

(12) BELGISCH UITVINDINGSOCTROOI

(47) Publicatiedatum : 20/02/2018

(21) Aanvraagnummer : BE2016/5454

(22) Indieningsdatum : 21/06/2016

(62) Afgesplitst van basisaanvraag :

(62) Indieningsdatum basisaanvraag :

(51) Internationale classificatie : A61Q 19/00, A61K 35/747, C12R 1/225, A61P 17/00, A61K 8/99, C12R 1/25

(30) Voorrangsgegevens :

(73) Houder(s) :

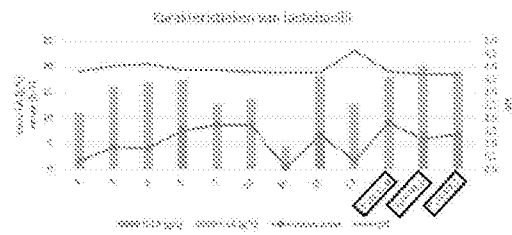
YUN NV
2630, AARTSELAAR
België

(72) Uitvinder(s) :

LEBEER Sarah
2020 ANTWERPEN
BelgiëCLAES Ingmar
2020 ANTWERPEN
BelgiëOERLEMANS Eline
2020 ANTWERPEN
BelgiëVAN DEN BROECK Marianne
2020 ANTWERPEN
België**(54) DERMATOLOGISCHE PREPARATEN VOOR HET ONDERHOUDEN EN/OF HERSTELLEN
VAN EEN GEZONDE HUIDMICROBIOTA**

(57) De huidige uitvinding is gericht op de directe toepassing van nuttige of probiotische bacteriën op de huid om te helpen bij het behoud van een gezonde huidmicrobiota en het herstellen van een onevenwichtige huidmicrobiota. Deze aanvraag is gebaseerd op het gebruik van geselecteerde *Lactobacillus* stammen als antipathogene agentia, in het bijzonder *L. plantarum*, *L. pentosus* en/of *L. rhamnosus* tegen veel voorkomende huidpathogenen, waarbij de geproduceerde zuren zoals melkzuur belangrijke antimicrobiële factoren zijn.

Fig. 1



BELGISCH UITVINDINGSOCTROOI

FOD Economie, K.M.O., Middenstand
& Energie

Publicatienummer: 1024425
Nummer van indiening: BE2016/5454

Dienst voor de Intellectuele Eigendom

Internationale classificatie: A61Q 19/00 A61K 35/747 C12R 1/225
A61P 17/00 A61K 8/99 C12R 1/25
Datum van verlening: 20/02/2018

De Minister van Economie,

Gelet op het Verdrag van Parijs van 20 maart 1883 tot Bescherming van de industriële Eigendom;

Gelet op de wet van 28 maart 1984 op de uitvindingsoctrooien, artikel 22, voor de voor 22 september 2014 ingediende octrooiaanvragen ;

Gelet op Titel 1 "Uitvindingsoctrooien" van Boek XI van het Wetboek van economisch recht, artikel XI.24, voor de vanaf 22 september 2014 ingediende octrooiaanvragen ;

Gelet op het koninklijk besluit van 2 december 1986 betreffende het aanvragen, verlenen en in stand houden van uitvindingsoctrooien, artikel 28;

Gelet op de aanvraag voor een uitvindingsoctrooi ontvangen door de Dienst voor de Intellectuele Eigendom op datum van 21/06/2016.

Overwegende dat voor de octrooiaanvragen die binnen het toepassingsgebied van Titel 1, Boek XI, van het Wetboek van economisch recht (hierna WER) vallen, overeenkomstig artikel XI.19, § 4, tweede lid, van het WER, het verleende octrooi beperkt zal zijn tot de octrooiconclusies waarvoor het verslag van nieuwheidsonderzoek werd opgesteld, wanneer de octrooiaanvraag het voorwerp uitmaakt van een verslag van nieuwheidsonderzoek dat een gebrek aan eenheid van uitvinding als bedoeld in paragraaf 1, vermeldt, en wanneer de aanvrager zijn aanvraag niet beperkt en geen afgesplitste aanvraag indient overeenkomstig het verslag van nieuwheidsonderzoek.

Besluit:

Artikel 1. - Er wordt aan

YUN NV, Berkenlaan 4, 2630 AARTSELAAR België;

vertegenwoordigd door

VERLEYEN Christ'l-Marie, Kempische Steenweg 542A, 3500, HASSELT;

een Belgisch uitvindingsoctrooi met een looptijd van 20 jaar toegekend, onder voorbehoud van betaling van de jaartaksen zoals bedoeld in artikel XI.48, § 1 van het Wetboek van economisch recht, voor:
DERMATOLOGISCHE PREPARATEN VOOR HET ONDERHOUDEN EN/OF HERSTELLEN VAN EEN GEZONDE HUIDMICROBIOTA.

UITVINDER(S):

LEBEER Sarah, Groenenborgerlaan 171, 2020, ANTWERPEN;

CLAES Ingmar, Groenenborgerlaan 171, 2020, ANTWERPEN;

OERLEMANS Eline, Groenenborgerlaan 171, 2020, ANTWERPEN;

VAN DEN BROECK Marianne, Groenenborgerlaan 171, 2020, ANTWERPEN;

VOORRANG :

AFSPLITSING :

Afgesplitst van basisaanvraag :

Indieningsdatum van de basisaanvraag :

Artikel 2. - Dit octrooi wordt verleend zonder voorafgaand onderzoek naar de octrooieerbaarheid van de uitvinding, zonder garantie van de verdienste van de uitvinding noch van de nauwkeurigheid van de beschrijving ervan en voor risico van de aanvrager(s).

Brussel, 20/02/2018,

Bij bijzondere machtiging:

**DERMATOLOGISCHE PREPARATEN VOOR HET ONDERHOUDEN
EN/OF HERSTELLEN VAN EEN GEZONDE HUIDMICROBIOTA**

DOMEIN VAN DE UITVINDING

5

De huidige uitvinding is gericht op de directe topicale toepassing van nuttige of probiotische bacteriën op de huid om te helpen bij het behoud van een gezonde huidmicrobiota en het herstellen van een onevenwichtige huidmicrobiota.

10

Dit herstel van een gezonde microflora valt onder de term probiotherapie, gedefinieerd als het gebruik van nuttige micro-organismen of probiotica om een gezonde microflora te herstellen op de plaats waar het microbiële onevenwicht of dysbiose zich situeert. Deze aanvraag is gebaseerd op het gebruik van geselecteerde *Lactobacillus* stammen als antipathogene agentia, in het bijzonder *L. plantarum*, *L. pentosus* en/of *L. rhamnosus* tegen veel voorkomende huidpathogenen, waarbij de geproduceerde zuren zoals melkzuur belangrijke antimicrobiële factoren zijn.

20

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Bijgevolg was het een doel van de huidige uitvinding om een oplossing te bieden aan personen die lijden aan huidaandoeningen die gelinkt worden aan een afwijkend microbiëel evenwicht op de huid. Hiervoor werd vastgesteld dat de topische toepassing van *L. plantarum*, *L. pentosus* en/of *L. rhamnosus* op de huid zeer effectief is in het herstellen en/of handhaven van een gezonde huidmicrobiota, en dus zeer geschikt is voor het verbeteren van huidaandoeningen in patiënten die daaraan behoefte hebben.

30

Orale formuleringen met *Lactobacillus* stammen zijn eerder gebruikt bij de behandeling van huidaandoeningen zoals

atopische dermatitis. Echter, orale toediening versus rechtstreekse lokale toediening zijn verschillende toedieningsroutes en hebben elk een heel ander onderliggend mechanisme. Bij orale toediening, wordt vooral een gunstig effect op de algemene gezondheid verwacht via immunostimulatie, in tegenstelling tot directe dermatologische of topische (huid) toediening waar concurrentie met 'ongewenste' micro-organismen zal optreden.

