

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 065**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01) **C12R 1/00** (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A61L 15/36 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2005 E 05790296 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1824500**

54 Título: **Cepas de lactobacilos probióticos para mejorar la salud vaginal**

30 Prioridad:

05.10.2004 SE 0402406

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

18.12.2013

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)
SÖLVEGATAN 41
223 70 LÜND, SE**

72 Inventor/es:

**MOLIN, GÖRAN;
AHRNÉ, SIV;
JEPSSON, BENGT;
VASQUEZ, ALEJANDRA y
BERGGREN, ANNA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 065 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

Cepas de lactobacilos probióticos para mejorar la salud vaginal

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana probiótica perteneciente al género *Lactobacillus* que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana. Más específicamente la cepa bacteriana probiótica pertenece a una especie elegida entre el grupo integrado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus gasseri*. Además se refiere a su uso como un medicamento, a una composición que comprende dicha cepa, donde la composición es por ejemplo un producto alimenticio o una composición farmacéutica, un producto de higiene, un cultivo biológico puro de dicha cepa y un alimento nuevo.

15 Antecedentes de la invención

La vagina sana se mantiene por interacción del epitelio vaginal con la flora microbiana, donde los lactobacilos juegan un papel crucial. Las especies de lactobacilos mantienen la acidez del pH en la vagina mediante el metabolismo de la glucosa; por otra parte, junto con la producción de peróxido de hidrógeno y de análogos de bacteriocinas suprimen el crecimiento de microorganismos patógenos y otros microorganismos no deseados. Esto contribuye a una protección exitosa contra uropatógenos que causan infección urinaria (IU), el trastorno de vaginosis bacteriana y la vaginitis por levaduras por *Candida albicans* (Reid G, Bruce AW. Urogenital infections in women: can probiotics help? Postgrad Med J 2003; 79: 428-432.)

Durante mucho tiempo se aceptó que la especie dominante de los *Lactobacillus* en la vagina era el *Lactobacillus acidophilus*, pero el uso de métodos de identificación genotípica han demostrado que las especies más comunes de lactobacilos en la vagina sana son en realidad *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus jensenii*. Sin embargo, estudios independientes demuestran diferencias entre los lactobacilos recuperados de la vagina y muestran especies como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* como los lactobacilos dominantes, esto se debe probablemente a las diferencias en el manejo de las muestras, el estado de la vagina o los métodos preferidos para el aislamiento (Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2746-9).

La Organización Mundial de la salud definió a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped". El desarrollo de resistencia a los antibióticos y el fracaso en el tratamiento de las infecciones vaginales han incrementado el interés en los probióticos como una herramienta alternativa. La necesidad de un probiótico vaginal es clara en cuanto al alto número de incidencia de recurrencia de infecciones vaginales (Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 30: 49-52; Famularo G, Pieluigi M, Coccia R, Mastroiacovo P, De Simone C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. Med Hypotheses 2001; 56: 421-30.) Un cambio en la flora vaginal caracterizado por la disminución de los lactobacilos parece ser el principal factor causante del síndrome de vaginosis bacteriana. La administración regular de una cepa de *Lactobacillus* con capacidad para colonizar la vagina puede ser una solución alternativa para este problema.

El tratamiento con yogur como un remedio casero ha sido utilizado durante años para la prevención o el alivio de los trastornos vaginales. Sin embargo, el *Lactobacillus delbreukii* var. *bulgaricus*, el lactobacilo que se encuentra en el yogur es no un candidato óptimo para la restauración vaginal por probióticos, porque normalmente no se encuentra en ese ambiente y no se adhiere bien a las células epiteliales vaginales para una colonización exitosa (Famularo G, Pieluigi M, Coccia R, Mastroiacovo P, De Simone C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. Med Hypotheses 2001; 56: 421- 430). Los candidatos óptimos para un probiótico vaginal de ese tipo son especies que se encuentran normalmente en la vagina y poseen cualidades para suprimir a los patógenos.

La flora vaginal normal asciende desde la mucosa rectal (Reid G, Bruce AW. Urogenital infections in women: can probiotics help? Postgrad Med J 2003; 79: 428-432), lo que significa que los microorganismos administrados por vía oral que sobreviven al pasaje gastrointestinal aparecerán en la vagina después de cierto tiempo. Este hecho plantea la posibilidad de un probiótico vaginal que se pueda administrar por vía oral al huésped lo cual simplifica la administración a largo plazo con el propósito de prevenir los problemas vaginales.

