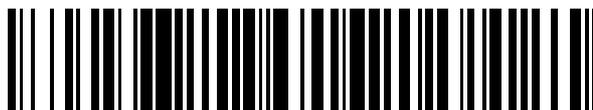


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 172**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05795238 .4**

96 Fecha de presentación: **17.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1812023**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Bacterias del ácido láctico como cepas probióticas y composiciones que contienen las mismas**

30 Prioridad:

22.10.2004 WO PCT/EP2004/011980

22.10.2004 WO PCT/EP2004/011981

10.02.2005 WO PCT/EP2005/001354

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

05.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

05.12.2012

73 Titular/es:

GRAF, FEDERICO, DR. (100.0%)

Sempacherstrasse 19

8032 Zürich, CH

72 Inventor/es:

GRAF, FEDERICO;

GROB, PHILIPP y

BRASSART, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 392 172 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 del ácido láctico como cepas probióticas y composiciones que contienen las mismas.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de nuevas cepas de bacterias probióticas en el tratamiento de dolencias infecciosas provocadas por diversos patógenos en mamíferos, más específicamente la prevención y/o el tratamiento de infecciones genitourinarias y/o gastrointestinales en seres humanos.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones genitourinarias siguen siendo un problema común, particularmente en la población femenina. Se reconoce la adherencia bacteriana al epitelio genitourinario como un mecanismo importante en el inicio y la patogenia de infecciones de las vías urinarias (UTI, *urinary tract infection*) y, en particular, de infecciones vaginales. Los patógenos genitourinarios se originan predominantemente en el tracto intestinal y colonizan inicialmente la región peruretral y ascienden al interior de la vejiga, dando como resultado bacteriuria sintomática o asintomática. Alternativamente, estas bacterias invaden y luego colonizan la vagina provocando allí diversos tipos de infecciones vaginales sintomáticas así como asintomáticas. Por tanto, dependiendo de factores del huésped y factores de virulencia bacteriana, los organismos pueden ascender adicionalmente y dar lugar a pielonefritis, respectivamente infecciones ascendentes del aparato genital en mujeres. Los patógenos genitourinarios expresan características de virulencia que les permite resistir los mecanismos de defensa del huésped eficaces normalmente.

20 El uso de bacterias de la flora autóctona, tales como lactobacilos, para no permitir que los patógenos genitourinarios colonicen el aparato genitourinario es un concepto establecido estudiado de manera bastante extensa desde hace años (véanse, por ejemplo, el documento EP 0 956 858, Cadieux *et al.* - Lactobacillus strains and vaginal ecology - Jama. 287:1940-41 / 2002; Butler BC, Beakley JW. Bacterial flora in vaginitis. Am J Obstet Gynaecol 1960;78:432-40, Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM *et al.* Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1989; 27:251-6, Sobel JD, Cook RL, Redondo-Lopez V. Lactobacilli: a role in controlling the vaginal microflora? en Horowitz BJ, Mardh P-A, eds. Vaginitis and Vaginosis, págs. 47-53. Nueva York: Wiley-Liss, 1991, Lauritzen C, Graf F, Mucha M. Restoration of the physiological vaginal environment with Doederlein bacteria and estriol. Frauenarzt 1984; 4).

30 Por otro lado, las infecciones gastrointestinales siguen siendo un problema común en la población humana. Se ha reconocido la adherencia bacteriana al epitelio gastrointestinal como un mecanismo importante en el inicio y la patogenia de infecciones del tracto gastrointestinal (IGI). Muchos patógenos gastrointestinales que colonizan el tracto intestinal pueden, dependiendo de factores del huésped y factores de virulencia bacteriana, expresar características de virulencia que les permite resistir los mecanismos de defensa del huésped eficaces normalmente.

35 El uso de bacterias que se originan a partir de la microflora autóctona, como por ejemplo lactobacilos, para no permitir que los patógenos colonicen el tracto gastrointestinal es un concepto que se ha estudiado de manera bastante extensa (véase, por ejemplo, Alain Servin en "Antagonist activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens - FEMS Microbiology Reviews 2004 - en impresión, disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science>). Algunas de las cepas de bacterias del ácido láctico mencionadas en la bibliografía anterior se han destacado por su efecto en el tracto gastrointestinal y se han propuesto como posibles agentes activos adecuados para tratar diversas dolencias o trastornos provocados por patógenos, por ejemplo, diarrea.

40 El objetivo principal de una terapia con agentes bacterianos debe ser prevenir el sobrecrecimiento de patógenos hasta un momento en que pueda reestablecerse la microflora vaginal o intestinal normal. Además, la terapia probiótica se considera "natural" y sin efectos secundarios en contraposición a tratamientos químicos o antibióticos convencionales.

45 Dentro de ese contexto, se ha observado de manera sorprendente que cepas de bacterias del ácido láctico representativas de la flora vaginal humana sana que mostraron eficacia en el tratamiento de infecciones genitourinarias (véase la solicitud de patente internacional PCT/EP2004/011980 presentada el 22.10.04 por Medinova AG, CH-Zürich) también actuaron y en consecuencia son útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de infecciones intestinales o trastornos iniciados por patógenos gastrointestinales.

50 Actualmente, a pesar de los progresos que ya se han realizado con relación al conocimiento íntimo de cepas de bacterias del ácido láctico (BAL), sus propiedades y su uso potencial en el área probiótica, todavía sigue habiendo una necesidad de proponer bacterias más convenientes y más eficaces, concretamente cepas de bacterias probióticas para la comunidad médica.

55 El fin de esta invención es proporcionar probióticos nuevos y útiles particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos provocados por diversos patógenos, concretamente infecciones o enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal en mamíferos, especialmente seres humanos, respectivamente del aparato genitourinario en mujeres, o

en la restauración de una flora genitourinaria o intestinal equilibrada y sana tras, por ejemplo, tratamientos médicos intensos como los realizados con antibióticos o agentes quimioterápicos.

La invención

Como un primer objeto, la invención proporciona cepas de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1.

5 La invención también se refiere a composiciones probióticas según la reivindicación 2.

Aparecerán objetos adicionales y más específicos de esta invención a lo largo del transcurso de la descripción a continuación en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

10 Las cepas de bacterias probióticas usadas dentro del marco de esta invención se han seleccionado en primer lugar por su capacidad para adherirse a células epiteliales tales como Caco-2 o HeLa de cuello uterino que se eligieron como modelos. La adhesión celular es, en efecto, una característica de selección que es un requisito esencial ya que condiciona la capacidad de dichas cepas para colonizar tejidos epiteliales, por ejemplo el del tracto genitourinario, y luego competir con, inhibir o no permitir la adhesión de patógenos de tal ubicación específica.

15 Estas cepas muestran además una resistencia significativa, es decir, una tasa de supervivencia cuando se exponen al entorno gástrico altamente ácido y una resistencia de realmente buena a excelente cuando se exponen también a enzimas como pepsina y pancreatina; estas propiedades garantizan la supervivencia necesaria de las cepas seleccionadas en toda su progresión dentro del tracto gastrointestinal.