5

10

Net als het maagdarmkanaal, herbergt onze huid een unieke microbiële ecosysteem. Het type van micro-organismen dat op de huid voorkomt, hangt af van een combinatie van gastheerfactoren, omgevingsfactoren maar ook de topografische locatie. De rol van de microbiota in huidaandoeningen is nog steeds niet helemaal ontrafeld. Het lijkt echter dat sommige huidaandoeningen gelinkt zijn aan een verstoorde microbiota aangezien antimicrobiële behandelingen de klinische symptomen kunnen verbeteren (Grice & Segre 2011). Bijvoorbeeld, bij acne vulgaris is een correlatie gevonden met de aanwezigheid van *Propionibacterium acnes* (Beylot et al. 2014). Hoewel acne vulgaris een multifactoriële aandoening is, onder andere beïnvloedt door hormonale factoren, lijkt deze *P. acnes* de ontsteking te induceren wat resulteert in ontstoken puistjes, ook wel papels of pustels genoemd. Aangezien *P. acnes* ook wordt aangetroffen op een gezonde huid waar de bacterie geen acne veroorzaakt, impliceert dit dat nog andere factoren een rol spelen, en samen zorgen voor het ontregelen van de samenstelling van de huidmicrobiota naar een overmatige groei van deze bacterie.

15

20

25

30

Een ander voorbeeld van een huidaandoening waarbij de microbiota belangrijk lijkt te zijn is roos (Wang et al 2015; Sugita et al 2015; Grice & Segre 2011). Bij mensen

met roos, is de schimmel *Malassezia* vaak oververtegenwoordigd. Aanwijzingen dat deze schimmel een mogelijke oorzaak van de aandoening is, zijn afkomstig uit het feit dat antimycotische behandeling de symptomen verbeteren. Daarentegen zorgen antibacteriële therapieën niet voor het verminderen van roos. Opnieuw worden verwacht dat andere factoren betrokken zijn bij deze huidaandoening, maar de correlatie met *Malassezia* is intrigerend.

Gelijkaardig als bij roos, lijken schimmelinfecties van de huid met *Candida albicans* of dermatofyten zoals *Trichophyton* spp. Huidaandoeningen die gelinkt zijn aan een dysbiose van de huidmicrobiota aangezien deze soorten ook aanwezig zijn op gezonde proefpersonen. In het geval van Tinea pedis of "Atleetvoet" wordt vaak overgroei van *Trichophyton rubrum* en *T. mentagrophytes* waargenomen.

De productie van melkzuur in combinatie met eventueel andere antimicrobiële componenten zoals bacteriocines lijken te beschermen tegen bovengenoemde infecties en dysbioses en melkzuur lijkt hierbij werkzaam tegen bacteriën, schimmels en zelfs virale pathogenen. Het is om deze reden dat lactobacillen als belangrijk worden beschouwd in de homeostase van het dynamische dermatologische ecosysteem. Potentiële

gezondheidsbevorderende mechanismen van lactobacillen zijn i) het behoud van een gezonde huid-pH (+/- 5,5), met name door de productie van melkzuur; ii) de productie van antimicrobiële componenten en competitieve exclusie van pathogenen; iii) modulatie van de immuunrespons en iv) de versterking van de epitheliale barrière.

Derhalve was het een doel van de huidige uitvinding om een oplossing te bieden voor personen die lijden aan dermatologische aandoeningen gelinkt aan een afwijkend microbiële evenwicht van de huid. Hiervoor werd vastgesteld

dat topisch gebruik op de huid van *L. plantarum*, *L. pentosus* en/of *L. rhamnosus* soort zeer effectief is in het herstellen en/of handhaven van een gezonde microflora op de huid, en dus zeer geschikt is voor het verlichten van dermatologische aandoeningen in patiënten die daaraan
5 behoefte hebben.

Orale formuleringen met *Lactobacillus* stammen zijn eerder gebruikt bij de behandeling van dermatologische
10 aandoeningen. Echter, orale toediening versus rechtstreekse lokale toediening zijn verschillende toedieningsroutes en hebben elk een heel ander onderliggend mechanisme. Bij orale toediening, wordt vooral een gunstig effect op de algemene gezondheid verwacht via immunostimulatie, in
15 tegenstelling tot directe dermatologische of topische (huid) toediening waar concurrentie met 'ongewenste' micro-organismen zal optreden.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

20 In een eerste aspect verstrekt de huidige uitvinding een topische dermatologische formulering met één of meer levende *Lactobacillus* soorten; waarbij ten minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is; meer in het
25 bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen.

In een verder aspect verstrekt de huidige uitvinding een levende *Lactobacillus* soort voor toepassing bij het
30 herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota, via topische toediening, met *L. plantarum* als *Lactobacillus* species; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen.

In nog een ander aspect verstrekt de huidige uitvinding het gebruik van één of meer levende *Lactobacillus* species, in de bereiding van een topische formulering voor de huid voor het herstellen en/of onderhouden van een gezonde
5 huidmicrobiota; waarbij ten minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen.

10

De huidige uitvinding verstrekt ook een werkwijze voor het herstellen en/of onderhouden van een gezonde
huidmicrobiota; met ten minste één stap door het toedienen via topische weg, aan een individu, van een effectieve
15 hoeveelheid van één of meer levende *Lactobacillus* soorten; waarbij ten minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen.

20

In nog een ander aspect verstrekt de huidige uitvinding een formulering die één of meer levende *Lactobacillus* soorten bevat voor gebruik bij het herstellen en/of onderhouden van een gezonde
huidmicrobiota, door topische weg, waarbij
25 *Lactobacillus* species wordt gekozen uit de lijst met *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen, een *L. pentosus* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 1 in het 16S rRNA gen en een *L. rhamnosus*
30 stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 5 in het 16S rRNA gen.

De huidige uitvinding verstrekt verder een *Lactobacillus*

stam die als *L. rhamnosus* YUN-S1.0 werd gedeponeerd onder toegangsnummer LMG P-29611 (gedeponeerd bij BCCM mei, 12 2016).

5 In een bepaald aspect verstrekt de huidige uitvinding een formulering die één of meer *Lactobacillus*-stammen bevat zoals hierboven gedefinieerd.

10 In een specifieke toedieningsvorm is de formulering van de huidige uitvinding een topische dermatologische samenstelling, meer in het bijzonder in de vorm van een gel, crème, schuim, lotion of zalf.

15 In een andere specifieke uitvoeringsvorm verstrekt de huidige uitvinding de *Lactobacillus* stam als hierboven gedefinieerd of een formulering zoals hierboven gedefinieerd; voor gebruik in het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota, via topische toediening.

20 In een bepaald aspect verstrekt de huidige uitvinding een topische toepassing op de huid van één of meer levende *Lactobacillus* soorten via probiotherapie; waarbij de genoemde *Lactobacillus* soorten worden gekozen uit de lijst
25 bestaande uit *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*; meer in het bijzonder bestaat de genoemde probiotherapie uit het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota bij een patiënt die daaraan behoefte heeft.

30 In een andere bijzondere toepassing zijn de genoemde *Lactobacillus* species in de topische toepassingen, werkwijzen en samenstellingen zoals hierin beschreven, *Lactobacillus*-stammen gekozen uit de lijst bestaande uit *L. plantarum* YUN-V2.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG

P-29456 (gedeponeerd bij BCCM op 9 maart 2016), *L. pentosus*
YUN-V1.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29455
(gedeponeerd bij BCCM op 9 maart 2016); en *L. rhamnosus*
YUN-S1.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29611
5 (gedeponeerd bij BCCM op 12 mei 2016).

