 de la zonula ocludens (ZO-1) y la ocludina se reubican en las capas epidérmicas inferiores (6). También se sabe que las proteínas de UE son dianas para los ataques bacterianos y víricos, y determinados virus y bacterias las usan como receptores en la patogenia (8). Además, los alérgenos pueden alterar la UE y promover el asma (9). Además, la alteración de la barrera epidérmica inducida por UV se asocia al deterioro de la barrera de UE (10). Por tanto, las UE son importantes no solo en la barrera interior-exterior, sino también en la barrera exterior-interior.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una bacteria probiótica y/o metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la función de la unión estrecha, caracterizados porque las bacterias probióticas, el metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica se formulan para la administración tópica; en los que la bacteria probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33 y *Propionibacterium jensenii* P63; y/o el metabolito soluble de una bacteria probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33, *Bifidobacterium lactis* 420 y *L. acidophilus* La-14; y/o el lisado celular de la bacterias probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33, *Propionibacterium jensenii* P63 y *L. acidophilus* La-14, y en los que el trastorno asociado a la función de la Unión

Estrecha se selecciona entre el grupo que comprende psoriasis, acné, dermatitis atópica, piel seca, alergia, erupciones cutáneas, piel irritada por rayos UV, piel irritada por detergentes (incluyendo la irritación causada por enzimas utilizadas en detergentes de lavado y lauril sulfato de sodio) y piel adelgazada (por ejemplo, piel de ancianos y niños) y asma.

5 Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20° ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994) y Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, Nueva York (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente divulgación.

15 Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Otras definiciones de términos pueden aparecer a lo largo de la memoria descriptiva. Antes de que las realizaciones de ejemplo se describan con más detalle, ha de entenderse que la presente divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente divulgación estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

25 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo, también se desvela específicamente. Cada intervalo menor entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo establecido se incluye dentro de la presente divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo y cada intervalo en el que se incluye uno o ambos límites en los intervalos más pequeños también se incluye dentro de la presente divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los límites incluidos, o ambos, también se incluyen en la presente divulgación.

35 Hay que señalar que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento no ha de interpretarse nada como una admisión de que dichas publicaciones constituyen un estado de la técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas.

40 Se entenderá que, a continuación, las realizaciones preferidas a las que se hace referencia en relación con un aspecto amplio de la invención son igualmente aplicables a cada uno de los otros aspectos amplios de la presente invención descritos anteriormente. Se comprenderá adicionalmente que, a menos que el contexto indique lo contrario, las realizaciones preferidas que se describen a continuación pueden combinarse.

45 Cuando se usa en el presente documento, el término tópico incluye referencias a formulaciones que están adaptadas para su aplicación a superficies corporales (por ejemplo, la piel o las membranas mucosas). Las membranas mucosas que pueden mencionarse a este respecto incluyen la mucosa de la vagina, el pene, la uretra, la vejiga, el ano, la boca (incluyendo la mucosa de la mejilla, el paladar blando, la parte inferior de la lengua y el suelo de la boca), la nariz, la garganta (incluyendo la mucosa de la faringe, la laringe, la tráquea y el esófago), los bronquios, los pulmones, el ojo y la oreja.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular se formulan para la administración a la piel.

55 Se entenderá adicionalmente que la formulación para su uso en la presente invención puede comprender uno o más de al menos una bacteria probiótica, al menos un metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o al menos un lisado celular de una bacteria probiótica.

60 Se entenderá adicionalmente que la formulación puede comprender más de una bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular. Por ejemplo, la formulación puede comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 o 20 bacterias probióticas o sus metabolitos solubles o lisados celulares.

65 El experto en la materia entenderá que, como se usa en el presente documento, el término probiótico se refiere a un microorganismo vivo (incluyendo bacterias o levaduras, por ejemplo) que, cuando se aplica por vía tópica en cantidades suficientes, afecta de manera beneficiosa al organismo hospedador, es decir, confiriéndole uno o más beneficios para la salud demostrables en el organismo hospedador.

También será fácilmente evidente que las formulaciones de la presente invención pueden incluir adicionalmente uno o más prebióticos.

Si bien no hay límites inferiores o superiores para el uso de probióticos, se ha sugerido que al menos  $10^6$ - $10^{12}$ , preferentemente al menos  $10^6$ - $10^{10}$ , preferentemente  $10^8$ - $10^9$ , ufc como dosis diaria será eficaz para conseguir los efectos beneficiosos para la salud en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "metabolito soluble" se refiere a un metabolito o metabolitos presentes en el sobrenadante de un cultivo celular del cual se han retirado las células. En realizaciones preferidas, el cultivo se cultiva hasta una densidad celular de al menos aproximadamente  $OD_{600}$  0,5. En una realización preferida adicional, las células se retiran mediante centrifugación. En una realización más preferida, el sobrenadante se filtra. Será evidente que el sobrenadante puede usarse directamente en las formulaciones de la presente invención o que uno o más de los metabolitos pueden aislarse del sobrenadante mediante cualquier medio adecuado antes de su uso.

Como se usa en el presente documento, la expresión "lisado celular" o "lisado" se refiere a células probióticas que han sido lisadas mediante cualquier medio adecuado. En realizaciones preferidas, los residuos celulares se retiran antes de su uso. En realizaciones más preferidas, los lisados celulares se filtran antes de su uso. En realizaciones de ejemplo, las células se lisan mediante, por ejemplo, ultrasonidos, homogeneización, cizalla o lisis química.

Las bacterias probióticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. acidophilus*), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y/o *Oenococcus*.

Los metabolitos solubles para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metabolitos solubles de *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. acidophilus*), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y/o *Oenococcus*.

Los lisados celulares para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lisados celulares de *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. acidophilus*), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y/o *Oenococcus*.

Preferentemente, la bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos una bacteria de ácido láctico.

Más preferentemente, la bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular se selecciona entre el grupo que comprende *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium lactis* y *Propionibacterium jensenii*.

En una realización aún más preferida, la bacteria o lisado celular se selecciona entre *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33 y *P. jensenii* P63.

En una realización preferida alternativa el metabolito soluble de una bacteria probiótica es de *Bifidobacterium lactis* 420.

En una realización preferida de la presente invención, la formulación comprende adicionalmente al menos uno de entre betaína, un poliol (por ejemplo, xilitol o lactitol) y/o un polifenol (por ejemplo, epicatequina o galocatequina).

Se entenderá que el trastorno puede ser cualquier trastorno asociado a la función de la Unión Estrecha. En realizaciones preferidas, el trastorno se selecciona entre el grupo que comprende psoriasis, acné, dermatitis atópica, piel seca, alergia, erupciones cutáneas, piel irritada por rayos UV, piel irritada por detergentes (incluyendo la irritación causada por enzimas utilizadas en detergentes de lavado y lauril sulfato de sodio), piel adelgazada (por ejemplo, piel de ancianos y niños).

Será evidente adicionalmente que la formulación para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender cualquier cantidad farmacéuticamente eficaz de la bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 1,0 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 2,0 %, aproximadamente el 3,0 %, aproximadamente el 4,0 %, aproximadamente el 5,0 %, aproximadamente el 6,0 %, aproximadamente el 7,0 %, aproximadamente el 8,0 %, aproximadamente el 9,0 %, aproximadamente el 10,0 %, aproximadamente el 11,0 %, aproximadamente el 12,0 %, aproximadamente el 13,0 %, aproximadamente el 14,0 %, aproximadamente el 15,0 %, aproximadamente el 16,0 %, aproximadamente el 17,0 %, aproximadamente el 18,0 %, aproximadamente el 19,0 %, aproximadamente el 20,0 %, aproximadamente el 25,0 %, aproximadamente el 30,0 %, aproximadamente el 35,0 %, aproximadamente el 40,0 %, aproximadamente el 45,0 %, aproximadamente el 50,0 % en peso de bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular.

En una realización alternativa la formulación para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender, por ejemplo, al menos de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 15 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,4 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, en peso de bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular.

La formulación tópica para su uso en la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la aplicación a la superficie corporal, tal como una crema, loción, pulverizaciones, solución, gel, pomada, pasta, parche, pintura, bioadhesivo, suspensiones o similares, y/o pueden prepararse de manera que contengan liposomas, micelas y/o microesferas. Una formulación de este tipo puede usarse en combinación con una capa oclusiva, de modo que la humedad que se evapora de la superficie corporal se mantenga dentro de la formulación tras la aplicación a la superficie corporal y posteriormente.

Las formulaciones tópicas incluyen aquellas en las que el principio activo o principios activos se disuelven o se dispersan en un vehículo dermatológico conocido en la técnica (por ejemplo, geles acuosos o no acuosos, pomadas, emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua). Los componentes de dichos vehículos pueden comprender agua, soluciones acuosas, disolventes no acuosos (tales como etanol, isopropanol, alcohol bencílico, 2-(2-etoxietoxi)etanol, propilenglicol, monolaurato de propilenglicol, glicofurol o glicerol), aceites (por ejemplo, un aceite mineral tal como una parafina líquida, triglicéridos naturales o sintéticos tales como Miglyol™ o aceites de silicona tales como dimeticona). Dependiendo, entre otras cosas, de la naturaleza de la formulación, así como de su uso previsto y lugar de aplicación, el vehículo dermatológico empleado puede contener uno o más componentes (por ejemplo, cuando la formulación es un gel acuoso, componentes además de agua) seleccionado entre la siguiente lista:

un agente solubilizante o disolvente (por ejemplo, una  $\beta$ -ciclodextrina, tal como hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina o un alcohol o poliol tal como etanol, propilenglicol o glicerol);

un agente espesante (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa o carbómero);

un agente gelificante (por ejemplo, un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno);

un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, clorhexidina, clorbutol, un benzoato, sorbato de potasio o EDTA o una sal de los mismos); y

un agente o agentes de tamponamiento del pH (tal como una mezcla de sales de fosfato de dihidrógeno y fosfato de hidrógeno o una mezcla de ácido cítrico y una sal de fosfato de hidrógeno).