20 Dichos probióticos se han seleccionado además por su capacidad adicional para inhibir la adhesión, el crecimiento e incluso la supervivencia de patógenos, concretamente patógenos genitourinarios y gastrointestinales de células epiteliales. Los patógenos Gram-negativos o Gram-positivos tales como los mencionados más adelante en el presente documento son representativos de los que se ven afectados significativamente por los probióticos de esta invención en cuanto a la adhesión, el crecimiento o la actividad patógena: especies de *Salmonella*, como *S. enterica serovar Typhimurium*, *E. coli*, especies de *Streptococcus*, por ejemplo *S. agalactiae*, especies de *Staphylococcus* como *S. aureus*, especies de *Gardnerella*, por ejemplo *G. vaginalis*, especies de *Prevotella*, por ejemplo *P. bivia*; esta enumeración no es por supuesto, exhaustiva.

25 Las cepas de bacterias probióticas usadas según la presente invención también tienen la capacidad para inhibir la internalización de patógenos, concretamente patógenos Gram-negativos o Gram-positivos genitourinarios o gastrointestinales dentro de células epiteliales. Las BAL más eficaces dentro de ese marco son las que expresan altas cantidades tanto de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como de ácido láctico *in situ* cuando ambos factores actúan sinérgicamente. Estas últimas han demostrado ser en efecto, altamente eficaces frente a patógenos genitourinarios anaerobios como, por ejemplo, especies de *Gardnerella* y *Prevotella*.

30 Las cepas de bacterias probióticas anteriores, eventualmente, muestran una característica importante adicional, es decir la capacidad para modular la respuesta inmunitaria de células inmunocompetentes, por ejemplo células de la membrana mucosa gastrointestinal, en otras palabras la capacidad para iniciar, estimular o reforzar la respuesta inmunitaria de dichas células cuando se infectan por patógenos o bien Gram-negativos o bien Gram-positivos como los mencionados anteriormente en el presente documento, por ejemplo *E. coli*. patógena genitourinaria. Debido a sus características específicas, dichas cepas de BAL tienen por consiguiente la capacidad para inhibir el síndrome inflamatorio de células inmunocompetentes cuando se exponen a contaminación por patógenos.

35 De manera bastante interesante, esa característica específica realiza la modulación de la respuesta inmunitaria a la que se hizo referencia anteriormente en el presente documento usando dos rutas distintas, es decir mediante la inducción de citocinas o bien proinflamatorias o bien antiinflamatorias como IL 10, respectivamente, IL 12, TNF o IFN. Se ha observado adicionalmente que algunas cepas de BAL de esta invención muestran un alto potencial de inducción de IFN γ , concretamente *L. acidophilus* KS 116.1 y *L. gasseri* KS 124.3, una característica que favorece el uso de las mismas como agentes antiinfecciosos.

40 Esa especificidad de cepa proporciona, por consiguiente, al experto en la técnica la posibilidad de seleccionar la cepa o combinación de cepas más apropiada para realizar el tratamiento médico que se prevé.

Las cepas de bacterias del ácido láctico de la presente invención se seleccionan de:

- *L. gasseri* KS 120.1, depositado el 4 de junio de 2004 en la CNCM del Instituto Pasteur con número de registro CNCM I-3218, y

50 - *L. gasseri* KS 124.3, depositado el 4 de junio de 2004 en la CNCM del Instituto Pasteur con número de registro CNCM I-3220.

Estas cepas también son representativas de la microflora vaginal humana sana.

Otras cepas dadas a conocer:

L. gasseri KS 114.1 (CNCM I-3482): Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 10,5 g/l - producción de H₂O₂ de 10 mg/l

Prueba API 50 CHI: positivo para GAL, GLU, FRU, MNE, NAG, ESC, SAL, CEL, MAL, SAC, TRE y GEN

5 negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, LAC, MEL, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

L. gasseri KS 120.1 (CNCM I-3218): Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 10,6 g/l - producción de H₂O₂ de 1 mg/l

10 Prueba API 50 CHI: positivo para GAL, GLU, FRU, MNE, AMY, ESC, SAL, CEL, MAL, LAC, SAC, TRE y AMD

negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, NAG, ARB, MEL, INU, MLZ, RAF, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

15 **L. gasseri KS 124.3 (CNCM I-3220):** Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 17,0 g/l - producción de H₂O₂ de 20 mg/l

Prueba API 50 CHI: positivo para: GAL, GLU, FRU, MNE, NAG, ESC, SAL, MAL, SAC y TRE - variable para: RIB, AMD, GEN y 5KG

20 negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, CEL, LAC, MEL, INU, MLZ, RAF, GLYG, XLT, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT y 2KG

L. crispatus KS 116.1 (CNCM I-3483): Gram-positivo - negativo para catalasa - positivo para oxidasa - producción de ácido láctico de 9,6 g/l - producción de H₂O₂ de 2 mg/l

Prueba API 50 CHI: positivo para GAL, FRU, MNE, NAG, ESC, SAL, MAL y SAC

25 negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX, GAL, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, CEL, LAC, MEL, TRE, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

L. jensenii KS 119.1 (CNCM I-3217): Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 7,4 g/l - producción de H₂O₂ de 20 mg/l

30 Prueba API 50 CHI: positivo para GLU, FRU, MNE, NAG, AMY, ESC, SAL, CEL, MAL, MEL, SAC, GEN y TAG - variable para: RIB

negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, DXYL, LXYL, ADO, MDX, GAL, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, ARB, LAC, TRE, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, TUR, LYX, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

35 **L. crispatus KS 119.4 (CNCM I-3484):** Gram-positivo - negativo para catalasa - positivo para oxidasa - producción de ácido láctico de 10,3 g/l - producción de H₂O₂ negativa

Prueba API 50 CHI: positivo para GAL, GLU, FRU, MNE, NAG, ESC, MAL, LAC, SAC y AMD

negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, SAL, CEL, MEL, TRE, INU, MLZ, RAF, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

40 **L. jensenii KS 121.1 (CNCM I-3219):** Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 10,6 g/l - producción de H₂O₂ de 1 mg/l

Prueba API 50 CHI: positivo para: GAL, GLU, FRU, MNE, AMY, ARB, ESC, SAL, CEL, MAL, SAC y AMD - variable para: RIB, NAG, LAC, RAF y LFUC

45 negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, MEL, TRE, INU, MLZ, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

L. gasseri KS 123.1 (CNCM I-34857): Gram-positivo - negativo para catalasa - negativo para oxidasa - producción de ácido láctico de 8,5 g/l - producción de H₂O₂ de 10 mg/l

Prueba API 50 CHI: positivo para: GLU, MNE, NAG, ESC, MAL y SAC - variable para RIB y 5KG

negativo para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, DXYL, LXYL, ADO, MDX, GAL, FRU, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, SAL, CEL, LAC, MEL, TRE, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT y 2KG

5 **L. crispatus KS 127.1 (CNCM I-3486):** Gram-positivo - negativo para catalasa - positivo para oxidasa - producción de ácido láctico de 16,7 g/l - producción de H₂O₂ negativa

Prueba API 50 CHI: positivo para RIB, GAL, GLU, FRU, MNE, MAN, SOR, NAG, AMY, ESC, SAL, CEL, MAL LAC, SAC, TRE, MLZ, AMD, GLYG, GEN, TAG y GNT - variable para GLY y DXYL

10 negativo para: KON, ERY, DARA, LARA, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MDM, MDG, ARB, MEL, INU, MLZ, RAF, XLT, TUR, LYX, DFUC, LFUC, DARL, LARL, 2KG y 5KG

L. helveticus KS 300 (CNCM I-3360): Gram-positivo - producción de ácido láctico de 10,45 g/kg - producción de H₂O₂ de 1 mg/l

Prueba API 50 CHI - positivo para: GAL, GLU, FRU, MNE, AMY, ARB, ESC, SAL, CEL, MAL, LAC, SAC, TRE y AMD

15 negativo para: RIB, MAN, GLY, SOR, KON, ERY, MLZ, DARA, LARA, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MDM, MDG, MEL, INU, RAF, TAG, GNT, XLT, TUR, LYX, DFUC, LFUC, DARL, LARL, 2KG y 5KG

Estas cepas se han registrado debidamente en el Instituto Pasteur, París (Francia) según el Tratado de Budapest.