KORTE BESCHRIJVING VAN DE FIGUREN

Verwijzend naar de bijgeleverde figuren wordt benadrukt dat
10 de getoonde bijzonderheden enkel dienen als voorbeeld en
ter illustratie voor de bespreking van de verschillende
uitvoeringsvormen van de huidige uitvinding. Zij worden
verschafft in de context van wat wordt beschouwd als de
meest nuttige en gemakkelijke beschrijving van de principes
15 en conceptuele aspecten van de uitvinding. In dit opzicht
wordt niet geprobeerd structurele details van de uitvinding
te tonen in meer detail dan noodzakelijk is voor een
fundamenteel begrip van de uitvinding. De beschrijving met
de tekeningen heeft als doel om deskundigen in het
20 vakgebied te tonen hoe de verschillende vormen van de
uitvinding in de praktijk kunnen worden uitgevoerd.

Fig. 1: Kenmerken van lactobacilli met betrekking tot
groei, productie van D- en L-melkzuur (LA) en het verlagen
25 van de pH van het medium.

Fig. 2: Analyse van het antipathogene effect van
supernatans van culturen ('spent culture supernatant' of
SCS) van geselecteerde lactobacilli tegen *Propionibacterium*
30 *acnes*. Groei van de bacteriën (optische densiteit bij
600nm; Y-as) wordt gemeten in functie van de tijd (X-as).
Elke grafiek toont herhalingen van de groei van *P. acnes*.
Er is duidelijk te zien dat zonder toevoeging van
antibiotica of SCS, *P. acnes* snel begint te groeien (NC1).

Analoog als bij toevoeging van erythromycine aan 50µg/ml, zorgt SCS van alle lactobacilli voor inhibitie van groei van *P. acnes* in tegenstelling tot SCS van streptokokken en stafylokokken dat de groei van *P. acnes* niet inhibeert.

- 5 *Erythromycine (50ug/ml); #Erythromycine (5ug/ml);
§Minocycline (20 µg/ml) NC1=medium controle; NC2=MRS op pH4.3; Nummers 1 tot 22 = lactobacilli stammen (voor details zie tabel 1); St=*Streptococcus thermophilus*; Ss=*Streptococcus salivarius*; Se=*Staphylococcus epidermidis*;
10 T0.5=0.5% Tween 80; T1=1% Tween 80.

UITVOERIGE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

De huidige uitvinding is gebaseerd op de ontdekking van specifieke *Lactobacillus*-stammen die kunnen concurreren met
5 de groei van *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*,
Malassezia spp., *Trichophyton* spp. en bacteriën of
schimmels die verbonden zijn met huidaandoeningen zoals
acne vulgaris, roos, *tinea pedis* of andere schimmel- of
10 huidinfecties. De geselecteerde stammen worden hierin
algemeen aangeduid als "YUN" stammen en kunnen concurreren
met de huidpathogenen en daarmee een gezonde huidmicrobiota
herstellen. Dit herstel van een gezonde microflora valt
onder de term probiotherapie, gedefinieerd als het gebruik
van nuttige micro-organismen of probiotica die een gezonde
15 microflora herstellen op de plaats waar de microbiële
dysbiose plaatsvindt

Bijgevolg verstrekt de huidige uitvinding in een eerste
aspect een topische dermatologische formulering die één of
20 meer levende *Lactobacillus* soorten bevat; waarbij ten
minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is;
meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste
97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA
gen.

25 De samenstelling volgens de huidige uitvinding kunnen
verder *Lactobacillus* soorten bevatten zoals bijvoorbeeld
gekozen uit de niet-beperkende lijst: *L. pentosus*, *L.*
gasseri, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L.*
30 *fermentum*, *L. rhamnosus*.

In de context van de huidige uitvinding wordt onder de term
"topisch(e)" begrepen: de lokale aflevering op een bepaalde
plaats van het lichaam, vooral de toediening op een

gespecificeerde plaats op of in het lichaam. In het bijzonder omvat ze de toepassingen via niet-vaste formuleringen zoals crèmes, schuimen, gels, lotions of zalven. De term "topische" is niet bedoeld om
5 toedieningsvormen van vaste preparaten zoals capsules, tabletten te omvatten, ...

Bijgevolg wordt het volgende begrepen onder de term "topisch dermatologisch"; de lokale afgifte van niet-vaste
10 formuleringen direct op de huid. Bij voorkeur worden de samenstellingen volgens de huidige uitvinding aangebracht over een groot oppervlak van de huid om het meest effectief te zijn.

15 In de context van de huidige uitvinding wordt met de term "levende *Lactobacillus* species" bedoeld: levensvatbare *Lactobacillus* soorten, en niet fragmenten, cultuursupernatans of gedode vormen hiervan.

20 In een verder aspect verstrekt de huidige uitvinding een levende *Lactobacillus* soort voor gebruik als probiotherapie van de huid, door topische weg, waarbij de *Lactobacillus* species *L. plantarum* is; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met
25 SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen. Zoals hierboven reeds gedefinieerd, waarbij probiotherapie is bedoeld voor het herstel en/of onderhoud van een gezonde huidmicrobiota in een patiënt die daaraan behoefte heeft.

30 Personen die voordeel kunnen hebben bij deze probiotherapie zijn bijvoorbeeld personen met huidaandoeningen gelinkt aan een verstoorde huidmicrobiota mogelijk door bacteriële of schimmelinfecties en/of dysbioses door overgroei van bepaalde pathogene micro-organismen, zoals acne vulgaris,

tinea pedis, roos, rosaceae, impetigo, ...

Bijgevolg verstrekt de huidige uitvinding in een verder aspect het gebruik van één of meer levende *Lactobacillus* species, in de bereiding van een topische formulering voor
5 de huid voor het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota; waarbij ten minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97%
10 sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen.

De huidige uitvinding verstrekt ook een werkwijze voor het herstellen en/of onderhouden van een gezonde
15 huidmicrobiota; met ten minste één stap door toedienen via topische weg van een effectieve hoeveelheid van één of meer levende *Lactobacillus* soorten aan een individu; waarbij ten minste één van de *Lactobacillus* soorten *L. plantarum* is; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA
20 gen.

In nog een ander aspect verstrekt de huidige uitvinding een formulering die één of meer levende *Lactobacillus* soorten bevat voor gebruik bij het herstellen en/of onderhouden van
25 een gezonde huidmicrobiota, via topische toediening, waarbij *Lactobacillus* species worden gekozen uit de lijst bestaande uit *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*; meer in het bijzonder een *L. plantarum* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA
30 gen; een *L. pentosus* stam met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 1 in het 16S rRNA gen en een *L. rhamnosus* stam die ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 5 in het 16S rRNA gen.

De uitvinding voorziet verder een *Lactobacillus* stam gekozen uit de lijst bestaande uit *L. pentosus* YUN-V1.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29455 (gedeponeerd bij BCCM op 9 maart 2016); *L. plantarum* YUN-V2.0
5 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29456 (gedeponeerd bij BCCM op 9 maart 2016); en *L. rhamnosus* YUN-S1.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29611 (gedeponeerd bij BCCM op 12 mei 2016).

10 De microbiologische 'deposits' die hier worden genoemd, zijn gedaan bij BCCM/LMG of de Belgische gecoördineerde verzamelingen van micro-organisme met correspondentieadres: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Gent, België.

15 *Lactobacillus pentosus* YUN-V1.0 is een 'single colony' isolaat verkregen in ons labo na subcultivatie van een stam, oorspronkelijk een vaginale isolaat van een gezonde vrouw. De 16S rRNA gensequentie (SEQ ID N ° 1) voor stam *L.*
20 *pentosus* YUN-V1.0 werd bepaald door PCR met primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 '- SEQ ID N ° 2) en 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3 '- SEQ ID N ° 3).

YUN-V2.0 en YUN-V3.0 zijn 'single colony' isolaten in ons
25 labo verkregen na subcultivatie van *Lactobacillus plantarum* stammen die oorspronkelijk werden geïsoleerd uit respectievelijk menselijk speeksel en een maissilo. De 16S rRNA gensequentie (SEQ ID N ° 4) voor *L. plantarum* stam YUN-V2.0 werd bepaald door PCR met primers 8F (5'-
30 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 '- SEQ ID N ° 2) en 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3 '- SEQ ID N ° 3).