En composiciones particulares,

(i) puede haber agua presente en una proporción del 55 al 75 % (por ejemplo, del 60 al 72,5 %) en peso;

(ii) el uno o más disolventes polares no acuosos pueden estar presentes (juntos) en una proporción del 15 al 40 % (por ejemplo, del 24 al 35 %) en peso;

(iii) puede haber presente glicerol, si se usa, en una proporción del 5 al 25 % (por ejemplo, del 15 al 20 %) en peso;

(iv) puede haber presente etanol, si se usa, en una proporción del 3 al 10 % (por ejemplo, del 5 al 8 %) en peso;

(v) puede haber presente propilenglicol, si se usa, en una proporción del 2 al 15 % (por ejemplo, del 4 al 6 %) en peso;

(vi) el conservante puede estar presente en una proporción del 0,1 al 3 % (por ejemplo, de aproximadamente el 1 %) en peso;

(vii) el agente espesante puede estar presente en una proporción del 1 al 5 % (por ejemplo, de aproximadamente el 2 % en peso).

En composiciones tópicas particulares adicionales, el agente o agentes de tamponamiento del pH, si se emplean y cuando se disuelven en el componente de agua de la composición, pueden proporcionar un pH en el intervalo de 5 a 7 (por ejemplo, de aproximadamente pH 5,5).

Se conocen bien en la técnica métodos de producción de composiciones farmacéuticas tópicas tales como cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones y soluciones o suspensiones acuosas estériles. Se describen métodos adecuados para preparar composiciones farmacéuticas tópicas, por ejemplo, en los documentos WO 95/10999, US 6.974.585, WO 2006/048747 (incorporados en el presente documento por referencia), así como en los documentos citados en cualquiera de estas referencias.

También puede incorporarse un vehículo farmacéuticamente aceptable en la formulación de la presente invención y puede ser cualquier vehículo utilizado convencionalmente en la técnica. Los ejemplos de los mismos incluyen agua, alcoholes inferiores, alcoholes superiores, alcoholes polihídricos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, aceites hidrocarbonados, grasas y aceites, ceras, ácidos grasos, aceites de silicona, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, tensioactivos de silicona, y mezclas con base acuosa y mezclas con base de emulsión de dichos vehículos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usa en el presente documento para referirse a un compuesto o composición que puede incorporarse en una formulación farmacéutica sin provocar efectos biológicos indeseables o interacciones no deseadas con otros componentes de la formulación.

Los "excipientes" o "vehículos", como se usan en el presente documento, se refieren a materiales excipientes adecuados para su incorporación en una composición aplicada por vía tópica. Los excipientes y vehículos útiles en el presente documento incluyen cualquiera de dichos materiales conocidos en la técnica, que no sean tóxicos y no interactúen con otros componentes de la formulación en la que están contenidos de manera perjudicial.

El término "acuoso" se refiere a una formulación que contiene agua o que se convierte en acuosa después de la aplicación a la piel o al tejido de mucosa.

La formulación farmacéutica de la invención comprende un vehículo tópico farmacéuticamente aceptable y un agente activo que consiste esencialmente en una bacteria probiótica y/o metabolitos de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica.

Las formulaciones de la invención pueden contener opcionalmente un potenciador de la viscosidad y/o un formador de película farmacéuticamente aceptables. Un potenciador de la viscosidad aumenta la viscosidad de la formulación para inhibir su propagación más allá del sitio de aplicación. Balsam Fir (Oregón) es un ejemplo de un potenciador de la viscosidad farmacéuticamente aceptable.

Un formador de película, cuando se seca, forma una película protectora sobre el sitio de aplicación. La película inhibe la retirada del principio activo y lo mantiene en contacto con el sitio que se está tratando. Un ejemplo de un formador de película que es adecuado para su uso en la presente invención es Flexible Collodion, USP. Como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), en la página 1530, los colodiones son soluciones de etil éter/etanol que contienen piroxilina (una nitrocelulosa) que se evaporan para dejar una película de piroxilina. Un formador de película puede actuar adicionalmente como vehículo. Las soluciones que se secan para formar una película en ocasiones se denominan pinturas.

Las cremas, como es bien sabido en las técnicas de formulación farmacéutica, son líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases de crema pueden lavarse con agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, también denominada fase "interna", generalmente comprende vaselina y un alcohol graso tal como el alcohol cetílico o estearílico. La fase acuosa por lo general, aunque no necesariamente, supera a la fase oleosa en volumen y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación en crema generalmente es un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Las lociones, son preparaciones que se han de aplicar a la superficie de la piel sin fricción y, normalmente, son preparaciones líquidas o semilíquidas en las que las partículas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones por lo general son suspensiones de sólidos y, preferentemente, comprenden una emulsión oleosa líquida del tipo de aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas en el presente documento para tratar grandes áreas corporales, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. Generalmente es necesario que la materia insoluble en una loción esté finamente dividida. Las lociones normalmente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o similares.

Las soluciones son mezclas homogéneas preparadas mediante la disolución de una o más sustancias químicas (solutos) en un líquido, de manera que las moléculas de la sustancia disuelta se dispersan entre las del disolvente. La solución puede contener otros productos químicos farmacéuticamente o cosméticamente aceptables para tamponar, estabilizar o conservar el soluto. Son ejemplos comunes de disolventes utilizados en la preparación de soluciones etanol, agua, propilenglicol o cualquier otro vehículo aceptable.

Como es, por supuesto, bien sabido, los geles son sistemas de tipo suspensión semisólida. Los geles monofásicos contienen macromoléculas orgánicas distribuidas de manera sustancialmente uniforme en todo el líquido de vehículo, que es normalmente acuoso, pero también, preferentemente, contienen un alcohol y, opcionalmente, un aceite. Las "macromoléculas orgánicas" preferidas, es decir, los agentes gelificantes, son polímeros de ácido acrílico reticulados tales como la familia de polímeros "carbómeros", por ejemplo, carboxipolialquilenos que pueden obtenerse en el mercado con la marca registrada Carbopol®. También se prefieren polímeros hidrófilos tales como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxitileno-polioxiopropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos tales

como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa; gomas tales como tragacanto y goma xantana; alginato de sodio; y gelatina. Con el fin de preparar un gel uniforme, pueden añadirse agentes dispersantes tales como alcohol o glicerina, o el agente gelificante puede dispersarse mediante trituración, mezcla mecánica o agitación, o combinaciones de los mismos.

Las pomadas, como también son bien conocidas en la técnica, son preparaciones semisólidas normalmente a base de vaselina u otros derivados del petróleo. La base de ungüento específica que se usará, como apreciarán los expertos en la materia, es una que proporcione una serie de características deseables, por ejemplo, emoliencia o similares. Al igual que con otros excipientes o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19<sup>a</sup> ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), en las páginas 1399-1404, las bases de pomadas pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases hidrosolubles. Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poca o ninguna agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de pomada en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol acetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada hidrosolubles preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable; de nuevo, véase *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* para obtener información adicional.

Las pastas son formas de dosificación semisólidas en las que el agente activo está suspendido en una base adecuada. Dependiendo de la naturaleza de la base, las pastas se dividen entre las pastas grasas o las fabricadas a partir de geles acuosos monofásicos. La base en una pasta grasa generalmente es vaselina o vaselina hidrófila o similar. Las pastas fabricadas a partir de geles acuosos monofásicos generalmente incorporan carboximetilcelulosa o similares como base.

Las formulaciones también pueden prepararse con liposomas, micelas y microesferas. Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica y, en el presente contexto, encapsulan uno o más componentes de las formulaciones. Las preparaciones liposómicas de la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (con carga positiva), aniónicas (con carga negativa) y neutras. Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietil-amonio (DOTMA) están disponibles con el nombre comercial de Lipofectin® (GIBCO BRL, Grand Island, NY). De forma similar, los liposomas aniónicos y neutros también están disponibles, por ejemplo, de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) y dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con DOTMA en proporciones apropiadas. Los métodos para preparar liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

En la técnica, las micelas son conocidas por comprender moléculas de tensioactivo dispuestas de manera que sus grupos de cabeza polares forman una cubierta esférica exterior, mientras que las cadenas hidrocarbonadas hidrófobas se orientan hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micelas se forman en una solución acuosa que contiene tensioactivo en una concentración lo suficientemente alta para que las micelas se produzcan naturalmente. Los agentes tensioactivos útiles para formar micelas incluyen, pero no se limitan a, laurato de potasio, octano sulfonato de sodio, decano sulfonato de sodio, dodecano sulfonato de sodio, lauril sulfato de sodio, docusato de sodio, bromuro de deciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de dodecilamonio, polioxil-8-dodecil éter, polioxil-12-dodecil éter, nonoxinol 10 y nonoxinol 30.

De forma similar, pueden incorporarse microesferas en las presentes formulaciones. Al igual que los liposomas y las micelas, las microesferas esencialmente encapsulan uno o más componentes de las presentes formulaciones. Generalmente, aunque no necesariamente, se forman a partir de lípidos, preferentemente lípidos cargados tales como fosfolípidos. La preparación de microesferas lipídicas es bien conocida en la técnica y se describe en los textos y la bibliografía pertinentes.

Pueden incluirse diversos aditivos, conocidos por los expertos en la materia, en las formulaciones tópicas. Por ejemplo, los disolventes, que incluyen cantidades relativamente pequeñas de alcohol, pueden usarse para solubilizar determinados componentes de la formulación. Con afecciones de la piel particularmente graves, puede ser deseable incluir un potenciador de la permeación añadido en la formulación. Los ejemplos de potenciadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, éteres tales como dietilenglicol monoetil éter (disponible en el mercado como Transcutol®) y dietilenglicol monometil éter; tensioactivos tales como laurato de sodio, laurilsulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, Poloxamer® (231, 182, 184), Tween® (20, 40, 60, 80) y lecitina (Patente de los EE.UU. N.º 4.783.450); alcoholes tales como etanol, propanol, octanol, alcohol bencílico y similares; polietilenglicol y ésteres de los mismos, tales como monolaurato de polietilenglicol (PEGML; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.568.343); amidas y otros compuestos nitrogenados tales como urea, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), 2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina;

terpenos; alcanonas; y ácidos orgánicos, en particular ácido cítrico y ácido succínico. También pueden usarse Azone® y sulfóxidos tales como DMSO y C<sub>10</sub>MSO, pero son menos preferidos.