20 Según la presente invención, y debido a su actividad antipatógenos específica, las cepas de bacterias probióticas mencionadas anteriormente en el presente documento pueden usarse ventajosamente para prevenir o tratar infecciones genitourinarias en mujeres y/o infecciones gastrointestinales en seres humanos, más específicamente seres humanos, y para prevenir o inhibir la colonización y/o el crecimiento de patógenos en el entorno o aparato genitourinario de mujeres y en el entorno y tracto gastrointestinal de seres humanos también.

25 Además, dichas cepas de bacterias probióticas pueden usarse de una forma bastante eficaz para mantener o restaurar una flora genitourinaria y/o gastrointestinal sana en seres humanos, especialmente seres humanos, en particular tras tratamientos médicos intensos como los realizados con antibióticos.

30 Los tratamientos terapéuticos o profilácticos correspondientes se realizan administrando una cantidad eficaz de la cepa o cepas seleccionadas de esta invención en combinación con un sistema de suministro, soporte o vehículo adecuado, en caso de ser necesario de calidad alimentaria, que se ha diseñado para ello. El término "tratamiento terapéutico" usado dentro de ese contexto se refiere principalmente a un tratamiento combinado en el que los pacientes se han sometido en primer lugar a la administración de productos químicos o antibióticos relativamente "agresivos" y cuando la administración de probióticos convenientes se produce entonces una vez que se ha completado la erradicación de patógenos y se ha detenido la administración de antibióticos. El término "adecuado(a)" pretende definir un sistema de suministro que mantiene intactas todas las propiedades de las cepas de bacterias probióticas que se usan para realizar los tratamientos anteriores.

40 Las composiciones probióticas según esta invención pueden comprender además prebióticos o factores de crecimiento de BAL habituales, por ejemplo factores de crecimiento naturales especializados como leche desnatada en polvo (MSK). Dichas composiciones están preferiblemente en forma de un producto alimenticio o una bebida, una composición alimenticia o de bebida como, por ejemplo, los diseñadas para nutrición clínica, un adyuvante o complemento alimenticio o de bebida diseñado para consumo o bien humano o bien animal.

45 Las bebidas o productos alimenticios lácteos como leches fermentadas, quesos frescos o yogures o sus equivalentes secados o liofilizados representan sistemas de suministro adecuados. Como, por ejemplo adyuvante o complemento alimenticio, demostraron ser bastante convenientes la leche en polvo o matrices de derivados lácteos cargados con los probióticos seleccionados. Si alguna vez es necesario, dichas matrices en polvo pueden envasarse además como, por ejemplo, cápsulas de celulosa o gelatina, cápsulas de gel o comprimidos.

Dichas composiciones probióticas pueden comprender además una o varias cepas de bacterias del ácido láctico, es decir probióticas o no, de la técnica anterior también y aditivos adicionales como estabilizadores de pH, estabilizadores de viscosidad, conservantes, antioxidantes, colorantes o aromas.

50 Las composiciones a las que se hizo referencia anteriormente en el presente documento pueden contener los microorganismos probióticos seleccionados en cantidades que pueden oscilar entre aproximadamente 10⁶ ufc (unidades formadoras de colonias) y aproximadamente 10¹¹ ufc por g o dosis o unidad, preferiblemente en una forma que mantiene su viabilidad y su especificidad intactas, por ejemplo en forma encapsulada o liofilizada. Los detalles primordiales de dichas composiciones así como su dosificación dependerán, eventualmente, de la aplicación específica

para la que se pretenden, la edad o el estado de salud de los pacientes o la persona que va(n) a tratarse, la naturaleza de la contaminación por patógenos o el beneficio esperado a partir de la administración preventiva de los probióticos. Está dentro de la experiencia y las capacidades actuales de la comunidad médica o nutricional ajustar todos los parámetros relevantes.

5 En comparación con cepas de referencia conocidas anteriores (véanse los ejemplos a continuación) las cepas de bacterias probióticas seleccionadas dentro del marco de la presente invención han mostrado una actividad antipatógenos o bien similar o bien incluso mayor dependiendo del modelo experimental que se haya seleccionado para ello.

10 Los siguientes ejemplos ilustran sólo algunas de las realizaciones de esta invención y así no pretenden constituir ninguna limitación ni restricción de la misma.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cepa sometida a prueba	Código
<i>jensenii</i> 109	KS 109
<i>crispatus</i> 116.1	KS 116.1
<i>jensenii</i> 119.1	KS 119.1
<i>gasseri</i> 120.1	KS 120.1 (*)
<i>jensenii</i> 121.1	KS 121.1
<i>jensenii</i> 122.1	KS 122.1
<i>gasseri</i> 124.3	KS 124.3 (*)
<i>gasseri</i> 126.2	KS 126.2
<i>jensenii</i> 129.1	KS 129.1
<i>L. jensenii</i> 130.1	KS 130.1
<i>helveticus</i> 300	KS 300
<i>acidophilus</i> 400	KS 400

* Cepas de bacterias del ácido láctico según la presente invención.

15 La cepa de lactobacilos de adherencia de control es *L. casei rhamnosus* cepa GG (n.º de registro ATCC 53103), *L. rhamnosus* cepa GR-1 (n.º de registro ATCC 55826) y *L. fermentum* cepa RC-14 (n.º de registro ATCC 55845).

se hicieron crecer todas las cepas de lactobacilos en caldo De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) durante 18 h a 37°C.

20 **Patógenos bacterianos.** *Salmonella enterica serovar Typhimurium* cepa SL 1344 fue una donación de B.A.D. Stocker (Stanford, California). Se hicieron crecer las bacterias durante la noche durante 18 h a 37°C en caldo Luria (Difco Laboratories).

25 *Escherichia coli* cepas IH11128 y 7372 de adherencia difusa uropatógenas, y la cepa C1845 diarrogénica fueron donaciones de B. Nowicki (Universidad de Texas, Galvestone) y S. Moseley (Universidad de Seattle). La cepa 7372 porta el alelo *papG* de clase II, el gen *hly* (hemolisina) y el operón *Dr*. La cepa IH11128 porta el operón *Dr*. La cepa C1845 porta el operón *Daa*. Se mantuvieron todas las cepas bacterianas sobre placas con LB y antes de la infección, se hicieron crecer las bacterias en caldo LB a 37°C durante 18 h.

La cepa de *Staphylococcus aureus* era de la Colección de Cultivos Pasteur (París). Se hicieron crecer las bacterias durante la noche a 37°C en caldo TSA (Difco Laboratories).

30 Las cepas de *Streptococcus agalactiae* DSM 2134, *Gardnerella vaginalis* DSM 4944, *Prevotella bivia* Cl-1 (DSM 20514) y *Candida albicans* DSM 1386 procedían de Medinova Ltd, Zúrich, Suiza). La cepa de *Staphylococcus*

aureus procedía de la Colección de Cultivos Pasteur (París). Se hicieron crecer las bacterias durante la noche a 37°C en caldo TSA (Difco Laboratories). Se hizo crecer la cepa de *Streptococcus agalactiae* durante la noche a 37°C en caldo BHI (Difco Laboratories).