Mujeres que recibieron *L. acidophilus* durante 6 meses, obtuvieron una disminución en la colonización y la infección por *Candida* (Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. Ann Internal Med 1992; 116: 353-357).

Resumen de la invención

En la actualidad se encontró sorprendentemente que cepas bacterianas probióticas específicas pertenecientes al género *Lactobacillus*, y más concretamente a una especie elegida del grupo integrado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus gasseri*, tienen la capacidad de colonizar la vagina humana y preservar o mejorar la salud vaginal cuando se administran por ej., por vía oral, rectal o vaginal.

En un aspecto la presente invención se refiere a una cepa bacteriana probiótica perteneciente al género *Lactobacillus*, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.

En una realización dicha cepa bacteriana pertenece a una especie elegida entre el grupo integrado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus gasseri* y en otra realización dicha cepa tiene una adhesina específica de manosa u otros mecanismos adhesivos que permiten que las bacterias se unan a la superficie interna de la vagina, el tracto gastrointestinal y la vejiga urinaria incluida la uretra.

En una realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC5, número de depósito DSM 16735.

En otra realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC40, número de depósito DSM 16736.

Aún en otra realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC70, número de depósito DSM 16738.

En otra realización más la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC71, número de depósito DSM 16739.

En otra realización más la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC77, número de depósito DSM 16740.

En otra realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC111, número de depósito DSM 16741.

Aún en otra realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC130, número de depósito DSM 16742.

Aún en otra realización de la invención la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus crispatus* VPC177, número de depósito DSM 16743.

En otra realización más la cepa bacteriana probiótica es *Lactobacillus gasseri* VPG44, número de depósito DSM 16737.

En otra realización las cepas bacterianas descritas antes se utilizan como un medicamento.

En un segundo aspecto la presente invención se refiere a la utilización de una cepa bacteriana como las descritas antes para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la profilaxis de la vaginosis bacteriana, la vaginosis viral, la vaginitis por levaduras, las infecciones vaginales, las enfermedades de transmisión sexual como el VIH y la infección por clamidia, las infecciones que ponen en peligro al feto en mujeres embarazadas, el trabajo de parto prematuro y la infección del aparato urinario.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a la utilización de una cepa bacteriana elegida entre el grupo integrado por *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, o *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la profilaxis de la vaginosis bacteriana, la vaginosis viral, la vaginitis por levaduras, las infecciones vaginales, las enfermedades de transmisión sexual como el VIH y la infección por clamidia, las infecciones que ponen en peligro al feto en mujeres embarazadas, el trabajo de parto prematuro y la infección del aparato urinario con la condición de que se use *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843 para la infección del aparato urinario.

En un cuarto aspecto la presente invención se refiere a una composición que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica como las descritas antes, y/o *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, o *Lactobacillus plantarum* 299v,

número de depósito DSM 9843. En una realización la composición comprende un material portador.

En otra realización la composición es un producto alimenticio, preferentemente compuesto por un material portador elegido del grupo integrado por papilla de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, carbohidratos, proteínas y proteínas glucosiladas. Aún en otra realización dicho producto alimenticio se elige del grupo integrado por pan, queso, yogur, jugo, barritas nutritivas, alimentos para untar, galletas y cereales, todavía en otra realización más, dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está encapsulada o recubierta y está preferentemente presente en una cantidad que, cuando se consume, aporta una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^9 a 10^{10} UFC.

En otra realización más, la composición es un complemento alimenticio, compuesto preferentemente por un material portador elegido del grupo integrado por papilla de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, inulinas, carbohidratos, proteínas y proteínas glucosiladas.

Aún en otra realización la composición es una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de la vaginosis bacteriana, la vaginosis viral, la vaginitis por levaduras, las infecciones vaginales, las enfermedades de transmisión sexual como el VIH y la infección por clamidia, las infecciones que ponen en peligro al feto en mujeres embarazadas, el trabajo de parto prematuro y la infección del aparato urinario, con la condición de que se use *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843 para la infección del aparato urinario.