YUN-S1.0 is een 'single colony' isolaat verkregen in ons labo na subcultivatie van een *Lactobacillus rhamnosus* stam

die oorspronkelijk werd geïsoleerd uit een gezonde persoon.
De 16S rRNA gensequentie (SEQ ID Nr 5) voor stam *L.*
rhamnosus YUN-S1.0 werd bepaald door PCR met primers 8F
(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' - SEQ ID N ° 2) en 1525R (5'-
5 AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' - SEQ ID N ° 3).

Deze specifieke "YUN" stammen kunnen worden gebruikt als
zodanig of bij voorkeur geformuleerd in producten met deze
stammen. Genoemde producten zijn dermatologische
10 toedieningsvormen in het bijzonder in de vorm van niet-vaste
formuleringen zoals crèmes, schuimen, gels, lotions of
zalven.

In het bijzonder verstrekt de huidige uitvinding de boven
15 gedefinieerde "YUN" stammen voor gebruik in probiotherapie,
d.w.z. voor het herstellen en/of onderhouden van een
gezonde huidmicrobiota.

In nog een ander aspect verstrekt de huidige uitvinding een
20 topische toepassing van één of meer levende *Lactobacillus*
soorten als probiotherapie van de huid; waarbij genoemde
Lactobacillus soorten worden gekozen uit de lijst bestaande
uit *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*; meer in het
bijzonder omvat de genoemde probiotherapie het herstellen
25 en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota bij een
patiënt die daaraan behoefte heeft.

In een specifieke toepassing zijn de *Lactobacillus* species
in de topische toepassingen, werkwijzen en samenstellingen
30 zoals hierin beschreven, *Lactobacillus* stammen gekozen uit
de lijst bestaande uit *L. plantarum* YUN-V2.0 gedeponeerd
onder 'deposit number' LMG P-29456 (gedeponeerd bij BCCM op
9 maart 2016); *L. pentosus* YUN-V1.0 gedeponeerd onder
'deposit number' LMG P-29455 (gedeponeerd bij BCCM op 9

maart 2016); en *L. rhamnosus* YUN-S1.0 gedeponeed onder
'deposit number' LMG P-29611 (gedeponeed bij BCCM op 12
mei 2016).

VOORBEELDEN**MATERIAAL EN METHODEN*****Bacteriële stammen en groeiomstandigheden***

5

Lactobacillus stammen (Tabel 1) werden opgegroeid bij 37°C in de Man, Rogosa en Sharpe (MRS) medium (Carl Roth). Alle bacteriën werden niet-schuddend gekweekt en geïnoculeerd uit glycerol stocks (-80 °C). Vaste media bevatten 1,5% (w/v) agar.

10

Tabel 1: De gebruikte bacteriële stammen in dit onderzoek

Species	#	Stam	Relevant genotype of omschrijving	Referentie en/of bron
LACTOBACILLI				
<i>Lactobacillus casei</i>	1	ATCC334	Eigen isolaat na subcultivatie van stam ATCC334	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i>	2	DN-114001	Eigen isolaat afkomstig van commercieel beschikbare gefermenteerde drank (Actimel®) met <i>L. casei</i> DN-114001, bevestigd via sequencing	Commercial probiotic product
<i>Lactobacillus casei</i>	3	Shirota	Eigen isolaat afkomstig van commercieel beschikbare gefermenteerde drank met <i>L. casei</i> Shirota (Yakult®), bevestigd via sequencing	Commercial probiotic product
<i>Lactobacillus pentosus</i>	4	YUN-V1.0	'single colony' isolaat	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	LMG1284	'single colony' isolaat na subcultivatie van <i>L. plantarum</i> ATCC8014 or LMG1284	ATCC
<i>Lactobacillus reuteri</i>	6	RC-14	Eigen isolaat afkomstig van commercieel beschikbaar	Commercial probiotic product

			probiotisch supplement met <i>L. reuteri</i> RC-14, bevestigd via sequencing	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7	YUN-S1.0	Wild-type stam, geïsoleerd van een menselijk stoelgangstaal	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12	GR-1	Eigen isolaat afkomstig van commercieel beschikbaar probiotisch supplement met <i>L. rhamnosus</i> GR-1	(Chan et al. 1984; 1985; Reid 1999; Reid & Bruce 2001), ATCC
<i>Lactobacillus helveticus</i>	14	AMB-2	'single colony' isolaat	Commercial probiotic product
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	YUN-V2.0	'single colony' isolaat	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	16	5057	'single colony' isolaat	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	LMG12586	'single colony' isolaat na subcultivatie van LMG12586	BCCM/LMG
<i>Lactobacillus plantarum</i>	22	/	'single colony' isolaat	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	25	LMG8041	'single colony' isolaat	BCCM/LMG
PATHOGENEN				
<i>Trichophyton rubrum</i>		/	Klinisch isolaat	BCCM/LMG
<i>Malassezia furfur</i>		/	Klinisch isolaat	BCCM/LMG
<i>Candida albicans</i>		/ /	Klinisch isolaat	

Bereiding van 'spent culture supernatant' (SCS) van de geselecteerde stammen

5 Om cultuursupernatans (SCS) te verkrijgen met de
 gesecreteerde actieve antimicrobiële componenten, werd
 groeimedium specifiek voor elke soort geïncubeerd vanuit
 een precultuur en geïncubeerd gedurende 24 uur. SCS werd
 verkregen door centrifugatie gedurende 30 min. aan 6797 g
 10 (8000 rpm) bij 4 °C. Daarna werd het SCS
 gefiltersteriliseerd (0,20 µm celluloseacetaat, VWR).

Antimicrobiële activiteit van levende lactobacilli in coculturen met Malassezia furfur, Trichophyton rubrum, Propionibacterium acnes en Candida albicans.

5 De antimicrobiële activiteit van de geselecteerde bacteriën werd onderzocht door middel van standaard antimicrobiële testen met enkele kleine wijzigingen. De antimicrobiële activiteit van de geselecteerde bacteriën werd onderzocht door een 'spot assay' (Schillinger en Lücke 1989). Kort
10 samengevat, 1-3 µl van elke kweek werd gespot op een agarplaat. Deze platen werden gedurende 24 tot 72 uur geïncubeerd afhankelijk van de stam. Vervolgens werd een overnachtcultuur van de pathogeen verdund in 7 ml 'soft agar' van het medium van de pathogeen en uitgegoten over de
15 platen met de 'spots' van de geselecteerde stammen. De platen werden overnacht geïncubeerd bij 30-37 °C, waarna de inhibitiezones werden gemeten. Een 'spot' van miconazol (voor schimmels) en/of 0,1% hexetidine en/of tetracycline (voor *Propionibacterium acnes*) werd toegevoegd aan de plaat
20 als positieve controle vooraleer de 'soft agar' werd gegoten.

'Radial diffusion' test van SCS van lactobacilli

25 Bovendien werd de antimicrobiële activiteit van het cultuursupernatans (SCS) onderzocht met een protocol zoals eerder beschreven voor competitie-testen tussen lactobacilli en gastro-intestinale pathogenen (Coconnier et al. 1997). Miconazol (voor schimmels) en tetracycline (voor
30 *Propionibacterium acnes*) werden gebruikt als een positieve controle. Steriel groeimedium werd gebruikt als negatieve controle.