5 Se hizo crecer la cepa de *Candida albicans* durante la noche a 37°C en caldo Sabouraud. Se hizo crecer *Gardnerella vaginalis* sobre placas de agar *Gardnerella* adquirido de BioMérieux France.

10 Se suspendieron las bacterias en disolución tamponada de cloruro de sodio-peptona pH 7,0 hasta aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Se extendieron 500 µl o las suspensiones preparadas sobre la placa de agar. Se secaron las placas inoculadas en condiciones de flujo de aire laminar estéril. Entonces se incubaron las placas de agar en condiciones anaerobias usando un recipiente anaerobio sellado (Becton Dickinson, EE.UU.) a 37°C durante 36 h como máximo. Antes de su uso, se subcultivó la cepa de *Gardnerella vaginalis* en BHI complementado con extracto de levadura, maltosa y suero de caballo, en condiciones anaerobias usando un recipiente anaerobio sellado a 37°C durante 36 h como máximo.

15 Antes de su uso, se centrifugaron los cultivos bacterianos a 5,500 x g durante 5 min. a 4°C. Se desechó el medio de cultivo y se lavaron las bacterias una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS.

Líneas y cultivos celulares. Se cultivaron células HeLa de cuello uterino humanas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂-95% de aire en RPMI 1640 con L-glutamina (Life Technologies) complementado con suero de ternero fetal (FCS; Boehringer, Mannheim, Alemania) al 10% inactivado con calor (30 min., 56°C). Se usaron las células para ensayos de infección antes de la confluencia, es decir, tras 5 días en cultivo.

20 La línea celular intestinal humana usada fue el clon TC7 (Caco-2/TC7), establecido a partir de la línea celular Caco-2 parental. Se hicieron crecer las células de manera rutinaria en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (glucosa 25 mM) (Invitrogen, Cergy, Francia), complementado con suero de ternero fetal (Invitrogen) al 15% inactivado con calor (30 min., 56°C) y aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen) tal como se describió previamente. Para fines de mantenimiento, se sometieron a pases las células semanalmente usando tripsina al 0,02% en PBS libre de Ca²⁺Mg²⁺ que contenía EDTA 3 mM. Se llevaron a cabo los experimentos y el mantenimiento de las células a 37°C en una atmósfera del 10% de CO₂/90% de aire. Se cambió diariamente el medio de cultivo. Se usaron las células después de la confluencia tras 15 días de cultivo (células completamente diferenciadas) para ensayo de infección de *S. enterica serovar Typhimurium*.

30 **Ensayos de adhesión.** Se examinó la adhesión de cepas de lactobacilos sobre células HeLa de cuello uterino y células Caco-2/TC7 intestinales según las siguientes etapas: se lavaron las monocapas celulares dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para cada ensayo de adhesión, se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de *Lactobacillus* (bacterias con sobrenadante de cultivo de caldo agotado) con DMEM (0,5 ml), y luego se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo tisular (24 pocillos) que luego se incubó a 37°C en el 10% de CO₂/90% de aire. Las concentraciones finales de las bacterias examinadas fueron de 1×10^8 , 2×10^8 , 1×10^9 y 2×10^9 bacterias por ml. Tras incubación durante 1 h, se lavaron las monocapas cinco veces con PBS estéril, se fijaron con metanol, se tiñeron con tinción de Gram, y luego se examinaron microscópicamente en inmersión con aceite. Se llevó a cabo por duplicado cada ensayo de adhesión con células de tres pases sucesivos. Para cada ensayo, se determinó el número de bacterias adherentes en 20 zonas microscópicas aleatorias (puntuación de adhesión: de 0 a 5). Además, se determinó el nivel de lactobacilos adherentes viables mediante la determinación cuantitativa de bacterias asociadas con las monocapas celulares infectadas. Tras haberse infectado, se lavaron las células dos veces con PBS estéril y se lisaron con H₂O esterilizada. Se sembraron en placa diluciones apropiadas sobre agar de tripticasa y soja (TSA) para determinar el número de bacterias asociadas con células viables mediante recuentos de colonias bacterianas.

Se llevó a cabo cada ensayo de asociación de células al menos por triplicado, con tres pases de células sucesivos. Se expresaron los resultados como UFC/ml de bacterias asociadas con células.

45 **Actividad frente al crecimiento de patógenos.** Se inoculó un medio de cultivo que contenía MRS (5 ml) y medio de cultivo de patógeno específico (5 ml) con 0,1 ml de un patógeno cultivado y 0,1 ml de cepa de *Lactobacillus* cultivada. El control era un medio de cultivo inoculado con 0,1 ml de un patógeno cultivado y 0,1 ml de MRS no cultivado ajustado a pH 4,5. En puntos de tiempo indicados, se retiraron alícuotas, se diluyeron en serie y se sembraron en placa sobre agar de tripticasa y soja para determinar recuentos de colonias bacterianas de patógeno. Se llevó a cabo cada ensayo al menos por triplicado. Se expresaron los resultados como UFC/ml.

55 **Actividad frente a la viabilidad de patógenos.** Se realizaron ensayos de recuento de colonias incubando 10^8 UFC/ml de patógeno (0,5 ml) con el cultivo de lactobacilos (10^8 UFC/ml, 0,5 ml) a 37°C. El control era MRS no cultivado ajustado a pH 4,5. Inicialmente y en intervalos predeterminados, se retiraron alícuotas, se diluyeron en serie y se sembraron en placa sobre agar de tripticasa y soja para determinar recuentos de colonias bacterianas de patógeno. Se llevó a cabo cada ensayo al menos por triplicado. Se expresaron los resultados como UFC/ml.

5 **Inhibición de la adhesión de *E. coli* uropatógena sobre células HeLa epiteliales.** Para la infección de monocapas celulares, se cultivaron patógenos a 37°C durante 18 h en medios de cultivo apropiados tal como se describió anteriormente. Antes de la infección, se lavaron dos veces con PBS las monocapas celulares, preparadas en placas de cultivo tisular TPP de veinticuatro pocillos (ATGC, París, Francia). Se suspendieron las bacterias infecciosas en el medio de cultivo y se añadió un total de 0,5 ml de DMEM + 0,25 ml de patógeno de cultivo (1×10^8 UFC/ml) + 0,25 ml de cultivo de lactobacilos ($1,5 \times 10^9$ UFC/ml) a cada pocillo de la placa de cultivo tisular. Se incubaron las placas a 37°C en el 10% de CO₂/90% de aire para diferente tiempo de infección tal como se indica y luego se lavaron tres veces con PBS estéril y se lisaron con H₂O esterilizada. Se sembraron en placa diluciones apropiadas sobre agar de tripticasa y soja para determinar el número de bacterias asociadas con células viables mediante recuentos de colonias bacterianas. Se llevó a cabo cada ensayo por triplicado con tres pases sucesivos de células HeLa.

10 **Análisis.** Se expresan los resultados como medias \pm error estándar con respecto a la media. Para comparaciones estadísticas, se realizó la prueba de la t de Student.

RESULTADOS

15 Ejemplo 1

1. Capacidad de adhesión de *L. jensenii* KS 119.1 y KS 130.1, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. gasseri* KS 124.3 sobre células HeLa y Caco-2/TC7.