Los potenciadores más preferidos son aquellos copotenciadores lipófilos normalmente denominados potenciadores "de plastificación", es decir, potenciadores que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 150 a 1000, una solubilidad acuosa de menos de aproximadamente el 1 % en peso, preferentemente de menos de aproximadamente el 0,5 % en peso y mucho más preferentemente de menos de aproximadamente el 0,2 % en peso. El parámetro de solubilidad de Hildebrand  $\delta$  de los potenciadores de plastificación está en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 10, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. Son potenciadores lipófilos preferidos ésteres grasos, alcoholes grasos y éteres grasos. Los ejemplos de ésteres de ácidos grasos específicos y más preferidos incluyen laurato de metilo, oleato de etilo, monolaurato de propilenglicol, dilaurato de propilenglicerol, monolaurato de glicerol, monooleato de glicerol, n-decanoato de isopropilo y miristato de octildodecilo. Los alcoholes grasos incluyen, por ejemplo, alcohol estearílico y alcohol oleílico, mientras que los éteres grasos incluyen compuestos en los que un diol o triol, preferentemente un alcano C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> diol o triol, están sustituidos con uno o dos sustituyentes de éter graso.

Los expertos en la materia de la entrega tópica de fármacos conocerán potenciadores de la permeación adicionales, y/o se describen en los textos y la bibliografía pertinentes. Véase, por ejemplo, *Percutaneous Penetration Enhancers*, eds. Smith et al. (CRC Press, 1995).

Pueden incluirse diversos otros aditivos en las composiciones de la presente invención, además de los identificados anteriormente. Estos incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, astringentes, perfumes, conservantes, emolientes, pigmentos, colorantes, humectantes, propulsores y agentes de protección solar, así como otras clases de materiales cuya presencia puede ser deseable farmacéuticamente o de otra manera. Los ejemplos típicos de aditivos opcionales para la inclusión en las formulaciones de la invención son los siguientes: conservantes tales como sorbato; disolventes tales como isopropanol y propilenglicol; astringentes tales como mentol y etanol; emolientes tales como polialquilen metil glucósidos; humectantes tales como glicerina; emulsionantes tales como estearato de glicerol, estearato de PEG-100, poligliceril-3-hidroxilauril éter y polisorbato 60; sorbitol y otros polihidroxialcoholes tales como polietilenglicol; agentes de protección solar tales como octil metoxil cinamato (disponible en el mercado como Parsol MCX) y butil metoxi benzoilmetano (disponible con el nombre comercial Parsol 1789); antioxidantes tales como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol,  $\epsilon$ -tocoferol,  $\zeta_1$ -tocoferol,  $\zeta_2$ -tocoferol,  $\eta$ -tocoferol y retinol (vitamina A); aceites esenciales, ceramidas, ácidos grasos esenciales, aceites minerales, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja, aceite de palma, fracción líquida de la manteca de karité, aceite de girasol), aceites animales (por ejemplo, perhidroescualeno), aceites sintéticos, aceites o ceras de silicona (por ejemplo, ciclometicona y dimeticona), aceites fluorados (generalmente perfluoropolíéters), alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico) y ceras (por ejemplo, cera de abeja, cera de carnaúba y cera de parafina); modificadores de la sensación en la piel; y espesantes y estructurantes tales como arcillas inflamables y carboxipolialquilenos reticulados que pueden obtenerse en el mercado con la marca registrada Carbopol.

Otros aditivos incluyen agentes beneficiosos tales como aquellos materiales que acondicionan la piel (en particular, las capas superiores de la piel en el estrato córneo) y la mantienen suave retardando la disminución de su contenido de agua y/o protegen la piel. Dichos acondicionadores y agentes hidratantes incluyen, a modo de ejemplo, ácido pirrolidina carboxílico y aminoácidos; agentes antimicrobianos orgánicos tales como 2,4,4'-tricloro-2-hidroxi difenil éter (triclosán) y ácido benzoico; agentes antiinflamatorios tales como ácido acetilsalicílico y ácido glicirretínico; agentes antiseborreicos tales como ácido retinoico; vasodilatadores tales como ácido nicotínico; inhibidores de la melanogénesis tales como ácido kójico; y mezclas de los mismos. Otros agentes activos adicionales incluyendo, por ejemplo, alfa hidroxiácidos, alfa cetoácidos, hidroxiácidos poliméricos, humectantes, colágeno, extracto marino y antioxidantes tales como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E),  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol,  $\epsilon$ -tocoferol,  $\zeta_1$ -tocoferol,  $\zeta_2$ -tocoferol,  $\eta$ -tocoferol y retinol (vitamina A), y/o sales, ésteres, amidas u otros derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Un compuesto de tocoferol preferido es  $\alpha$ -tocoferol. Los agentes adicionales incluyen aquellos que son capaces de mejorar el suministro de oxígeno en el tejido cutáneo, como se describe, por ejemplo, en Gross, et al, documento WO 94/00098 y Gross, et al, documento WO 94/00109, ambos asignados a Lancaster Group AG. También pueden incluirse filtros solares. Otras realizaciones pueden incluir una diversidad de materiales de curación no carcinógenos, no irritantes que faciliten el tratamiento con las formulaciones de la invención. Dichos materiales de curación pueden incluir nutrientes, minerales, vitaminas, electrolitos, enzimas, hierbas, extractos de plantas, extractos glandulares o animales, o agentes terapéuticos seguros que pueden añadirse a la formulación para facilitar la curación de los trastornos dérmicos.

Las cantidades de estos diversos aditivos son las utilizadas convencionalmente en el campo de la cosmética y el intervalo, por ejemplo, del 0,01 % al 20 % del peso total de la formulación tópica.

Las formulaciones de la invención pueden incluir también aditivos convencionales tales como opacificantes, fragancia, colorante, estabilizadores, tensioactivos y similares.

En determinadas realizaciones, también pueden añadirse otros agentes, tales como agentes antimicrobianos, para evitar el deterioro durante el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios tales como levaduras



y mohos. Se seleccionan agentes antimicrobianos adecuados normalmente entre el grupo que consiste en ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propilparabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidurea y combinaciones de los mismos.

5 Las formulaciones pueden contener también aditivos mitigadores de la irritación para minimizar o eliminar la posibilidad de irritación de la piel o daños en la piel resultado de la entidad química que se ha de administrar, u otros componentes de la composición. Los aditivos mitigadores de la irritación adecuados incluyen, por ejemplo:  $\alpha$ -tocoferol; inhibidores de la monoaminooxidasa, en particular alcoholes fenílicos tales como 2-fenil-1-etanol; glicerina; salicilatos; ascorbatos; ionóforos tales como monensina; aminas anfífilas; cloruro de amonio; N-acetilcisteína; capsaicina; y cloroquina. El aditivo mitigador de la irritación, si está presente, puede incorporarse en las composiciones a una concentración eficaz para mitigar la irritación o el daño a la piel, representando normalmente no más de aproximadamente el 20 % en peso, más normalmente no más de aproximadamente el 5 % en peso, de la formulación.

15 Los agentes farmacológicamente activos adecuados adicionales que pueden incorporarse en las presentes formulaciones en determinadas realizaciones y, por tanto, pueden aplicarse por vía tópica junto con el agente activo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: agentes que mejoran o erradican las manchas de la edad pigmentadas o no pigmentadas, las queratosis y las arrugas; agentes antimicrobianos; agentes antibacterianos; agentes antiprurícticos y antixeróticos; agentes antiinflamatorios; anestésicos locales y analgésicos; corticoesteroides; retinoides; vitaminas; hormonas y antimetabolitos.

25 Algunos ejemplos de agentes farmacológicamente activos tópicos incluyen aciclovir, anfotericinas, clorhexidina, clotrimazol, ketoconazol, econazol, miconazol, metronidazol, minociclina, nistatina, neomicina, kanamicina, fenitoína, ésteres de ácido paraaminobenzoico, metoxicinamato de octilo, salicilato de octilo, oxibenzona, dioxibenzona, tocoferol, acetato de tocoferilo, sulfuro de selenio, piritiona de cinc, difenhidramina, pramoxina, procaína, eritromicina, tetraciclina, clíndamicina, crotamitón, hidroquinona and sus monometil y bencil éteres, naproxeno, ibuprofeno, cromolina, retinol, palmitato de retinilo, acetato de retinilo, alquitrán de hulla, griseofulvina, estradiol, hidrocortisona, 21-acetato de hidrocortisona, 17-valerato de hidrocortisona, 17-butilato de hidrocortisona, progesterona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, acetónido de triamcinolona, fluciclonida, propionato de clobetasol, minoxidilo, dipiridamol, difenilhidantoína, peróxido de benzoílo y 5-fluorouracilo,

35 Una crema, loción, gel, pomada, pasta o similar puede untarse sobre la superficie afectada y frotarse suavemente. Puede aplicarse una solución de la misma manera, pero más normalmente se aplicará con un gotero, hisopo o similar y se aplicará con cuidado a las zonas afectadas.

40 La pauta de aplicación dependerá de una serie de factores que pueden determinarse fácilmente, tales como la gravedad de la afección y su capacidad de respuesta al tratamiento inicial, pero normalmente implicará una o más aplicaciones por día sobre una base continua. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad óptima de la formulación que se ha de administrar, las metodologías de administración y las tasas de repetición. En general, se contempla que las formulaciones de la invención se apliquen en el intervalo de una o dos veces por semana hasta una o dos veces al día.

Breve descripción de las figuras

45 La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras en las que:

50 la Figura 1 muestra el aumento de la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) en queratinocitos durante la diferenciación de queratinocitos. (A). Expresión de claudina 4 (CLDN4) (A), ocludina (OCLN) (B) y zonula occludens 1 (ZO-1) (C) durante la diferenciación de queratinocitos. Se muestra la media  $\pm$  ET, \*\*\*  $p < 0,001$ , en comparación con la muestra de 1 día).

55 La Figura 2 muestra la regulación de la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) en queratinocitos tratados con 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ M de betaína durante 1 h, 12 h y 24 h (A). Expresión de claudina (CLDN4) (B), ocludina (OCLN) (C) y zonula occludens 1 (ZO-1) (D) en queratinocitos después de 24 h de tratamiento con 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ M de betaína. Se muestra la media  $\pm$  ET, \*  $p < 0,05$ , en comparación con la muestra sin betaína.