Antimicrobiële activiteit van SCS van de geselecteerde stammen tegen *Candida*, *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur* and *Trichophyton spp* (verder aangehaald als 'pathogenen') met behulp van spectrofotometrische bepalingen in de tijd

Spectrofotometrische bepalingen in de tijd werden eveneens uitgevoerd zoals eerder beschreven (De Keersmaecker et al. 2006) met kleine modificaties. Kort samengevat werd een overnachtcultuur van de bacterie toegevoegd aan de 'wells' van een microtiterplaat gevuld met 50-80% van het gepaste medium en 50-5% SCS lactobacillen. MRS bij pH 4,3 en antibiotica en antimycotica in de juiste concentratie werden respectievelijk gebruikt als negatieve en als positieve controle. Bacteriën of schimmels werden gekweekt en de optische dichtheid (OD) werd gemeten bij 590 nm elke 30 min gedurende 3 dagen met een Synergy HTX multimodus reader (Biotek). Elke test werd ten minste in drievoud gemeten en de gemiddelde OD werd berekend. De antimicrobiële activiteit werd uitgedrukt als de relatieve optische densiteit bereikt na 24 uur (stationaire fase) in vergelijking met de negatieve controles.

Antibiogram met behulp van Kirby-Bauer test

Gevoeligheid voor antibiotica werd geëvalueerd met behulp van de Kirby-Bauer diffusietest. In het kort werden antibiotica gespot op papieren schijfjes en werd de bacteriële inhibitiezone gemeten op agarplaten. De geteste antibiotica waren erythromycine, normocin, tetracycline, ampicilline en clindamycine bij relevante concentraties.

Klinische studie ('proof-of-concept') bij patiënten met acne vulgaris

Een 'proof-of-concept' klinische studie werd uitgevoerd op
5 20 patiënten met acne vulgaris. De patiënten waren mannen
tussen 12-25 jaar met milde inflammatoire acne. Het doel
van deze 'proof-of-concept' studie was om het effect van
een topische probiotische crème (met $\pm 10^8$ kolonievormende
10 eenheden (CFU) van *L. pentosus* YUN-V1.0, $\pm 10^8$ CFU *L.*
plantarum YUN-V2.0 en $\pm 10^8$ CFU *L. rhamnosus* YUN-S1.0 per
toepassing van 1g van de topische crème (ACN) te beoordelen
op de huidmicrobiota en op de acne. Patiënten werden
gevraagd om de crème tweemaal daags aan te brengen
gedurende 56 dagen (8 weken). De patiënten werden gezien
15 door een dermatoloog bij de start (voor de therapie) en op
week 4, week 8 en week 10. Een huiduitstrijkje werd genomen
bij elk bezoek. Bacterieel DNA werd geïsoleerd uit deze
monsters door de commerciële Mobio Powersoil kit (cfr.
'Human Microbiome Project'). Geïsoleerd DNA werd
20 geanalyseerd via 16S rRNA amplicon sequencing met MiSeq
Illumina en een bio-informatische analyse werd uitgevoerd.
Bovendien werd een klinische scoring uitgevoerd en een foto
genomen bij elk bezoek.

25 **Klinische studie ('proof-of-concept') bij patiënten met tinea pedis ('zwemmerseczeem')**

Een 'proof-of-concept' klinische studie werd uitgevoerd op
20 patiënten met tinea pedis. De patiënten waren tussen de
18-65 jaar met tinea pedis. Het doel van deze 'proof-of-
30 concept' studie was om het effect van een topische
probiotische crème (met $\pm 10^8$ kolonievormende eenheden
(CFU) van *L. pentosus* YUN-V1.0, $\pm 10^8$ CFU *L. plantarum*
YUN-V2.0 en $\pm 10^8$ CFU *L. rhamnosus* YUN-S1.0 per toepassing
van 1g van de actueel crème (FNG) te beoordelen op de

huidmicrobiota en de *Trichophyton*-infectie. Patiënten werden gevraagd om de crème tweemaal daags aanvragen 56 dagen (8 weken). De patiënten werden gezien door een dermatoloog bij de start (voor de therapie) en op week 4, week 8 en week 10. Een huiduitstrijkje werd genomen bij elk bezoek. Bacterieel DNA werd geïsoleerd uit deze monsters door de commerciële Mobio Powersoil kit (cfr. 'Human Microbiome Project'). Geïsoleerd DNA werd geanalyseerd via 16S rRNA amplicon sequencing met MiSeq Illumina en een bio-informatische analyse werd uitgevoerd. Voor analyse van de aanwezigheid van de schimmels werden de uitstrijkjes ook uitgeplaat op *Trichophyton*-specifiek medium (medium voorgesteld door BCCM). Kolonie PCR werd uitgevoerd met behulp van universele ITS ('internal transcribed region') primers ITS1 (SEQ ID Nr 6) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') en ITS4 (SEQ ID Nr 7) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), gevolgd door sequentiebepaling om de schimmels te identificeren. Bovendien werd een klinische scoring uitgevoerd en werd een foto genomen bij elk bezoek.

RESULTATEN

Groeikarakteristieken en lactaatproductie

Mogelijk nuttige of probiotische stammen werden
5 gekarakteriseerd in termen van groeikarakteristieken,
lactaatproductie en de mogelijkheid van het verlagen van de
pH van het medium. Deze eigenschappen worden verwacht van
belang te zijn voor de antipathogene activiteit. Deze
gegevens tonen aan dat *Lactobacillus pentosus* YUN-V1.0, *L.*
10 *plantarum* YUN-V2.0 en *L. rhamnosus* YUN-S1.0 de hoogste
hoeveelheid melkzuur produceren (Fig 1).

Antipathogene activiteit tegen *Propionibacterium acnes*

Kinetische experimenten werden uitgevoerd voor de analyse
15 van de antimicrobiële activiteit van cultuurnsupernatans
(SCS) van de geselecteerde stammen tegen *Propionibacterium*
acnes. SCS van alle geteste lactobacilli remde de groei van
Propionibacterium acnes terwijl SCS van andere
bacteriesoorten zoals *Streptococcus thermophilus* en *S.*
20 *salivarius*, beiden ook melkzuurbacteriën, en *Staphylococcus*
epidermidis de groei van *P. acnes* niet inhibeerden. Dit
suggereert dat de soort- en stam-specifieke eigenschappen
van de geselecteerde lactobacillen belangrijk zijn voor de
antipathogene activiteit tegen *P. acnes* (Fig 2).

25

Antipathogene activiteit tegen *Malassezia*, *Trichophyton* and *Candida*

In een volgende fase werden de gunstige of probiotische
bacteriën gescreend op het antipathogene effect tegen
30 specifieke huidpathogenen. De resultaten van de 'spot
assays' tegen *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* en
Candida albicans worden weergegeven in tabel 2, 3 en 4
respectievelijk.

Tabel 2: 'Spot assay' van de geselecteerde lactobacilli tegen *Malassezia furfur*.

Stam	<i>Malassezia furfur</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	++	-	+
2	++	-	+
3	+	+	-
4	++	+++	++
5	+++	++	++
6	+	++	++
7	++	-	-
12	+	-	-
13	+	-	+
14	-	+	-
15	+++	+++	+++
16	++	++	++
17	-	+	-
22	+++	++	++
25	++	++	+

*drie onafhankelijke herhalingen

5 **Tabel 3:** 'Spot assay' van de geselecteerde lactobacilli tegen *Trichophyton rubrum*.

Stam	<i>Trichophyton rubrum</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	+	++	+++
2	+	++	++
3	+	++	++
4	++	++	+++
5	++	++	+++
6	-	-	+++
7	++	+++	+
12	++	+++	+++
13	++	-	-
14	+	++	++
15	+++	+++	+++
16	++	+++	+++
17	+	+++	++
22	++	+++	+++
25	++	+++	+++

*drie onafhankelijke herhalingen

Tabel 4: 'Radial diffusion assay' van de geselecteerde lactobacilli tegen *Candida albicans*.