20 Se determinó el nivel de adhesión de las cepas anteriores después de que se inoculasen las células con cuatro concentraciones de lactobacilos (5×10^7 ; 1×10^8 ; 5×10^8 ; 1×10^9 UFC/pocillo). Generalmente, se observó una adhesión dependiente de la concentración.

En células HeLa de cuello uterino, los niveles de adhesión observados muestran que todas las cepas sometidas a prueba son adherentes. Las cepas de *L. jensenii* KS 119.1 y KS 130.1 parecían ser las mejores cepas adherentes (7,5 log de UFC/ml en 5×10^8 UFC/pocillo) en comparación con las cepas de adherencia de control, cepas de *L. casei rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* GR1.

25 En células Caco-2/TC7 intestinales, los niveles de adhesión observados muestran que todas las cepas Medinova son adherentes. Las cepas *L. crispatus* KS 116.1, *L. jensenii* 119.1, 129.1 y KS 130.1, *L. gasseri* 124.3 parecían ser las mejores cepas adherentes (7,5-8 log de UFC/ml en 5×10^8 UFC/pocillo) en comparación con las cepas de adherencia de control, cepas *L. casei rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* GR1.

30 Tal como se observó mediante microscopía electrónica de barrido, todas las "cepas de lactobacilos de la invención" parecían ser adherentes en contacto próximo con las células HeLa y Caco-2/TC7.

Basándose en sus propiedades de adherencia, se han seleccionado *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 para los siguientes estudios de actividades antibacterianas frente a patógenos genitourinarios e intestinales.

2. Actividad de KS 116.1 y KS 119.1 sobre el crecimiento de patógenos genitourinarios e intestinales.

35 Se ha examinado si las cepas mencionadas anteriormente son activas sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* uropatógena y diarrogénica, y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* diarrogénica. Se midió el crecimiento de patógenos a las 5, 8, 18 y 24 h.

40 Para *Staphylococcus aureus*, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control inhibían el crecimiento de bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y mostraban una disminución en el número de bacterias viables. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, *L. jensenii* 119.1 parecía ser la cepa más activa.

Para *E. coli* cepas IH11128 y 7372 uropatógenas, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control inhibían el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1 inhibían el crecimiento de *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, *L. jensenii* 119.1 parecía ser la cepa más activa.

45 Para *E. coli* cepa C1845 diarrogénica, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control inhibían el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1 inhibían el crecimiento de *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, se encontró la misma actividad para todas las cepas de lactobacilos examinadas.

50 Para *S. enterica* serovar *Typhimurium* cepa SL1344 diarrogénica, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control inhibían el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. jensenii* 119.1 inhibía el

crecimiento de *S. enterica serovar Typhimurium*. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, se encontró la misma actividad para *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control y *L. jensenii* KS 119.1. Por el contrario, *L. crispatus* KS 116.1 mostró una actividad inferior.

5 Para *Candida albicans* no se encontró actividad para *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, ni para *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1.

3. Actividad de destrucción de KS 116.1 y KS 119.1 frente a patógenos genitourinarios e intestinales.

10 Se ha examinado si dichos lactobacilos son activos sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* uropatógena y diarrogénica, y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* diarrogénica. Se midió el efecto sobre la viabilidad de patógenos a las 2, 3 y 4 h.

Para *Staphylococcus aureus*, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, y *L. jensenii* 119.1 disminuyeron en 2 log la viabilidad de las bacterias. Por el contrario, *L. crispatus* KS 116.1 no mostró actividad.

Para *Streptococcus agalactiae*, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, y *L. jensenii* 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 no mostraron actividad.

15 Para *E. coli* cepas IH11128 y 7372 uropatógenas, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control mostraron 4 log de disminución en la viabilidad de las bacterias. *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 no fueron activos mostrando sólo un log de disminución en la viabilidad de las bacterias.

20 Para *E. coli* cepa C1845 diarrogénica, tanto *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, como *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 mostraron una baja actividad sobre la viabilidad de las bacterias C1845 (2 log de disminución).

Para *S. enterica serovar Typhimurium* cepa SL1344 diarrogénica, tanto *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, como *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 mostraron una gran actividad disminuyendo la viabilidad de las bacterias SL1344 (5 log de disminución).

25 Para *Gardnerella vaginalis*, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, y *L. fermentum* cepa RC-14, y *L. jensenii* 119.1 disminuyeron en 2 log la viabilidad de *Gardnerella*. Por el contrario, *L. crispatus* KS 116.1 no mostró actividad.

Para *Candida albicans* no se encontró actividad para *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, ni para *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1.

30 4. Inhibición de la adhesión de la cepa de *E. coli* cepa IH11128 uropatógena sobre células HeLa por KS 116.1 y KS 119.1.

Se ha examinado si dichos lactobacilos pueden inhibir la adhesión de *E. coli* cepa IH11128 uropatógena sobre células HeLa. Se midió el efecto de *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, y *L. jensenii* 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 a tres concentraciones: 1×10^8 , 5×10^8 y 1×10^9 bacterias por pocillo.

35 Se encontró del 30 al 40% de inhibición de la adhesión de IH11128 a una concentración de 1×10^8 bacterias por pocillo para *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control. A esta concentración, *L. jensenii* KS 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 eran inactivos. La inhibición de la adhesión de IH11128 fue eficaz a una concentración de 5×10^8 bacterias por pocillo para *L. jensenii* 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 y se observó una inhibición similar a las obtenidas con *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control. Se observó un alto de nivel de inhibición de la adhesión de IH11128 similar con *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control, y *L. jensenii* KS 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 a la concentración de 1×10^9 bacterias por pocillo.

Ejemplo 2**1. Actividad de *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400 sobre el crecimiento de patógenos genitourinarios e intestinales.**

5 Se ha examinado si las cepas a las que se hizo referencia anteriormente en el presente documento son activas frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans* y *E. coli* cepas IH11128 y 7372 uropatógenas y diarrogénicas. Se midió el crecimiento de patógenos a los 5, 8, 18 y 24 h.

No se desarrolló actividad frente a *Streptococcus agalactiae* y *Candida albicans* por *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 ni *L. acidophilus* KS 400 así como tampoco por las cepas GR-1 y RC-14 de control.

10 Con respecto a *Staphylococcus aureus*, *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* cepa RC-14 de control inhibieron eficazmente el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400 inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y mostraron una disminución en el número de bacterias viables. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, *L. helveticus* KS 300 parecía ser la cepa más activa.

15 Para *E. coli* cepas IH11128 uropatógenas, las cepas de control *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 inhibieron eficazmente el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. helveticus* KS 300 inhibió eficazmente el crecimiento de *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de cepas de lactobacilos, pareció haber una actividad inferior para *L. gasseri* KS 124.3 y *L. acidophilus* KS 400.

20 Para *E. coli* cepa 7372 uropatógena, tanto las cepas de control de *L. rhamnosus* GR-1 como las cepas de *L. fermentum* RC-14 inhibieron el crecimiento de bacterias. De manera similar *L. helveticus* KS 300 inhibió el crecimiento de dichas bacterias mientras que *L. acidophilus* KS 400, sin embargo, fue activo sólo a las 25 horas.