60 La Figura 3 muestra la regulación de la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) en queratinocitos tratados con medio (CTRL), caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) al 10 % (vol/vol) utilizado para cultivar los probióticos y metabolitos probióticos solubles al 10 % (vol/vol) durante 1 h, 8 h y 24 h (A). Expresión de claudina (CLDN4) (B), ocludina (OCLN) (C) y zonula occludens 1 (ZO-1) (D) en queratinocitos después de 24 h de tratamiento con medio (CTRL), caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) al 10 % (vol/vol) utilizado para cultivar los probióticos y metabolitos probióticos solubles al 10 % (vol/vol) durante 24 h. Se muestra la media  $\pm$  ET, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

65

La Figura 4 muestra la regulación de la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) en queratinocitos tratados con medio (CTRL), células enteras de probióticos o lisados de células probióticas durante 1 h, 8 h y 24 h (A). Expresión de claudina (CLDN4) (B), ocludina (OCLN) (C) y zonula ocludens 1 (ZO-1) (D) en queratinocitos después de 24 h de tratamiento con medio (CTRL), medio (CTRL), células enteras de probióticos o lisados de células probióticas durante 24 h. Se muestra la media  $\pm$  ET, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## Ejemplos

En este estudio los inventores diferenciaron queratinocitos epidérmicos humanos normales en insertos de cultivo celular y se investigó el efecto de la betaína y los probióticos, ya fueran metabolitos solubles, células bacterianas enteras o lisados de células bacterianas sobre las características de barrera. La resistencia eléctrica transepitelial (RETE) se usa ampliamente en estudios de células epiteliales para medir la integridad de la unión estrecha. La RETE refleja la permeabilidad transepitelial de iones hidrosolubles y una RETE más alta indica una permeabilidad iónica más baja. Por otra parte, se estudió la expresión de la claudina 4, ocludina y zonula ocludens 1 en estas células.

### Material y métodos

#### Diferenciación de queratinocitos

Se mantuvieron queratinocitos primarios humanos normales de adulto (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en medio EpiLife® con calcio (Invitrogen) 60  $\mu$ M complementado con Complemento de Crecimiento de Queratinocitos Humanos (CCQH) (Invitrogen) (medio basal) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Para diferenciar los queratinocitos, las células P5-P7 se colocaron en placas sobre inserciones de cultivo celular ThinCert™ (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) a una densidad de 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Después de la incubación durante la noche en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, el medio basal se aspiró y se cambió por medio de diferenciación (MD) que consistía en medio EpiLife® con CaCl<sub>2</sub> 1,45 mM complementado con complemento de crecimiento de queratinocitos humanos y se incubó durante 4 días en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El MD se cambió tanto en el lado apical como en el basolateral todos los días. Las sustancias de ensayo se administraron el cuarto día después de comenzar la diferenciación.

#### Experimentos con queratinocitos diferenciados

Se disolvió betaína (Danisco) en MD y se aplicó al lado apical de los queratinocitos diferenciados en cantidades de 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ M. Las células se incubaron durante 1, 12 y 24 horas, puntos temporales en los que se midió la RETE como se describe a continuación.

Se cultivaron *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (ATCC 700396), *Bifidobacterium lactis* 420 DSM22089 (disponible en el mercado de Danisco A/S), *L. acidophilus* La-14 (ATCCSD5212) (disponible en el mercado de Danisco A/S), *L. salivarius* Ls-33 (ATCCSD5208) y *Propionibacterium jensenii* P63 (DSM 22192) (Danisco Cultures, París, Francia) anaeróticamente a 37 °C en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (LabM, Bury, Reino Unido). Para experimentos con metabolitos probióticos solubles, las bacterias se cultivaron a OD<sub>600</sub>≈0,6-0,9, y para experimentos con células bacterianas enteras, el cultivo continuó hasta que se consiguió la tasa de crecimiento exponencial de las bacterias. Las densidades de células bacterianas se determinaron con citometría de flujo (FACS-Calibur, Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.). Las células bacterianas se retiraron de los metabolitos solubles mediante centrifugación a 25 °C, 5 min, 3000  $\times$  g. Se descartaron los sedimentos bacterianos y el sobrenadante que contenía metabolitos solubles se diluyó al 10 % (vol/vol) en MD, se filtró de forma estéril con unidades de filtro de jeringa estéril de 0,2  $\mu$ m (Sartorius, Goettingen, Alemania). Las células bacterianas se lavaron una vez con MD y se administraron como 100 células bacterianas con respecto a un queratinocito suspendido en MD.

Para estudios con lisados de células bacterianas, las células bacterianas se cizallaron con batidor de bolas Precellys 24 (Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines Cedex, Francia) con kit de molienda VK01 (Bertin Technologies) a 6500 rpm con 3 ciclos de 45 segundos. La degradación de las células se confirmó mediante microscopía óptica. Los lisados celulares bacterianos suspendidos en MD se filtraron de forma estéril con unidades de jeringa de 0,2  $\mu$ m (Sartorius) antes de aplicarlos al lado apical de los queratinocitos diferenciados en una cantidad que correspondía a 100 células bacterianas lisadas con respecto a un queratinocito.

Los queratinocitos diferenciados se trataron con metabolitos solubles producidos por probióticos, células bacterianas enteras de probióticos y lisados de células bacterianas desde el lado apical durante 1 h, 8 h y 24 h en los que se midió la RETE. Como control para experimentos con metabolitos solubles, se utilizó medio de cultivo bacteriano al 10 %. Al final de cada experimento, en el punto temporal de 24 h, los queratinocitos se lisaron para el aislamiento de ARN (véase a continuación). En algunos de los experimentos, la RETE inicial disminuyó hacia el período de tratamiento de 24 h debido a la probable variación en la cantidad de células cultivadas en placa en el inserto.

Medición de la RETE

La integridad de la monocapa se comprobó mediante la medición de la RETE antes y después de cada punto temporal usando el sistema de Millicell-ERS (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) (26). La RETE obtenida a partir de la monocapa y al inserto se le restó la RETE de fondo obtenida del inserto para producir la resistencia de la monocapa y se multiplicó con el área del inserto para obtener el resultado como  $\text{ohm} \times \text{cm}^2$ . Para los experimentos con betaína y probióticos, los resultados se expresan como un porcentaje de cambio en la RETE (% de cambio de la RETE) que refleja el cambio en la resistencia en el punto temporal dado en comparación con un punto temporal de control, que era la misma monocapa celular antes de la aplicación de las sustancias de ensayo.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

El medio se aspiró después de los días 1, 2, 3 y 4 a lo largo del proceso de diferenciación de los queratinocitos o al final del experimento después de 24 horas para los experimentos con betaína o probióticos, y las células se lisaron inmediatamente con tampón RA1 complementado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 1 % (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.). El ARN total se aisló usando el kit de ARN NucleoSpin® 96 (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania). La transcripción inversa se realizó usando SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) con cebadores aleatorios (Invitrogen).

PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real de claudina 4 (CLDN4), ocludina (OCLN), zonula occludens 1 (ZO-1) con ensayos de expresión génica TaqMan (Applied biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) diseñada para cada gen específico en una reacción de amplificación de 20  $\mu\text{l}$  de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el Sistema de PCR en Tiempo Real Rápido 7500 (Applied Biosystems). Como un gen de control endógeno, la proteína ribosómica, grande, P0 (RPLP0) se cuantificó en paralelo en cada experimento (27, 28). La expresión de RPLP0 se sometió a ensayo por primera vez con un extenso conjunto de muestras tratadas diferencialmente y se descubrió que su expresión era constante en diversos tratamientos (datos no mostrados). Los datos se analizaron usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (29) y los resultados se expresan como un aumento en número de veces de la cantidad de ARNm de las muestras desconocidas con respecto a la cantidad de ARNm obtenido para la muestra el día 1 para la diferenciación de queratinocitos o para muestras de control sin tratar para experimentos con betaína y probióticos.

Análisis estadísticos

La significación estadística de las diferencias entre los tratamientos se determinó usando ANOVA de una sola vía. Los valores de P de 0,05 o menos se consideraron significativos. Todas las comparaciones se realizaron con los respectivos controles de medio solamente a menos que se indique lo contrario. La correlación de la RETE y la expresión de los componentes de la unión estrecha durante la diferenciación de queratinocitos se sometió a ensayo con el cálculo de correlación de Pearson. Todos los análisis se calcularon usando GraphPad Prism versión 5,01. Se muestran los valores medios  $\pm$  SE para todos los resultados.

Resultados

La diferenciación de queratinocitos aumentó la integridad de la unión estrecha y la expresión de claudina 4

Se diferenciaron queratinocitos humanos primarios normales aislados de adultos en insertos de cultivo celular con el fin de seguir la formación de unión estrecha entre las células epiteliales mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RETE). La diferenciación de los queratinocitos primarios humanos adultos en insertos de cultivo celular aumentó la RETE en un 84 %, 93 % y 95 % los días 2, 3 y 4 desde el inicio del estudio ( $p < 0,001$  en todos los puntos temporales en comparación con el día 1) (Figura 1). El aumento de la RETE fue dependiente del tiempo con  $r$  de Pearson = 0,7556 ( $p = 0,0003$ ).

Durante el proceso de diferenciación de 4 días se estudió la expresión génica de los componentes de unión estrecha CLDN4, OCLN y ZO-1 en los queratinocitos. La expresión de OCLN y ZO-1 se mantuvo a nivel basal durante todo el proceso de diferenciación, mientras que la expresión de CLDN4 aumentó (Figura 1 b) ( $p < 0,001$  el día 4; en comparación con el día 1). Los valores de RETE se correlacionaron positivamente con la expresión de CLDN4 ( $p < 0,001$ ,  $r$  de Pearson = 0,8093), mientras que no se observó correlación entre la expresión de RETE y ZO-1 o la expresión de RETE y OCLN.

La betaína aumentó la integridad de la unión estrecha de queratinocitos y disminuyó la expresión de ocludina.

El efecto de la betaína sobre queratinocitos diferenciados se estudió mediante la incubación de las células durante 1, 12 y 24 horas desde el lado apical con 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de betaína. La RETE se mantuvo en el nivel basal con la cantidad más baja de betaína, pero aumentó después de 1 hora con 50  $\mu\text{M}$  de betaína ( $p < 0,05$ ) en todas las concentraciones más altas y siguió aumentando después de 12 h ( $p < 0,05$  a  $p < 0,001$ ) (Figura 2a). La

RETE basal aumentó a las 24 h y solo cantidades de 100  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de betaína mostraron un aumento adicional en la RETE del  $41,8 \pm 2,8 \%$  y el  $47,8 \pm 4,2 \%$ , respectivamente ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).