Stam	<i>Candida albicans</i>		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
1	-	-	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	++	++	++
5	+	+	+
6	-	-	-
7	+	+	++
12	+	+	+
13	/	/	/
14	+	-	-
15	+	+	++
16	+	+	+
17	-	-	-
22	/	/	/
25	/	/	/

*drie onafhankelijke herhalingen

- 5 Cultuursupernatans van *L. pentosus* YUN-V1.0 en *L. plantarum* YUN-V2.0 werd ook getest in 'radial diffusion assays' en bleek efficiënt in het inhiberen van de groei van *Malassezia*, *Trichophyton* en *Candida*. *L. rhamnosus* YUN-S1.0 bleek niet zo efficiënt bij het remmen van de groei van
- 10 *Malassizia* maar wel van *Trichophyton* en *Candida*.

Antibiogram met behulp van Kirby-Bauer test

- De geselecteerde bacteriën werden ook getest op hun gevoeligheid voor antibiotica om verspreiding te voorkomen
- 15 van antibioticaresistentiegenen. Alle lactobacilli waren gevoelig voor erythromycine, normocin, tetracycline, ampicilline en clindamycine, behalve *L. plantarum* 5057, die niet gevoelig bleek voor tetracycline. Daarom werd stam *L. plantarum* 5057 niet geschikt bevonden als een stam voor
- 20 probiotherapie.

REFERENTIES

- 5 Beylot, C. et al., 2014. Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 28(3), pp.271-8.
- Chan, R.C. et al., 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by Lactobacillus whole cells and cell wall fragments. *Infection and immunity*, 47(1), pp.84-9.
- 10 Chan, R.C., Bruce, A.W. & Reid, G., 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *The Journal of urology*, 131(3), pp.596-601.
- 15 Grice, E.A. & Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), pp.244-53.
- Reid, G., 1999. The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65(9), pp.3763-3766.
- 20 Reid, G. & Bruce, A.W., 2001. Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *The Journal of infectious diseases*, 183 Suppl , pp.S77-80.
- Sugita, T. et al., 2015. Temporal changes in the skin Malassezia microbiota of members of the Japanese Antarctic Research Expedition (JARE): A case study in Antarctica as a pseudo-space environment. *Medical mycology*, 53(7), pp.717-24.
- 25 Wang, L. et al., 2015. Characterization of the major bacterial-fungal populations colonizing dandruff scalps in Shanghai, China, shows microbial disequilibrium. *Experimental dermatology*, 24(5), pp.398-400.
- 30

LIJST MET SEQUENTIES

- <110> YUN NV
- 5 <120> DERMATOLOGISCHE PREPARATEN VOOR HET ONDERHOUDEN EN/OF HERSTELLEN VAN EEN GEZONDE HUIDMICROBIOTA
- <130> AXC-007
- 10 <160> 7
- <170> BiSSAP 1.3
- <210> 1
- 15 <211> 1406
- <212> RNA
- <213> Lactobacillus pentosus
- <220>
- 20 <223> 16S rRNA sequentie
- <400> 1
- | | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| | cttaggcggc | tggttcctaa | aaggttaccc | caccgacttt | gggtgttaca | aactctcatg | 60 |
| | gtgtgacggg | cgggtgtgtac | aaggcccggg | aacgtattca | ccgcggcatg | ctgatccgcg | 120 |
| 25 | attactagcg | attccgactt | catgtaggcg | agttgcagcc | tacaatccga | actgagaatg | 180 |
| | gctttaagag | attagcttac | tctcgcgagt | tcgcaactcg | ttgtaccatc | cattgtagca | 240 |
| | cgtgtgtagc | ccaggtcata | aggggcatga | tgatttgacg | tcatccccac | cttcctccgg | 300 |
| | tttgtcaccg | gcagtctcac | cagagtgcc | aacttaatgc | tggcaactga | taataaggtt | 360 |
| | tgcgctcggt | gcgggactta | acccaacatc | tcacgacacg | agctgacgac | aaccatgcac | 420 |
| 30 | cacctgtatc | catgtccccg | aagggaaact | ctaactctct | agatttgcat | agtatgtcaa | 480 |
| | gacctggtaa | ggttcttcgc | gtagcttcga | attaaaccac | atgctccacc | gcttgtgcgg | 540 |
| | gcccccgtea | attcctttga | gtttcagcct | tgcggccgta | ctccccaggc | ggaatgctta | 600 |
| | atgcggttagc | tgcagcactg | aagggcggaa | accctccaac | acttagcatt | catcgtttac | 660 |
| | ggtatggact | accaggggat | ctaactcctg | ttgctacca | tactttcgag | cctcagcgtc | 720 |
| 35 | agttacagac | cagacagccg | ccttcgccac | tgggtgttct | ccatatact | acgcatttca | 780 |
| | ccgctacaca | tggagttcca | ctgtcctctt | ctgcactcaa | gtttcccagt | ttccgatgca | 840 |
| | cttcttcggt | tgagccgaag | gctttcacat | cagacttaaa | aaaccgcctg | cgctcgcttt | 900 |
| | acgcccata | aatccggaca | acgcttgcca | cctacgtatt | accgcggctg | ctggcacgta | 960 |
| | gtagccgctg | gctttctggt | taaataccgt | caataacctga | acagttactc | tcagatatgt | 1020 |
| 40 | tcttctttaa | caacagagtt | ttacgagccg | aaacccttct | tcaactcacgc | ggcgttgctc | 1080 |
| | catcagactt | tcgtccattg | tggaagattc | cctactgctg | cctcccgtag | gagtttgggc | 1140 |
| | cgtgtctcag | tcccattgtg | gccgattacc | ctctcaggtc | ggctacgtat | cattgccatg | 1200 |
| | gtgagccggt | accccaccat | ctagctaata | cgccgcggga | ccatccagaa | gtgatagccg | 1260 |
| | aagccatctt | tcaaactcgg | accatgcggt | ccaagttggt | atgcggtatt | agcatctggt | 1320 |
| 45 | tccaggtggt | atcccccgct | tctgggcagg | tttcccacgt | gttactcacc | agttcgccac | 1380 |
| | tcaactcaat | gtaaatcatg | atgcaa | | | | 1406 |
- <210> 2
- 50 <211> 20
- <212> DNA
- <213> Kunstmatige Sequentie
- <220>
- 55 <223> Primer 8F
- <400> 2
- | | | | | | | | |
|--|------------|------------|--|--|--|--|----|
| | agagtttgat | cctggctcag | | | | | 20 |
|--|------------|------------|--|--|--|--|----|

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Kunstmatige Sequentie
 5
 <220>
 <223> Primer 1525R
 <400> 3
 10 aaggaggtga tccagccgca 20
 <210> 4
 <211> 1425
 15 <212> RNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <220>
 <223> 16S rRNA
 20
 <400> 4
 ggttcctaaa aggttaccce accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacgggc 60
 ggtgtgtaca aggcccgga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga ttactagcga 120
 ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg ctttaagaga 180
 25 ttagcttact ctgcgaggt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac gtgtgtagcc 240
 caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttctccgggt ttgtcaccgg 300
 cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt gcgctcgttg 360
 cgggacttaa cccaacatct cagcacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtatcc 420
 atgtccccga agggaacgtc taatctctta gatttgcata gtatgtcaag acctggtaag 480
 30 gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg cccccgtaa 540
 ttcttttgag tttcagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa tgcgttagct 600
 gcagcactga agggcggaaa cctccaaca cttagcattc atcgtttacg gtatggacta 660
 ccagggtatc taatcctggt tgctaccat actttcgagc ctacagcgtca gttacagacc 720
 agacagcgc cttegccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac cgctacacat 780
 35 ggagttccac tgctctcttc tgcactcaag tttcccagtt tccgatgcac ttcttcgggt 840
 gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgttcta cgcccaataa 900
 atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag ttagccgtgg 960
 ctttctgggt aaataaccgtc aatacctgaa cagttactct cagatatggt cttctttaac 1020
 aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 1080
 40 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggccc gtgtctcagt 1140
 cccaatgtgg ccgattacc tctcaggctc gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 1200
 ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 1260
 caagetcgga ccattgctgc caagttgta tgccgtatta gcatctgttt ccaggtgta 1320
 tccccgctt ctgggcagggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaatg 1380
 45 taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcgtt cgact 1425
 <210> 5
 <211> 1403
 50 <212> RNA
 <213> Lactobacillus rhamnosus
 <220>
 <223> 16S rRNA
 55
 <400> 5
 gtcgacgagt tctgattatt gaaagggtgct tgcactctga ttaattttg aacgagtgcc 60
 ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc cottaagtgg gggataacat ttggaaacag 120
 atgctaatac cgcataaata caagaaccgc atggttcttg gctgaaagat ggcgtaagct 180
 60 atcgcttttg gatggaccgc cggcgatta gctagttggt gaggtaacgg ctaccaagg 240
 caatgatacg tagccgaact gagagggtga tcggccacat tgggactgag acacggccca 300