2. Actividad de destrucción de KS 124.3, KS 300 y KS 400 frente a patógenos genitourinarios e intestinales.

Se ha examinado si dichos lactobacilos son activos sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *E. coli* IH11128 y 7372 uropatógenas, *E. coli* C1845 diarrogénica y *Gardnerella vaginalis*. Se midió el efecto sobre la viabilidad de patógenos a las 2, 3 y 4 h.

25 Para *Staphylococcus aureus*, las cepas de control *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14, y *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400 disminuyeron en 2-3 log la viabilidad de las bacterias.

Con respecto a *Streptococcus agalactiae* y *Candida albicans*, las dos cepas de control y *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400 no mostraron actividad.

30 Para *E. coli* cepas IH11128 uropatógenas, las cepas de control *L. rhamnosus* cepa GR-1 y *L. fermentum* RC-14 y *L. helveticus* KS 300 también mostraron 3 log de disminución en la viabilidad de las bacterias. *L. acidophilus* KS 400 y *L. gasseri* KS 124.3 no fueron activos.

Con respecto a *E. coli* cepas 7372 uropatógenas, las cepas de control mostraron 2 log de disminución en la viabilidad de las bacterias. *L. helveticus* KS 300 mostró 3 log de disminución mientras que *L. acidophilus* KS 400 y *L. gasseri* KS 124.3 no fueron activos en las mismas condiciones.

35 Para *Gardnerella vaginalis*, ambas cepas de control, *L. acidophilus* KS 400 y *L. gasseri* KS 124.3 mostraron 3 log de disminución en la viabilidad de las bacterias. Se observó una actividad rápida y eficaz para *L. helveticus* KS 300, superior a la encontrada para las cepas de control anteriores.

40 Para *E. coli* cepa C1845 diarrogénica, ambas cepas de control *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 destruyeron las bacterias mostrando una disminución de 3 log en la viabilidad de la misma. Se observó un efecto similar para *L. gasseri* KS 124.3 mientras que no se detectó actividad con respecto a *L. acidophilus* KS 400. *L. helveticus* KS 300 muestra una destrucción que es definitivamente superior que la observada para las cepas de control anteriores.

Ejemplo 3**1. Actividad de destrucción de *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1, *L. gasseri* KS 120.1 y *L. helveticus* KS 300 frente a patógenos genitourinarios e intestinales.**

45 Se ha examinado si dichas cepas de lactobacilo son activas sobre la viabilidad de *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *E. coli* IH11128 uropatógena, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* y *Salmonella enterica Typhimurium*. Se midió el efecto sobre la viabilidad de patógenos a las 4 h de contacto.

Con respecto a tanto *Streptococcus agalactiae* como *Candida albicans* ninguno de los lactobacilos sometidos a prueba mostró actividad.

Para *E. coli* cepas IH11128 uropatógenas, *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1 no mostraron actividad mientras que, por el contrario, *L. gasseri* KS 120.1 disminuyó eficazmente (4 log) la viabilidad de *E. coli* en condiciones sin agitación. *L. helveticus* KS 300 y la cepa de control *L. fermentum* RC-1 disminuyeron 2 log la viabilidad de *E. coli* en condiciones sin agitación sólo.

5 Con respecto a *Gardnerella vaginalis*, tanto *L. jensenii* KS 121.1 como KS 122.1 no mostraron actividad. Por el contrario, *L. gasseri* KS 120.1 disminuyó eficazmente (6 log) la viabilidad de *Gardnerella vaginalis* en condiciones sin agitación; *L. helveticus* KS 300 mostró una eficacia similar (4 log de disminución) también en condiciones sin agitación, mientras que la cepa de control mostró 3 log de disminución sólo.

10 Para *Prevotella bivia*, *L. gasseri* KS 120.1, *L. jensenii* 122.1, *L. helveticus* KS 300 y la cepa de control *L. fermentum* RC-14 disminuyeron la viabilidad de las bacterias en 2 log, en condiciones sin agitación. *L. jensenii* KS 121.1 que fue altamente activo frente a *Prevotella bivia* en condiciones sin agitación había perdido su actividad cuando se sometió a prueba en condiciones con agitación.

15 Con respecto a *Salmonella Typhimurium*, *L. gasseri* KS 120.1 (3 log), *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1, *L. helveticus* KS 300 y la cepa de control *L. fermentum* RC-14 fueron bastante activos (6 log de disminución) en condiciones sin agitación. *L. gasseri* KS 120.1 siguió siendo activo incluso en condiciones con agitación.

2. Actividad de KS 120, KS 121.1, KS 122.1 y KS 300 sobre el crecimiento de *Gardnerella vaginalis* y *Prevotella bivia*

Se han realizado las pruebas en condiciones tanto con agitación como sin agitación.

20 En condiciones sin agitación *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1 inhibieron el crecimiento de *Gardnerella vaginalis* mientras que *L. gasseri* 120.1, *L. helveticus* y la cepa de control *L. fermentum* RC-14 inhibieron dicha actividad en un nivel todavía superior.

En condiciones con agitación, *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1 y *L. helveticus* también habían perdido su actividad, mientras que *L. gasseri* 120.1 sigue siendo activo (2 log de disminución) frente a *Gardnerella vaginalis*.

25 En condiciones tanto con agitación como sin agitación, *L. gasseri* KS 120.1, *L. jenseinii* KS 121.1 y KS 122.1, *L. helveticus* KS 300 y la cepa de control inhibieron el crecimiento de *Prevotella bivia* a un nivel alto.

3. Inhibición de la adhesión de *Gardnerella vaginalis* y *Prevotella bivia* sobre células HeLa KS 120.1, KS 121.1 y KS 300

30 Se midió el efecto de *L. gasseri* KS 120.1, *L. helveticus* KS 300 de las cepas de control *L. fermentum* RC-14 así como *L. casei rhamnosus* GG a la concentración de 1×10^9 bacterias por pocillo.

La cepa *L. fermentum* RC-14 de control y *L. jensenii* KS 121.1 disminuyeron en 2 log el nivel de adhesión de *Gardnerella vaginalis* sobre las células sometidas a prueba. *L. gasseri* KS 120.1 y *L. helveticus* KS 300 disminuyeron dicha adhesión en 4 log.

35 *L. jensenii* KS 121.1 disminuyó la adhesión de *Prevotella bivia* en 1 log sólo, mientras que *L. gasseri* KS 120.1, *L. helveticus* KS 300 así como la cepa de control RC-14 disminuyeron dicha adhesión en 2 log.

4. Inhibición de la adhesión e internalización de la cepa de *E. coli* cepa IH11128 uropatógena sobre células HeLa mediante KS 120.1, KS 121.1 y KS 300

40 Una estrategia usada habitualmente por patógenos extraintestinales como *E. coli* para eludir el mecanismo de defensa del huésped es establecer un reservorio local dentro de células epiteliales (M. A. Muvlea en *Escherichia coli*. Cell Microbiol. 4, 257-271 - 2002) y la entrada a la célula por la cepa IH11128 parece ser un mecanismo eficaz para promover la persistencia prolongada de estos patógenos en las vías urinarias.

45 Se examinó el efecto de *L. gasseri* KS 120.1, *L. helveticus* KS 300 y de las cepas de control RC-14 y cepa GG con respecto a *E. coli* uropatógena anterior: *L. jensenii* 121.1 disminuyó en 2 log el nivel de *E. coli* internalizada viable, mientras que *L. gasseri* 120.1, *L. helveticus* y ambas cepas de control mostraron una disminución de 4 log de la *E. coli* internalizada.