5 Se determinó la expresión de CLDN4 (Figura 2b), OCLN (figura 2c) y ZO-1 (Figura 2 d) en las células incubadas 24 h con 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de betaína. La expresión de CLDN4 y ZO-1 permaneció similar a los niveles basales en las muestras tratadas con betaína. Además, la expresión de OCLN disminuyó en muestras tratadas con betaína 100 y 250  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). A diferencia de la diferenciación basal en este conjunto de datos, la cantidad de OCLN también se correlacionó negativamente con la RETE ( $p < 0,05$ ,  $r$  de Pearson =  $-0,6214$ ).

10 Los probióticos aumentaron la integridad de la unión estrecha de los queratinocitos.

Los queratinocitos diferenciados se trataron con metabolitos probióticos solubles, células bacterianas probióticas enteras o lisados de células bacterianas probióticas durante 1 h, 8 h y 24 h.

15 En comparación con el control de medio de cultivo bacteriano al 10 % (MRS), las muestras de metabolitos solubles incrementaron los valores de RETE (Figura 3a). En el punto temporal de 1 h, la RETE aumentó con todos los metabolitos solubles sometidos a ensayo, con la excepción de que *P. jensenii* P63 produjo metabolitos solubles, que no aumentaron la RETE por encima del nivel del control de medio de cultivo bacteriano al 10 %. El mayor aumento en la RETE con metabolitos probióticos solubles se observó con los metabolitos solubles de *B. lactis* 420, que  
20 aumentaron la RETE un  $20,4 \pm 2,8 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 8 h y un  $80,3 \pm 3,8 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 24 h.

La incubación de queratinocitos con células bacterianas enteras mostró un aumento de la RETE (Figura 4a). La RETE se mantuvo a nivel basal en los queratinocitos tratados con *L. acidophilus* NCFM®, *L. salivarius* Ls-33 y *P. jensenii* P63 a la 1 h y a las 8 h. A las 24 h, el valor de RETE basal del control se redujo sensiblemente con respecto  
25 al valor observado antes del inicio del experimento. Sin embargo, en *L. acidophilus* NCFM® ( $21,4 \pm 4,4 \%$ ,  $P < 0,01$ ), *L. salivarius* Ls-33 ( $42,2 \pm 24,4 \%$ ,  $p < 0,001$ ) y *P. jensenii* P63 ( $33,1 \pm 11,3 \%$ ,  $p < 0,01$ ) el aumento de la RETE por encima del valor basal a las 24 h fue significativo. Por el contrario, en los queratinocitos tratados con *L. acidophilus* La-14, la RETE disminuyó significativamente por debajo del valor basal en un punto temporal de 1 h ( $-38,3 \pm 4,4 \%$ ,  $p < 0,01$ ) y permaneció disminuido durante todo el experimento ( $-43,8 \pm 4,7 \%$ ,  $p < 0,01$  a las 8 h y  $-41,3 \pm 4,1 \%$ , no significativo a las 24 h).  
30

En los queratinocitos tratados con lisados de células bacterianas (Figura 4a) no se observó ninguna disminución similar de la RETE en las muestras tratadas con lisados de *L. acidophilus* La-14 y *B. lactis* 420 como se observó en los queratinocitos tratados con las células enteras respectivas. Sin embargo, en comparación con otros probióticos, éstos mencionados anteriormente, así como el lisado de *P. jensenii* P63 tuvieron un efecto menor, ya que la RETE aumentó significativamente solamente después de 24 h ( $15,2 \pm 3,3 \%$  para lisado de *L. acidophilus* La-14  $p < 0,05$ ;  $13,5 \pm 9,6 \%$  para lisado de *B. lactis* 420  $p < 0,05$ ;  $25,7 \pm 8,0 \%$  para lisado de *P. jensenii* P63  $p < 0,01$ ). El lisado de *L. acidophilus* NCFM® y el lisado de *L. salivarius* Ls-33 tuvieron un efecto más fuerte ya que indujeron un aumento de la RETE ya después de 1 h ( $20,4 \pm 3,2 \%$   $p < 0,05$  y  $20,5 \pm 4,9 \%$   $p < 0,05$ , respectivamente), que se mantuvo elevada a las 8 h ( $23,4 \pm 4,1 \%$ ,  $p < 0,05$  y  $18,3 \pm 5,7 \%$  no significativo, respectivamente), y a las 24 h ( $43,6 \pm 3,0 \%$ ,  $p < 0,001$  y  $33,8 \pm 5,6 \%$ ,  $p < 0,01$ ).  
35  
40

Los probióticos afectaron a la expresión de proteína de unión estrecha de queratinocitos de forma dependiente de la cepa  
45

Se determinó la expresión de la proteína de UE CLDN4, OCLN y ZO-1 de las células tratadas 24 h con metabolitos solubles producidos por los probióticos, bacterias probióticas enteras y lisados celulares.

En el caso de los queratinocitos tratadas con metabolitos solubles se observaron cambios de expresión génica más allá de los cambios en el control de medio de cultivo bacteriano en el caso de CLDN4 (Figura 3b), pero no con OCLN (Figura 3c) o ZO-1 (Figura 3d). Los metabolitos solubles producidos por tres de las cepas de probióticos aumentaron la expresión de CLDN4 en los queratinocitos tratados con metabolitos solubles: *L. acidophilus* La-14 (diferencia en número de veces (DV) =  $9,4 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ , en comparación con medios de cultivo bacterianos), *L. salivarius* Ls-33 (FD =  $12,4 \pm 3,5$ ,  $p < 0,01$ , en comparación con medios de cultivo bacterianos) y *P. jensenii* P63 (DV =  $14,8 \pm 1,3$ ,  $p < 0,01$ , en comparación con medios de cultivo bacterianos). Los metabolitos solubles de *B. lactis* 420 también tienen una tendencia a aumentar la expresión de CLDN4 (DV =  $8,6 \pm 0,05$ ), pero no alcanzó importancia. La expresión de CLDN4 no mostró correlación con los valores de RETE, pero se observó una correlación débil entre ZO-1 y RETE ( $r$  de Pearson =  $-0,5851$ ,  $p < 0,05$ ).  
50  
55

60 En el caso de los queratinocitos tratados con célula bacterianas enteras, no se observó ningún efecto sobre la regulación de CLDN4 (Figura 4b), OCLN (Figura 4c) o ZO-1 (Figura 4d) en estas células, así como ninguna correlación con los valores de RETE.

65 Sin embargo, cuando se usaron lisados de células bacterianas para tratar las células, se observó que el lisado de *L. acidophilus* NCFM® servía para regular positivamente la expresión de OCLN (Figura 4c) (DV =  $2,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) y la expresión de ZO-1 (DV =  $2,8 \pm 0,2$ ,  $p < 0,01$ ). De todos los lisados de células bacterianas, el lisado de *B. lactis*

420 también pudo aumentar la expresión de ZO-1 ( $DV = 2,5 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ). No se observó correlación entre CLDN4 y ZO-1 y la RETE en células tratadas con lisados de células bacterianas, pero se observó una correlación entre la RETE y la expresión de OCLN ( $r$  de Pearson = 0,7107,  $p < 0,05$ ).

## 5 Análisis

Las uniones estrechas forman parte de la barrera de permeabilidad epitelial entre las células de queratinocitos epidérmicos humanos normales en cultivo. La permeación de solutos a través de la UE intacta puede cuantificarse mediante la resistencia eléctrica transepitelial. En estudios de inmunofluorescencia, la diferenciación de los queratinocitos por una concentración de  $Ca^{2+}$  alta indujo la translocación de ocludina, claudina 1 y claudina 4 a líneas continuas superpuestas que circunscribían células individuales, lo que indica que las proteínas se localizan en la UE. Se observó que la expresión de ocludina y de ZO-1 fueron constantes durante la diferenciación inducida por  $Ca^{2+}$  de los queratinocitos epidérmicos, pero la expresión de claudina 4 aumentó establemente. Anteriormente, se había documentado que cuando la estructura de la UE y la barrera de la permeabilidad se alteraban con ocratoxina A en queratinocitos humanos normales, la expresión de la claudina 4 se reducía.

En un estudio comparativo se demostró que la betaína aumentaba los valores de RETE, pero no afectaba a la expresión de las proteínas de unión estrecha estudiadas en el presente documento distintas de ocludina. La retirada de la ocludina mediante la técnica de ARNip dio como resultado una disminución de la RETE (36), pero la inactivación de la ocludina en ratones no altera la función de barrera epidérmica (37) y es muy posible que la expresión reducida de ocludina no esté relacionada con un aumento de la RETE en los queratinocitos tratados con betaína, aunque se observó una débil correlación negativa entre la ocludina y la RETE. Un aumento de la RETE indica que la betaína mejora la integridad de la unión estrecha y podría contribuir a la barrera interior-exterior y al estado de hidratación de la piel también a través de este mecanismo, además de a su función osmolítica. La función de los osmolitos orgánicos en la regulación de la integridad de la barrera también se indica en estudios con taurina y betaína que redujeron los efectos irritantes de los tensioactivos en la epidermis (44).

Los estudios anteriores con los probióticos se han concentrado en cualquiera de los efectos sistémicos o gastrointestinales.

Se observó que los metabolitos solubles producidos por los probióticos afectan a la RETE y a la expresión de las proteínas de unión estrecha de manera diferencial en comparación con las células probióticas enteras o los lisados de células probióticas, un fenómeno que también se ha descrito para las células epiteliales intestinales. En este estudio, la expresión de claudina 4 se reguló fuertemente por metabolitos solubles producidos por probióticos de una manera específica de la cepa, pero no por células probióticas enteras o sus lisados.

En este estudio, se observó una regulación positiva de la ocludina con el lisado de células de *L. acidophilus* NCFM® probiótico, a diferencia de la regulación negativa con betaína. El lisado de *L. acidophilus* NCFM® fue capaz de regular otro gen de la UE, ZO-1, que también fue regulado positivamente por *B. lactis* 420. Se ha observado anteriormente que ZO-1 y ocludina son reguladas por probióticos en células epiteliales intestinales y se ha demostrado que se previno el intestino permeable en la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio en ratones mediante un probiótico *E. coli* Nissle 1917 a través de la regulación positiva de la expresión de ZO-1 (51). Se ha demostrado que ZO-1 estabiliza la barrera de la UE a través de un enlace entre la barrera y el citoesqueleto de actomiosina periunional (30). Los lisados de células probióticas aumentaron los valores de RETE.