5 aactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca 360
acgccgcgtg agtgaagaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttggttga gaagaatggt 420
cggcagagta actgttgtcg gcgtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt 480
gccagcagcc gcggttaatac gtaggtggca agcgttatcc ggatttattg ggcgtaaagc 540
gagcgcagge ggTTTTTTaa gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgcac 600
cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa 660
tgcgtagata tatggaagaa caccagtggtc gaaggcggct gtctgggtctg taactgacgc 720
tgaggctcga aagcatgggt agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa 780
10 cgatgaatgc taggtggttg agggtttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc 840
attccgcctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaa ggaattgacg ggggcccgca 900
caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtccttgac 960
atcttttgat cacctgagag atcaggtttc cccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca 1020
tggttgctcg cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080
15 tatgactagt tgccagcatt tagttgggca ctctagtaag actgccggtg acaaaccgga 1140
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta 1200
caatggatgg tacaacgagt tgcgagaccg cgaggtcaag ctaatctctt aaagccattc 1260
tcagttcggg ctgtaggctg caactcgcct acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg 1320
atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaac caccgcccgt cacaccatga 1380
20 gagtttgtaa caccgaagc cgg 1403

25 <210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Kunstmatige Sequentie

30 <220>
<223> Primer Sequentie

<400> 6
tccgtaggtg aacctgcgg 19

35 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Kunstmatige Sequentie

40 <220>
<223> Primer Sequentie

<400> 7
tcctccgctt attgatatgc 20

45

CLAIMS

1. Een topische dermatologische formulering die één of
meer levende *Lactobacillus* soorten bevat; waarbij ten
5 minste één van de *Lactobacillus* species een *L.*
plantarum stam is met ten minste 97%
sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA
gen.

- 10 2. Een levende *Lactobacillus* species voor gebruik bij
het herstellen en/of onderhouden van een gezonde
huidmicrobiota, door topische toediening, waarbij het
Lactobacillus species een *L. plantarum* stam is met
ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4
15 in het 16S rRNA gen.

- 20 3. Gebruik van één of meer levende *Lactobacillus*
species, in de bereiding van een topische
dermatologische formulering voor het herstellen en/of
25 onderhouden van een gezonde huidmicrobiota; waarbij
ten minste één van de *Lactobacillus* species een *L.*
plantarum stam is met ten minste 97%
sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA
gen.

- 30 4. Methode voor het herstellen en/of onderhouden van een
gezonde huidmicrobiota; met ten minste één stap door
toediening via topische weg van een effectieve
hoeveelheid van één of meer levende *Lactobacillus*
soorten aan een individu; waarbij ten minste één van
de *Lactobacillus* species een *L. plantarum* stam is met
ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4
in het 16S rRNA gen.

5. Een formulering die één of meer levende *Lactobacillus* soorten bevat voor gebruik bij het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota, door topische toediening, waarbij een *Lactobacillus* species wordt gekozen uit de lijst bestaande uit *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*; waarbij de *L. plantarum* een *L. plantarum* stam is met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 4 in het 16S rRNA gen, waarbij de *L. pentosus* een *L. pentosus* stam is met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 1 in het 16S rRNA gen en de *L. rhamnosus* een *L. rhamnosus* stam is met ten minste 97% sequentiegelijkheid met SEQ ID N ° 5 in het 16S rRNA gen.
6. Een *Lactobacillus* stam die *L. rhamnosus* YUN-S1.0 is die gedeponeerd werd onder 'deposit number' LMG P-29611 (gedeponeerd bij BCCM op 12 mei 2016).
7. Een formulering die een *Lactobacillus* stam bevat zoals gedefinieerd in claim 6.
8. De formulering volgens claim 7; waarbij de formulering een topische dermatologische formulering is.
9. Het gebruik volgens claim 3 of de formulering volgens een van de claims 1, 5, 7 of 8 waarbij de formulering een topische dermatologische formulering is in de vorm van een gel, crème, ovule, zetpil, schuim, lotion of zalf.
10. Een *Lactobacillus* stam volgens claim 6 of een formulering volgens één der claims 7 of 8; voor

gebruik in het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota, door topische toediening.

- 5 **11.** Topische toepassing van één of meer levende *Lactobacillus* soorten in probiotherapie van de huid; waarbij de genoemde *Lactobacillus* soorten worden gekozen uit de lijst bestaande uit *L. plantarum*, *L. pentosus* en *L. rhamnosus*.
- 10 **12.** Topische toepassing volgens claim 11; waarbij probiotherapie bestaat uit het herstellen en/of onderhouden van een gezonde huidmicrobiota bij een patiënt die daaraan behoefte heeft.
- 15 **13.** Topisch gebruik volgens één van de claims 11 of 12, het gebruik volgens claim 3, met de werkwijze zoals gedefinieerd in claim 4, de levende *Lactobacillus* soorten zoals gedefinieerd in claim 2, of de formulering volgens claim 5; waarbij de genoemde
20 *Lactobacillus* soort een *Lactobacillus* stam is gekozen uit de lijst bestaande uit *L. plantarum* YUN-V2.0 gedeponeerd onder 'deposit number' LMG P-29456; *L. pentosus* YUN-V1.0 met 'deposit number' LMG P-29455; en *L. rhamnosus* YUN-S1.0 met 'deposit number' LMG P-
25 29611.

DERMATOLOGISCHE PREPARATEN VOOR HET ONDERHOUDEN EN/OF
HERSTELLEN VAN EEN GEZONDE HUIDMICROBIOTA

ABSTRACT

5

De huidige uitvinding is gericht op de directe toepassing van nuttige of probiotische bacteriën op de huid om te helpen bij het behoud van een gezonde huidmicrobiota en het herstellen van een onevenwichtige huidmicrobiota. Deze
10 aanvraag is gebaseerd op het gebruik van geselecteerde *Lactobacillus* stammen als antipathogene agentia, in het bijzonder *L. plantarum*, *L. pentosus* en/of *L. rhamnosus* tegen veel voorkomende huidpathogenen, waarbij de geproduceerde zuren zoals melkzuur belangrijke
15 antimicrobiële factoren zijn.