Ejemplo 4 Determinación de la resistencia a pepsina (% de supervivencia a $T_0 + X$ min)

4.1 Se hicieron crecer las cepas de BAL seleccionadas para este experimento en 10 ml de caldo MRS a 37°C durante 24 horas tras lo cual se centrifugó el cultivo celular durante 5 min. a 4000 rpm. Se lavó 3 veces el sedimento así obtenido en un tampón de PBS (pH 7) y se suspendió posteriormente en 1 ml de dicho tampón de PBS.

5 4.2 Se añadieron 200 μ l de la suspensión celular anterior a una serie de 4 tubos de ensayo que contenían cada uno 1 ml de una disolución de pepsina filtrada a pH 2 y 300 μ l de NaCl acuoso. Inmediatamente tras la inoculación (T_0), se preparó una serie de dilución de 10 veces de 100 μ l de suspensión celular del tubo n° 1 usando una disolución de Ringer y posteriormente se sembraron en placa sobre agar MR para su incubación a 37°C durante 24 horas. También se realizó el mismo procedimiento con respecto a cada uno de los tubos restantes, a T + 20, T + 40 y T + 60 min., respectivamente. Se notifican recuentos de bacterias correspondientes (UFC) en la tabla I a continuación:

Tabla I

Cepa	5 min.	20 min.	40 min.	60 min.
KS 116.1	81	70	0	0
KS 400	76	42	5	0
KS 119.1	67	0	0	0
KS 121.1	97	232	187	222
KS 120.1	79	128	161	189
KS 124.3	100	16	2	0
KS 300	75	75	45	4

10 Se observa que las cepas *L. jensenii* KS 121.1 y *L. crispatus* KS 120.1 son particularmente resistentes a pepsina, incluso tras un periodo prolongado.

Ejemplo 5 Determinación de la resistencia a pancreatina (% de supervivencia a T_0 + X min)

5.1 Se hicieron crecer las cepas de BAL seleccionadas para este experimento en 10 ml de caldo MRS a 37°C durante 24 horas tras lo cual se centrifugó el cultivo celular durante 5 min. a 4000 rpm. Se lavó 3 veces el sedimento así obtenido en un tampón de PBS (pH 7) y se suspendió posteriormente en 1 ml de dicho tampón de PBS.

15 5.2 Se añadieron 200 μ l de la suspensión celular anterior a una serie de 5 tubos de ensayo que contenían cada uno 1 ml de una disolución de pancreatina porcina al 0,1% a pH 8 y 300 μ l de NaCl acuoso. Inmediatamente tras la inoculación (T_0), se preparó una serie de dilución de 10 veces de 100 μ l de suspensión celular del tubo n.º 1 usando una disolución de Ringer y posteriormente se sembraron en placa sobre agar MR para su incubación a 37°C durante 24 horas. También se realizó el mismo procedimiento con respecto a cada uno de los tubos restantes, a T + 20, T + 40, T + 60 y T + 120 min., respectivamente. Se notifican recuentos de bacterias correspondientes (UFC) en la tabla la tabla II a continuación:

Tabla II

Cepa	5 min.	20 min.	40 min.	60 min.	120 min.
KS 116.1	152	135	185	181	175
KS 400	107	160	127	93	206
KS 119.1	78	113	140	160	151
KS 121.1	65	48	63	110	55
KS 120.1	181	167	119	129	116
KS 124.3	50	88	119	129	116
KS 300	71	80	86	93	71

25 Se observa que las cepas *L. acidophilus* KS 116.1 y KS 400, así como *L. jensenii* KS 119.1, *L. crispatus* 120.1 y KS 124.3, pero en un menor grado, son particularmente resistentes a pancreatina. De manera bastante interesante, *L. crispatus* KS 120.1 es resistente tanto a pepsina como a pancreatina.

Ejemplo 6 Modulación de la respuesta inmunitaria (ensayo *in vivo* usando PMBC humanas)

Se han sometido a prueba las siguientes cepas en las condiciones fijadas a continuación en el presente documento con respecto a su capacidad para inducir o modular o afectar a una respuesta inmunitaria, más específicamente su capacidad para inducir la secreción de citocinas y similares: *L. crispatus* KS 116.1, *L. jensenii* 119.1, *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1, *L. gasseri* KS 120.1, *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400.

Se realizó la detección de la inducción de citocinas por medio de una prueba para la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas. Entre las citocinas inducidas durante estas pruebas, están las interleucinas 10 y 12 (IL10 e IL 12), \square -interferón (\square -IFN) y factor de necrosis tumoral \square (TNF \square).

Procedimientos experimentales

Preparación de PMBC: Se diluyó sangre humana fresca obtenida de sujetos sanos (cuatro donantes) a una razón de 1:2 con PBS-Ca (GIBCO) y se purificó en un gradiente de Ficoll (GIBCO). Tras centrifugación a 400 x g durante 30 min. a 20°C, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) formaron una capa anular de interfase en el suero. Se aspiraron las PMBC cuidadosamente, se suspendieron hasta un volumen final de 50 ml usando PBD-Ca y se lavaron tres veces en el mismo tampón con etapas de centrifugación a 350 X g durante 10 min. a 20°C.

Se resuspendieron las PMBC usando medio RPMI completo (GIBCO),m complementado con L-glutamina al 10 % p/v (GIBCO) y gentamicina (150 \square g/ml) (GIBCO). Se contaron las PBMC bajo el microscopio y se ajustaron a una concentración de 2x10⁶ células/ml y se distribuyeron (en alícuotas de 1 ml) en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, Inc.).

Preparación de bacterias: se lavaron cultivos de BAL durante la noche dos veces con tampón de PBS, pH 7,2 antes de resuspenderse en PBS a una concentración de 2x10⁹ ufc/ml.

Incubación de PMBC: a partir de estas suspensiones, se transfirieron 10 μ l en pocillos de las placas con PMBC que se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ /95% de aire. Tras una incubación de 24 horas, se aspiró el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante y se almacenó a -200°C. El control consistía en tampón libre de bacterias.

Cuantificación de citocinas: se determinaron los niveles de expresión de citocinas mediante ensayos de ELISA ("ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas"). Se recubrieron placas de ELISA con anticuerpo anti-citocina (procedimiento durante la noche) y se bloqueó el anticuerpo con PBS/BSA al 1%. Se preparó un patrón apropiado con concentraciones conocidas de citocinas, recubriendo el intervalo de detección de 15,62 a 2000 pg/ml (se incubó durante la noche).

Se realizó la detección y cuantificación de anticuerpo anti-citocina con la reacción de estreptavidina sobre el sustrato (TMB de Pharmigen). Se usaron los kits comerciales de Pharmigen según la descripción del fabricante. Se determinaron cuatro citocinas: las citocinas proinflamatorias/Th 1, TNF \square , IFN \square , IL 12 y la citocina antiinflamatoria/Th 2, IL 10.