La aplicación tópica de probióticos solo afectaría a las capas más superiores de la piel y, por tanto, con el fin de conseguir la penetración en las capas más profundas, los lisados celulares o los metabolitos solubles pueden ser mejores.

Las uniones estrechas son importantes no solo como barrera contra la difusión libre de líquidos, electrolitos y macromoléculas, sino también contra la translocación de microorganismos asociados a la superficie y sus productos secretados (Sousa et al 2005). Podrían usarse lisados de células bacterianas probióticas para potenciar esta barrera sin inducir respuestas inmunitarias patológicas.

En conclusión, se muestra que la betaína y los probióticos son capaces de mejorar la integridad de la UE entre los queratinocitos epidérmicos humanos normales. La potenciación de la barrera cutánea puede ser importante, especialmente en enfermedades en las que la función de barrera está afectada.

## Lista de referencias

- (1) Honari S. *Topical therapies and antimicrobials in the management of burn wounds. Crit Care Nurs Clin North Am* 2004; 16: 1-11.
- (2) Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. *The skin: an indispensable barrier. Exp Dermatol* 2008; 17: 1063-72.

- (3) Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. *An update of the defensive barrier function of skin. Yonsei Med J* 2006; 47: 293-306.
- 5 (4) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol* 2002; 156: 1099-111.
- (5) Brandner JM. *Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 72: 289-94.
- 10 (6) Pummi K, Malmnen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J, Peltonen S. *Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. J Invest Dermatol* 2001; 117: 1050-8.
- 15 (8) Sousa S, Lecuit M, Cossart P. *Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 489-98.
- (9) Holgate ST. *Epithelium dysfunction in asthma. J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1233-44.
- 20 (10) Yamamoto T, Kurasawa M, Hattori T, Maeda T, Nakano H, Sasaki H. *Relationship between expression of tight junction-related molecules and perturbed epidermal barrier function in UVB-irradiated hairless mice. Arch Dermatol Res* 2008; 300: 61-8.
- 25 (13) FAO/OMS. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food.* [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/) 2002 p. 1-11.
- (17) Ouwehand A, Nermes M, Collado M, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. *Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. World Journal of Gastroenterology* 2009; 15: 3261-8.
- 30 (22) Di Marzio L, Cinque B, De Simone C, Cifone MG. *Effect of the lactic acid bacterium Streptococcus thermophilus on ceramide levels in human keratinocytes in vitro and stratum corneum in vivo. Journal of Investigative Dermatology* 1999; 113: 98-106.
- (26) Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. *Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-37.
- 35 (27) Bar M, Bar D, Lehmann B. *Selection and Validation of Candidate Housekeeping Genes for Studies of Human Keratinocytes - Review and Recommendations. Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129: 535-7.
- 40 (28) Minner F, Poumay Y. *Candidate Housekeeping Genes Require Evaluation before their Selection for Studies of Human Epidermal Keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129: 770-3.
- (29) Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods* 2001; 25: 402-8.
- 45 (30) Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. *ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. Mol Biol Cell* 2009; 20: 3930-40.
- (36) Yamamoto T, Saeki Y, Kurasawa M, Kuroda S, Arase S, Sasaki H. *Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. Arch Dermatol Res* 2008; 300: 517-24.
- 50 (37) Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Mol Biol Cell* 2000; 11: 4131-42.
- 55 (44) Nicander I, Rantanen I, Rozell BL, Soderling E, Ollmar S. *The ability of betaine to reduce the irritating effects of detergents assessed visually, histologically and by bioengineering methods. Skin Res Technol* 2003; 9: 50-8.
- (51) Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. PLoS One* 2007; 2:e1308.
- 60

## REIVINDICACIONES

1. Una bacteria probiótica y/o metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la función de la Unión Estrecha, caracterizados porque la bacteria probiótica, metabolito soluble de una bacteria probiótica y/o un lisado celular de una bacteria probiótica están formulados para la administración tópica; en los que la bacteria probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33 y *Propionibacterium jensenii* P63; y/o el metabolito soluble de una bacteria probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33, *Bifidobacterium lactis* 420 y *L. acidophilus* La-14; y/o el lisado celular de la bacteria probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls-33, *Propionibacterium jensenii* P63 y *L. acidophilus* La-14, y en los que el trastorno asociado a la función de la Unión Estrecha se selecciona entre el grupo que comprende psoriasis, acné, dermatitis atópica, piel seca, alergia, erupciones cutáneas, piel irritada por rayos UV, piel irritada por detergentes (incluyendo la irritación causada por enzimas utilizadas en detergentes de lavado y lauril sulfato de sodio) y piel adelgazada (por ejemplo, piel de ancianos y niños) y asma.
2. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, formulados para la administración a la piel.
3. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, formulados para la administración a una membrana mucosa, en los que dicha membrana mucosa se selecciona entre el grupo que consiste en la mucosa de: la vagina, el pene, la uretra, la vejiga, el ano, la boca, la nariz, la garganta, los bronquios, los pulmones, el ojo y la oreja.
4. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que la formulación comprende más de una bacteria probiótica y/o metabolito soluble y/o lisado celular.
5. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que la bacteria comprende al menos una bacteria de ácido láctico.
6. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprenden adicionalmente al menos uno de entre betaína, un poliol (por ejemplo, xilitol o lactitol) y/o un polifenol (por ejemplo, epicatequina o galocatequina).
7. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que la formulación comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que la formulación comprende entre el 0,01 % y el 30 % en peso de bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular.
9. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que la formulación se selecciona entre el grupo que consiste en una crema, loción, pulverización, solución, gel, pomada, pasta, parche, pintura, bioadhesivo o suspensión.
10. La bacteria probiótica, metabolito soluble y/o lisado celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en los que la formulación comprende liposomas, micelas y/o microesferas.