Betreffende Item V

Beargumenteerde verklaring met betrekking tot nieuwheid, inventiviteit of industriële toepasbaarheid; referenties en toelichting ter ondersteuning van deze verklaring

Er wordt verwezen naar de volgende documenten:

- D1 WO 01/13956 A2 (GANEDEN BIOTECH INC [US]; FARMER SEAN [US]) 1 maart 2001 (2001-03-01)
- D2 EP 2149 368 A1 (OREAL [FR]; NESTEC SA [CH]) 3 februari 2010 (2010-02-03)
- D3 EP 1 736 537 A1 (ORGANOBALANCE GMBH [DE]) 27 december 2006 (2006-12-27)
- D4 WO 2013/188626 A2 (DOW GLOBAL TECHNOLOGIES LLC [US]) 19 december 2013 (2013-12-19)
- D5 EP 2332 521 A1 (OREAL [FR]; NESTEC SA [CH]) 15 juni 2011 (2011-06-15)
- D6 KR 2012 0089530 A (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]) 13 augustus 2012 (2012-08-13); & DATABASE Geneseq [Online]
11 april 2013 (2013-04-11),
Kim MS et al.: "Lactobacillus plantarum strain MH19 16S ribosomal RNA",
Database accession no. BAK32313
- D7 KR 2015 0075447 A (JUNG LAB CO LTD [KR]; KIM SUNG OK [KR]) 6 juli 2015 (2015-07-06)
- D8 WO 2016/023688 A1 (NESTEC SA [CH]) 18 februari 2016 (2016-02-18)
- D9 WO 2011/052996 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP [KR]; KIM BONG JOON [KR]; JUNG HEON WOONG [KR]; LE) 5 mei 2011 (2011-05-05)

Betreffende Item IV

Geen eenheid

De conclusies worden geacht drie uitvindingen te betreffen, aangeduid als volgt, en de aanvraag wordt geacht een gebrek aan eenheid van uitvinding te vertonen:

1. Conclusies 1-4 (geheel) en 5, 9, 11-13 (gedeeltelijk)

De conclusies hebben betrekking op *Lactobacillus plantarum*: Topische toepassing van *Lactobacillus plantarum* in probiotherapie van de huid (conclusie 11). Topische dermatologische samenstelling, omvattende *Lactobacillus plantarum* en overeenkomstige toepassingen.

2. Conclusies 5, 9, 11-13 (gedeeltelijk)

De conclusies hebben betrekking op *Lactobacillus pentosus*: Topische toepassing van *Lactobacillus pentosus* in probiotherapie van de huid (conclusie 11). Topische dermatologische samenstelling, omvattende *Lactobacillus pentosus* en overeenkomstige toepassingen.

3. Conclusies 6-8 en 10 (geheel) en 5, 9, 11-13 (gedeeltelijk)

De conclusies hebben betrekking op *Lactobacillus rhamnosus*: Topische toepassing van *Lactobacillus rhamnosus* in probiotherapie van de huid (conclusie 11). De stam YUN-S1.0 (conclusie 6) en het gebruik daarvan bij het herstellen of onderhouden van gezonde huid.

De redenen waarom de uitvindingen niet zodanig met elkaar zijn verbonden dat zij één algemeen inventief concept vormen zijn als volgt:

Een aanvraag dient betrekking te hebben op uitsluitend één enkele uitvinding of een uitvindingengroep die zodanig is verbonden dat een enkel algemeen inventief concept wordt gevormd, i.e. ten minste één gemeenschappelijke technische maatregel die een bijdrage ten opzichte van de bekende stand van de techniek levert.

In de onderhavige aanvraag is het gemeenschappelijke technische concept dat de verschillende onafhankelijke conclusies verbindt, het voorzien in of het gebruik van een levende *Lactobacillus* soort die geschikt is voor gebruik in een topische dermatologische samenstelling.

Soorten van het *Lactobacillus* geslacht worden bijvoorbeeld gebruikt als melkzuurproducerende bacteriën in topische farmaceutische formuleringen (bijvoorbeeld *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, WO0113956 (D1: conclusies 1-3)). Het gebruik van levende *Lactobacillus plantarum* soorten in topische samenstellingen is reeds algemeen bekend in de stand van de techniek (zie eveneens bijvoorbeeld EP 2 149 368 A1, EP 1 736 537 A1, WO 2013/188626 A2, EP 2 332 521 A1 (D2-D5)).

Het concept is derhalve niet nieuw of inventief.

Derhalve is het voor de onderzoeksafdeling niet duidelijk welke technische maatregel de verschillende uitvindingengroepen als boven gedefinieerd gemeenschappelijk hebben, i.e. welke een inventieve bijdrage ten opzichte van de bekende stand van de techniek levert.

Het technische probleem dat aan de onderhavige aanvraag ten grondslag ligt, wordt beschouwd als het voorzien in een Lactobacillus stam die kan worden gebruikt in topische samenstellingen voor het herstel of onderhoud van gezonde huid. Gezien de verschillende soorten/stammen die door iedere uitvindingengroep als boven geïdentificeerd worden gebruikt, wordt door de onderzoeksafdeling geacht dat iedere groep naar een verschillend technisch probleem en oplossing verwijst, waardoor derhalve een bezwaar aangaande de eenheid van uitvinding voor de onderhavige serie conclusies wordt gemaakt.

In het volgende wordt uitvinding 1 (conclusies betreffende Lactobacillus plantarum) onderzocht.

Nieuwheid en inventiviteit (uitvinding 1)

1) De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens de conclusies 1-5, 9 en 11-13 niet nieuw is.

In D6 (figuur 5, [21, 47], conclusies 1-7) wordt Lactobacillus plantarum SY99 (KCTC11766BP) in zalven of emulsies geopenbaard. Het 16s RNA gen van deze stam (figuur 5) is voor 100% identiek aan seq. ID nr. 4 volgens de onderhavige aanvraag. Het gebruik van levende bacteriën blijkt impliciet uit D6 ([21], conclusies). De formuleringen zijn geschikt voor topisch dermatologisch gebruik en liggen binnen het bereik van conclusie 1.

In D7 [conclusie 4] wordt Lactobacillus plantarum MB01 in een lotion of crème geopenbaard, hetgeen eveneens binnen het bereik van conclusie 1 ligt.

De materie volgens conclusie 1 wordt derhalve geanticipeerd door D6-D7 en omvat geen nieuwheid. De materie volgens de conclusies 2-5, 9 en 11-13 wordt eveneens direct geopenbaard in deze documenten of blijkt impliciet daaruit.

Bovendien doen D1, D2, D4 en D5 eveneens de nieuwheid van de conclusies 11 en 12 teniet.

2) Opmerking aangaande inventiviteit:

Aangezien de conclusies geen maatregel bevatten die nieuw is ten opzichte van de stand van de techniek, is eveneens geen inventiviteit aanwezig. Voor de inventieve verdienste van de aanvraag wordt echter het volgende opgemerkt:

In D1, D2, D8 en D9 worden *Lactobacillus plantarum* stammen geopenbaard die worden gebruikt voor het verbeteren van huidgezondheid en/of in cosmetische samenstellingen. De sequentie van het 16sRNA van deze stammen is niet bekend. Uit dit verschil blijkt echter geen technisch gevolg. Zelfs indien nieuwheid kan worden vastgesteld ten opzichte van het gebruik van deze stammen, zou de selectie van een stam met 97% sequentiegelijkheid in het 16sRNA gen worden geacht een willekeurige selectie van een groot aantal evengoed mogelijke oplossingen te zijn, hetgeen geen inventiviteit omvat.

Eveneens wordt opgemerkt dat doorgaans ofwel het probiotische micro-organisme zelf wordt gebruikt in cosmetische samenstellingen, of fermenten, lysaten of kweeksupernatanten daarvan. In de conclusies van de onderhavige aanvraag wordt het gebruik van "levende" bacteriën gespecificeerd. In de aanvraag wordt echter geen gevolg getoond van het gebruik van levende bacteriën ten opzichte van geïnactiveerde bacteriën, kweeksupernatanten of extracten. Deze maatregel wordt derhalve niet geacht geschikt te zijn om inventiviteit te kunnen vaststellen.

Octrooieerbaarheid/Conclusies met betrekking tot medisch gebruik

Conclusie 4 betreft een werkwijze voor het chirurgisch / therapeutisch behandelen van het menselijk / dierlijk lichaam. Derhalve is de materie volgens deze conclusie niet octrooieerbaar. Conclusies die een product betreffen, in het bijzonder stoffen of samenstellingen voor gebruik in een eerste of latere medische behandeling kunnen echter toelaatbaar zijn.

Betreffende Item VIII

Verdere opmerkingen (duidelijkheid)

Het is niet duidelijk of de uitdrukking "probiotherapie van de huid" al dan niet betrekking heeft op topische toediening of eveneens andere toedieningswijzen omvat.