Tabla III IL 10 TNF \square IFN \square IL10/EL12

Control	31,25	31,25	31,25	31,25	1
KS 120.1	1228,67	176,32	17698,83	3513,36	6,96840971
KS 121.1	2297,87	47,66	14180,66	897,65	48,2138061
KS 116.1	2856,26	167,6	33569,91	7209,33	17,0540573
KS 400	3177,49	103,85	26799	6949,13	30,5969186
KS 300	2290,47	59,7	18703,66	10047,75	38,3663317
KS 119.1	307,13	198,47	6693,3	9192,74	1,54748829
KS 124.3	2969,02	660,98	31307,71	16985,56	4,49184544

35 Observaciones

- un alto nivel de inducción de TNF α para todas las cepas de BAL sometidas a prueba

- un nivel relativamente bajo de $\text{INF}\gamma$ con respecto a *L. jensenii* KS 121.1
- el mayor potencial de inducción de IL10 con respecto a *L. crispatus* KS 116.1 y KS 400
- al contrario que las dos cepas de *L. jensenii*, las dos cepas de *L. gasseri* han mostrado un perfil similar, especialmente cuando se considera las razones en IL10/ IL12 y en $\text{TNF}\alpha/\text{INF}\gamma$.

5 Dentro del marco de pruebas anterior, está claro que el perfil de inducción de citocinas es específico de la cepa.

Ejemplo 7

Determinación de la actividad antiinflamatoria (prueba *in vivo* usando un modelo animal)

10 Se ha adaptado un modelo agudo de ratones a partir de Camoglio *et al.* (véase Eur. J. Immunol. 2000) en el que se han alimentado los animales desde el día -5 hasta el día +2 con cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas, a una tasa de 10^8 bacterias por ratón al día. Entonces se inyectó TNBS en el día cero, a una tasa de 120 mg/kg de ratones con el fin de inducir colitis aguda y se sacrificaron los animales en el día +2 y eventualmente se sometieron a puntuación tanto macroscópica (puntuación de Wallace - tabla IV) como histológica (puntuación de Ameho - tabla V).

15 Estas tablas muestran claramente que las cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas muestran un efecto antiinflamatorio significativo en comparación con cepas de referencia.

Ejemplo 8: Composición probiótica para administración local

8.1 Cápsulas vaginales

20 Se cultivaron muestras de las cepas de BAL de esta invención (véase anteriormente) durante mín. 24 horas en condiciones similares a las mencionadas anteriormente en el presente documento. Se aislaron las cepas cultivadas, se lavaron y se liofilizaron individualmente, se suspendieron individualmente en una mezcla en polvo de lactosa/MSK y se dividieron eventualmente en dosis unitarias que contenían cada una de ellas aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc (unidades formadoras de colonias).

25 Luego se vertieron dichas dosis unitarias en cápsulas vaginales de gelatina que comprendían cada una de ellas aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc de las cepas de BAL seleccionadas de esta invención.

8.2 Supositorios vaginales

Se prepararon supositorios vaginales blandos usando los siguientes componentes:

- disolución tamponada de ácido láctico
- lactosa
- 30 - PEG 4000
- PEG 600

Se añadió entonces la cantidad adecuada de las cepas de BAL liofilizadas seleccionadas de esta invención a dosis unitarias para proporcionar supositorios vaginales que comprendían cada uno aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc.

Ejemplo 9: Composición para administración oral

35 9.1 Complemento alimenticio

Se prepararon cápsulas de celulosa comestibles (hidroxipropilmetilcelulosa) que comprendían cada una aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc de las cepas de BAL seleccionadas de esta invención usando carga que comprendía los siguientes componentes:

- yogur en polvo deshidratado
- 40 - dextrosa anhidra
- almidón de patata
- celulosa microcristalina
- cepa de BAL liofilizada seleccionada.

9.2 Producto de leche fermentada (yogur)

5 Se prepararon raciones de un denominado "yogur natural ligero" ("Yogurt Natural Light") usando el siguiente procedimiento: a un lote de leche con el 1,5% de grasa normalizada se le añadió el 3% de leche desnatada en polvo (MSK) y entonces se pasteurizó el conjunto a 90°C durante 30 minutos. Se añadieron el 1% en volumen de cultivos iniciadores comerciales de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a la leche pasteurizada; luego se agitó el conjunto suavemente a temperatura ambiente, se dispuso en envases de 100 ml que se incubaron todos eventualmente a 40°C durante aproximadamente 4 horas para lograr el pH deseado.

10 Luego se añadieron porciones de cepas de BAL liofilizadas seleccionadas de esta invención a los recipientes de yogur en una cantidad tal como para tener aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc por ml de recipiente de yogur y se llevó a cabo una incubación adicional durante aproximadamente 30 min. hasta que se lograra un pH de aproximadamente 4,5 a 4,7. Estas raciones de yogur pueden almacenarse a 4°C antes de su consumo.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de bacterias del ácido láctico que pertenece a la especie *Lactobacillus gasseri* que se selecciona de:
 - *L. gasseri* KS 120.1, depositado el 4 de junio de 2004 en la CNCM del Instituto Pasteur con número de registro CNCM I-3218, y
 - 5 - *L. gasseri* KS 124.3, depositado el 4 de junio de 2004 en la CNCM del Instituto Pasteur con número de registro CNCM I-3220.
2. Composición probiótica que comprende una cantidad eficaz de al menos una cepa de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 en combinación con un sistema de administración adecuado.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho sistema de suministro adecuado comprende además factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico (BAL) y/o componentes prebióticos.
- 10 4. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que el sistema de suministro adecuado se indica para administración local, concretamente intrauretral, vaginal o anal.
5. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que el sistema de suministro adecuado se indica para administración oral.
- 15 6. Composición según la reivindicación 5, en la que el sistema de suministro adecuado es un producto alimenticio o una bebida, una composición alimenticia o de bebida, un adyuvante o complemento alimenticio o de bebida dedicado al consumo humano.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones genitourinarias en mujeres y/o infecciones gastrointestinales en seres humanos.

20

Figura 1

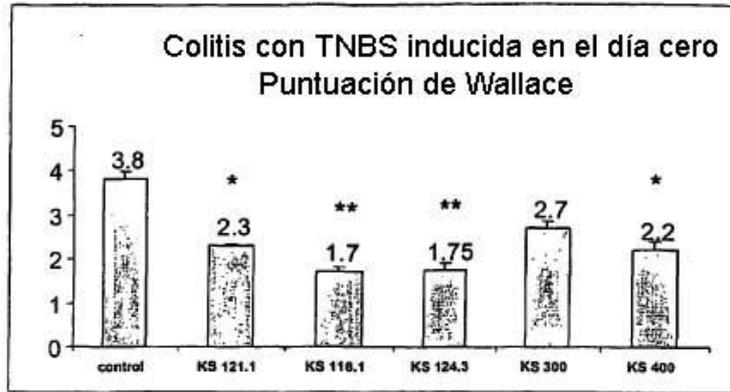


Tabla IV

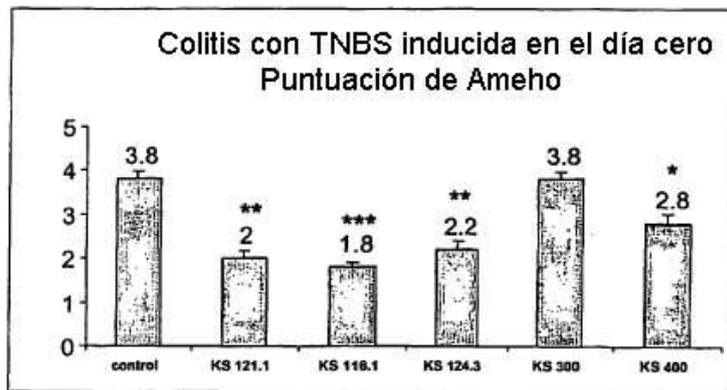


Tabla V