Figura 1

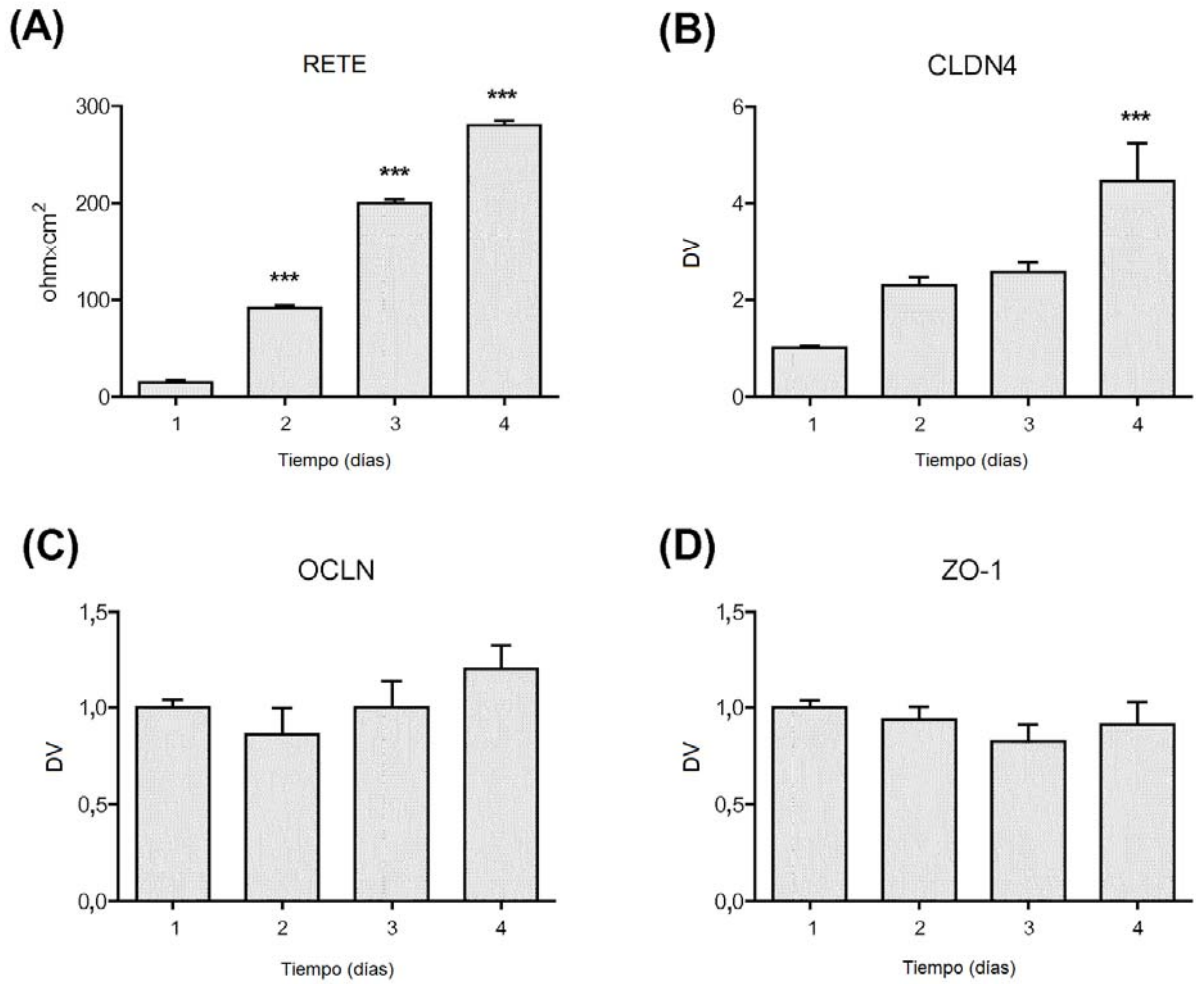




Figura 2

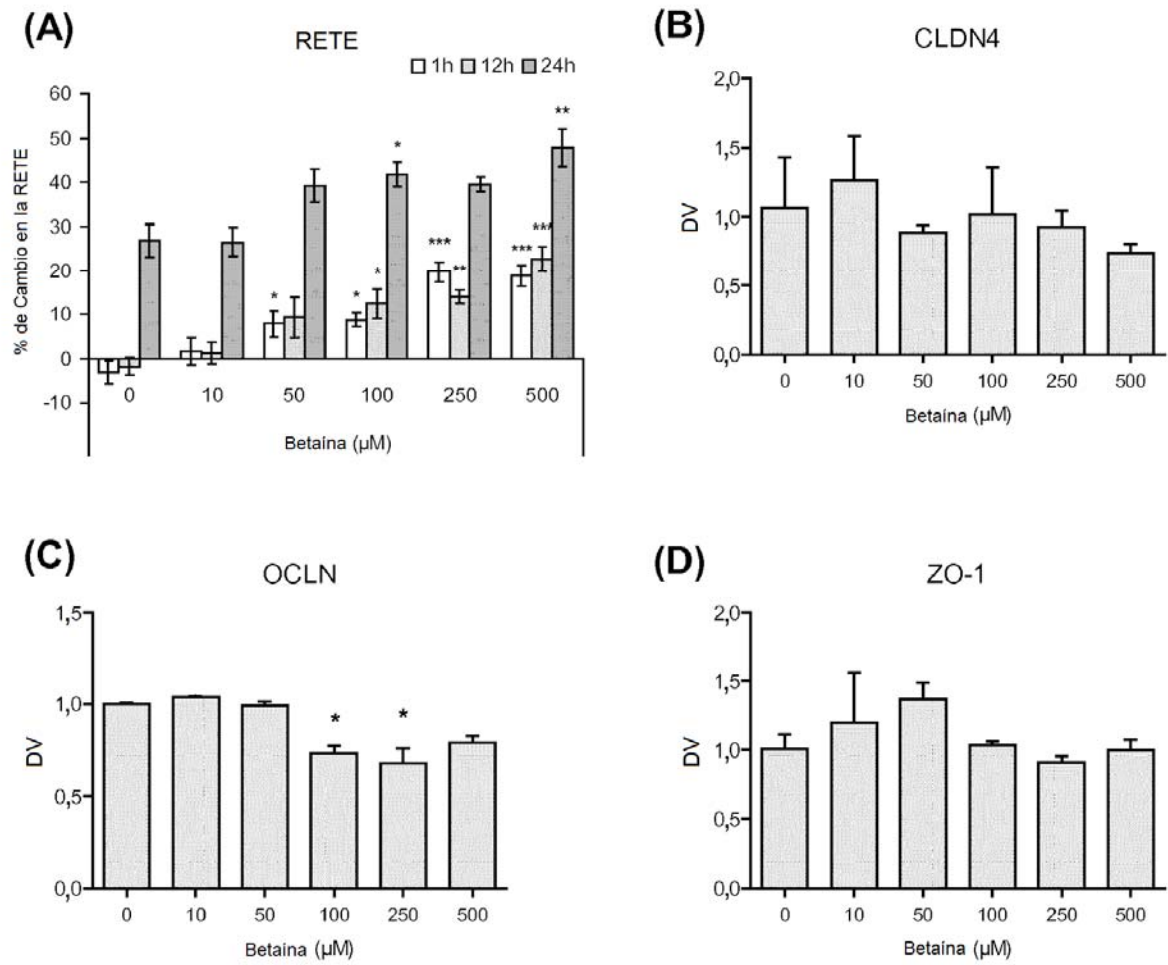
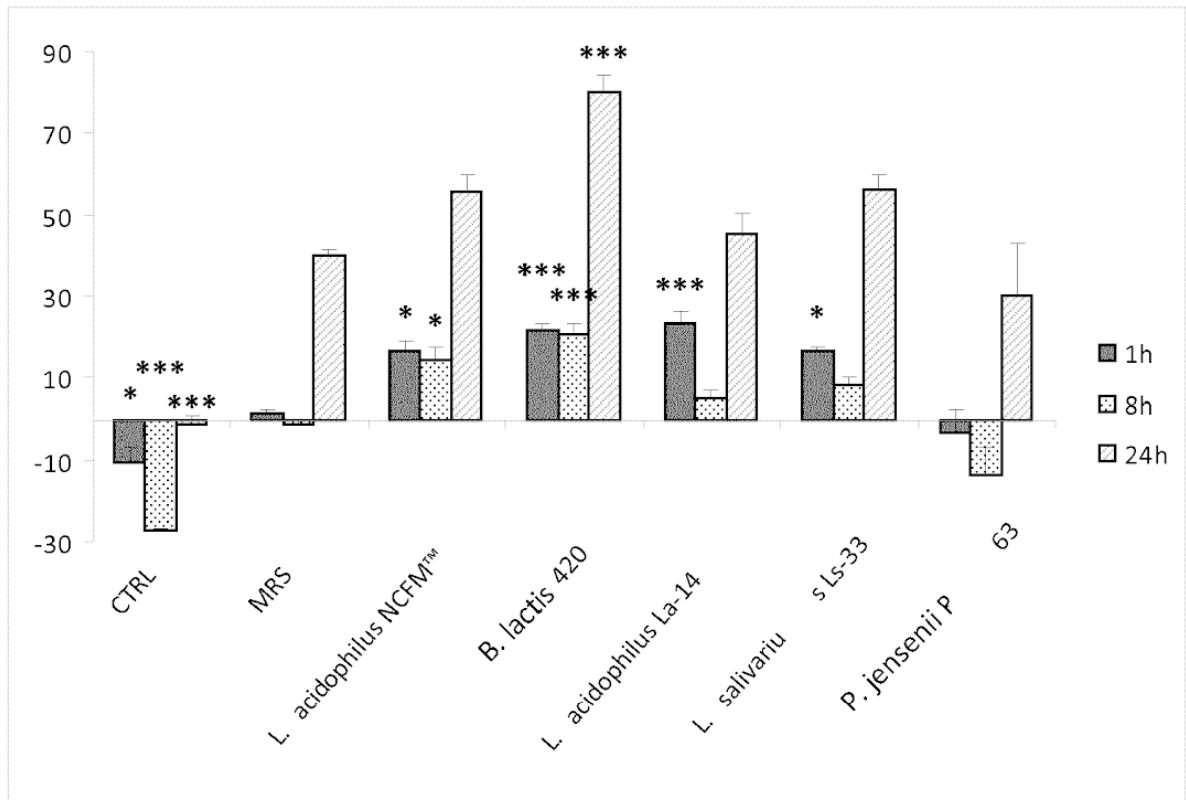


Figura 3

A



B

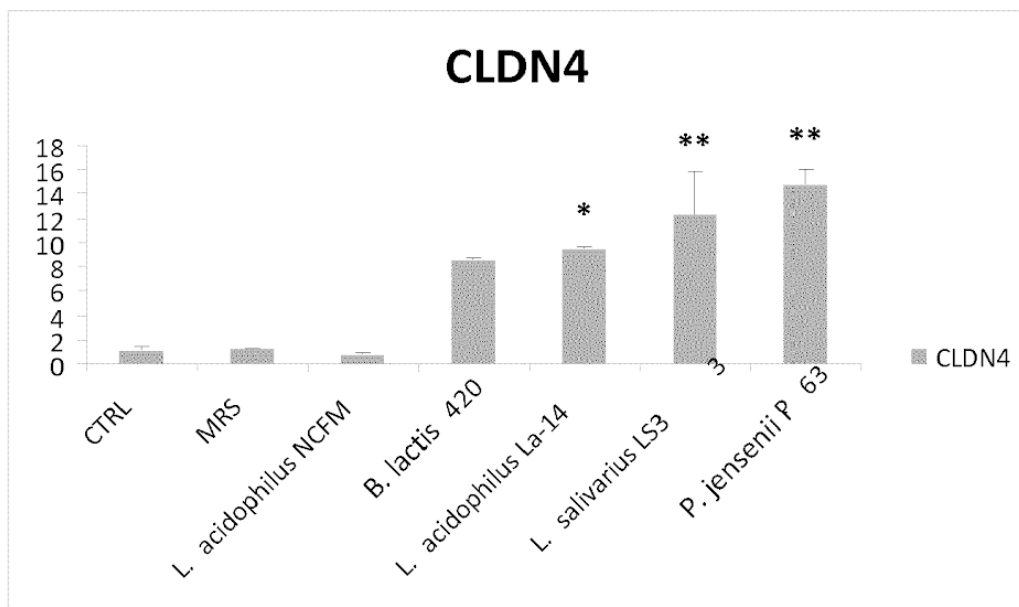
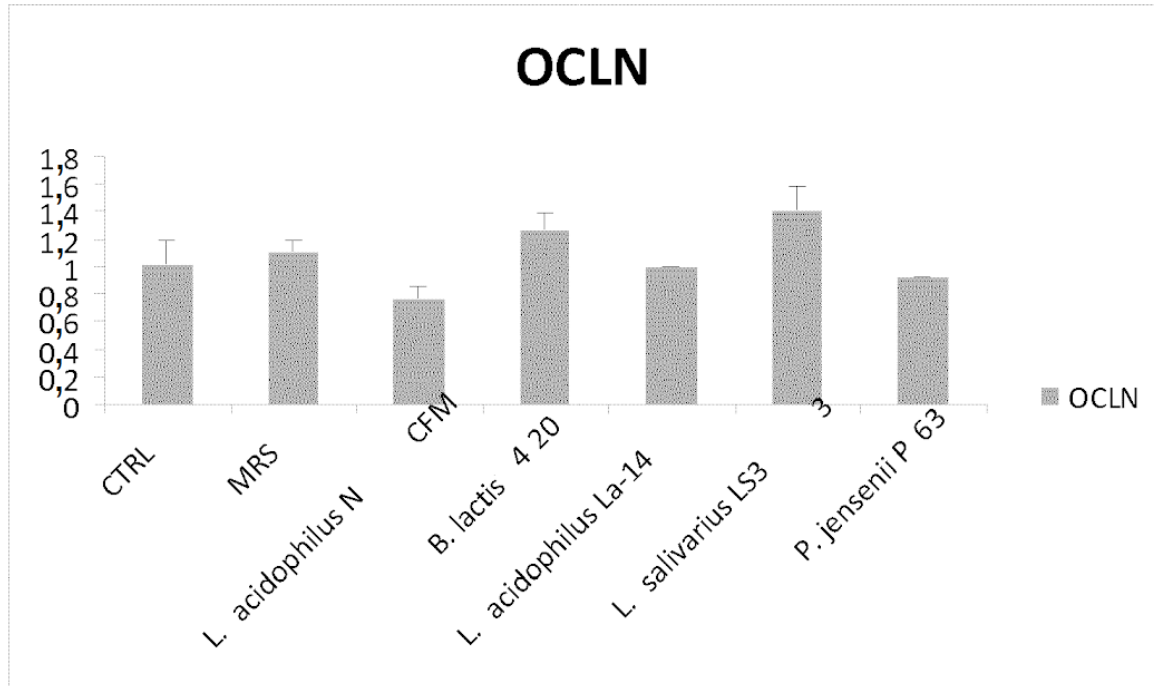


Figura 3 (cont)

C



D

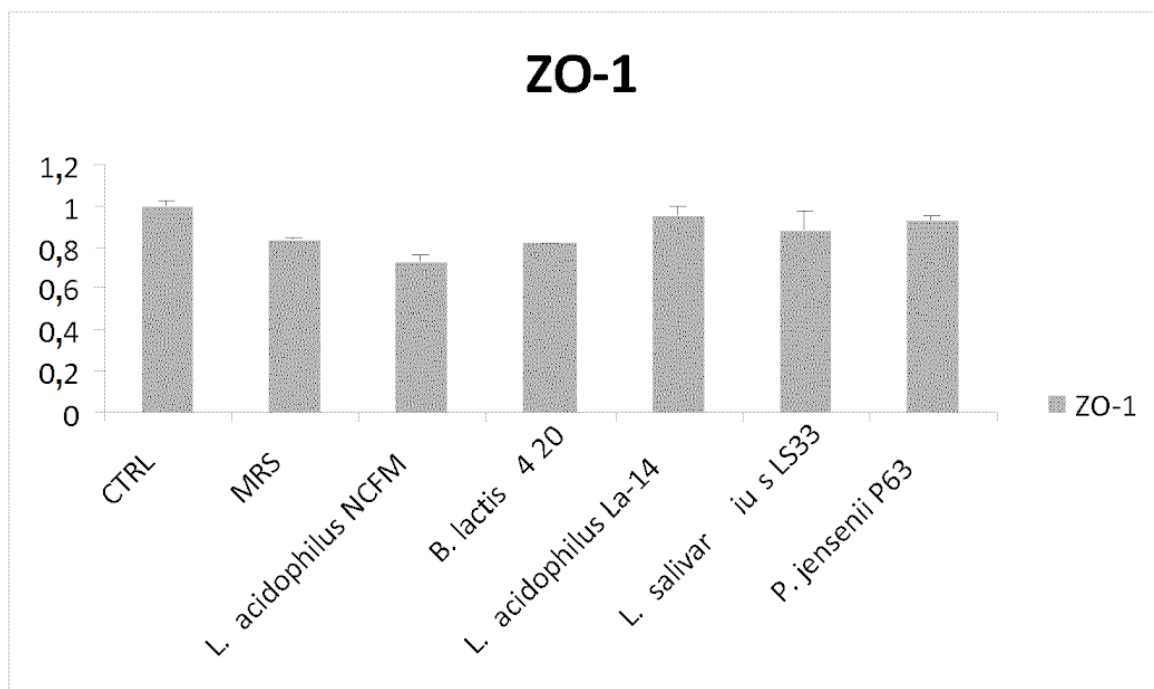
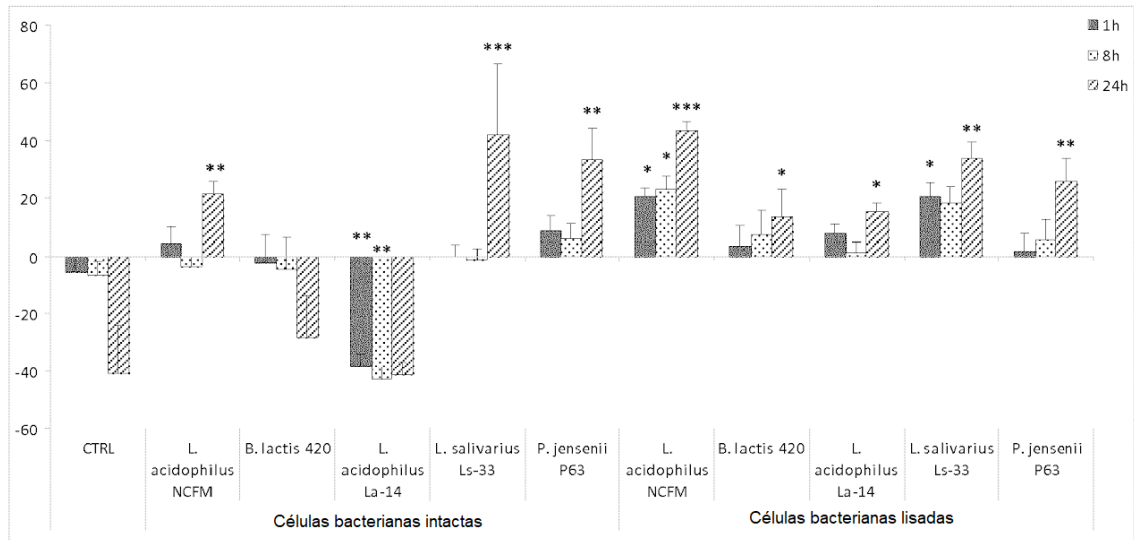


Figura 4

A



B

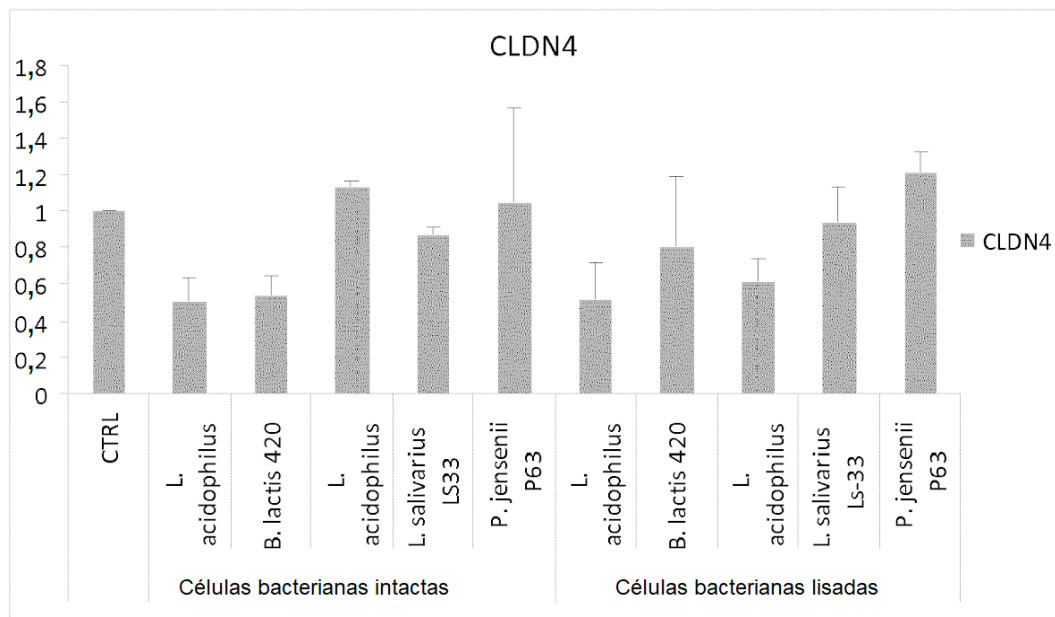
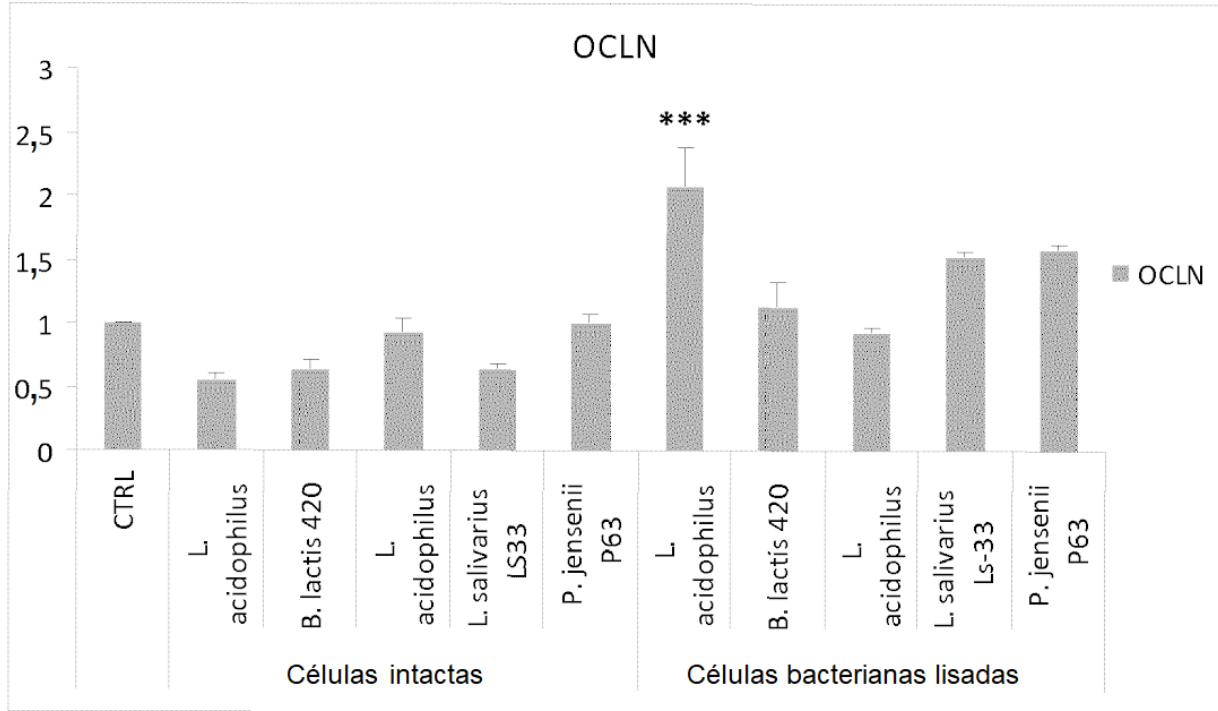


Figura 4 (cont)

C



D