En una realización dicha composición farmacéutica se administra por vía oral, vaginal o rectal, o se instila en la vejiga urinaria, y preferentemente dicho material portador es al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización dicha composición farmacéutica se administra en un tratamiento combinado de administración oral y vaginal, oral y rectal, u oral, vaginal y rectal.

En otra realización dicha composición farmacéutica se administra en forma de comprimidos, pastillas para chupar, golosinas, chicle, cápsulas, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, supositorios, microenemas, tabletas vaginales, cápsulas de gelatina vaginales, trociscos vaginales, crema, gel, ungüento, lociones, tampones, apósitos, compresas, láminas fundibles, preservativos, pesarios, aerosoles y productos de nutrición clínicos. Aún en otra realización de la composición, cuando se administra por vía oral, dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está presente en una cantidad que aporta una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^9 a 10^{10} UFC, y cuando se administra por vía vaginal o rectal, dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está presente en una cantidad que aporta una dosis diaria eficaz de 10^3 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^5 a 10^9 UFC.

En una realización de la composición farmacéutica dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está encapsulada o recubierta, y en otra realización la composición contiene aditivos elegidos del grupo integrado por vitaminas, minerales y prebióticos.

En un quinto aspecto la presente invención se refiere a un producto de higiene que comprende una composición como la descrita antes. En una realización dicho producto de higiene se elige del grupo integrado por tampones, toallas higiénicas, compresas higiénicas, pañales, jabones, champús, geles, ungüentos, cremas, aerosoles y lociones.

En un sexto aspecto la presente invención se refiere a un cultivo biológico de al menos una cepa bacteriana probiótica como las descritas antes, y/o *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, o *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843.

En un séptimo aspecto la presente invención se refiere a un alimento nuevo que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica como las descritas antes, y/o *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, o *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843.

En un octavo aspecto la presente invención se refiere a un complemento alimenticio que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica como las descritas antes, y/o *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, o *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843.

En una realización dicha cepa bacteriana probiótica es viable. En otra realización está inactivada o reprimida. Aún en otra realización está genéticamente modificada, y en otra más está muerta.

En un octavo aspecto la presente invención se refiere a un fragmento o una fracción de una cepa bacteriana probiótica como las descritas antes.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un dendrograma basado en los análisis RAPD de algunas de las cepas bacterianas probióticas más preferidas.

10 La figura 2 A-I muestra los patrones RAPD para algunas de las cepas bacterianas probióticas más preferidas en las que se basa el dendrograma de la figura 1.

La figura 3A muestra el log ufc/g de heces después de la ingesta de los cuatro productos experimentales diferentes del ejemplo 3.

La figura 3B muestra el log ufc/hisopo en líquido vaginal después de la ingesta de los cuatro productos experimentales diferentes del ejemplo 3.

15 La figura 4 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 177 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

La figura 5 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 5 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

20 La figura 6 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 40 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

La figura 7 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 71 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

25 La figura 8 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 111 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

30 La figura 9 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. crispatus* VPC 130 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

35 La figura 10 muestra fragmentos de ADN separados obtenidos por escisión del ADN cromosómico de la cepa *L. gasseri* VPG 44 con las enzimas de restricción Hind III (carril 2), CIA I (carril 3), Eco RI (carril 4). Se usaron marcadores de peso molecular de ADN como estándares (carriles 1 y 5).

Descripción de la invención

40 La presente invención se refiere entre otras cosas a una composición que contiene una o más cepas de *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus spp* estrechamente relacionados, con capacidad para colonizar la vagina mediante la administración oral y el establecimiento intestinal. Dicha composición preservará por ej. la salud vaginal, atenuará la vaginosis, la vaginitis por levaduras, la infección del aparato urinario, las enfermedades de transmisión sexual y las infecciones que podrían poner en peligro al feto en mujeres embarazadas.

45 Una microflora urogenital saludable consta de >50 especies de microorganismos. Las células urogenitales sanas están cubiertas por biopelículas bacterianas donde predominan los lactobacilos. La vagina sana se mantiene por interacción del epitelio vaginal con la flora microbiana. Los patógenos en la flora fecal son el origen de las infecciones del aparato urinario y la vaginosis bacteriana. Uno de los factores en la patogenia es la capacidad de los patógenos de unirse a las células epiteliales. Las adhesinas y los sitios receptores están implicados en este proceso de unión. Por ejemplo el patógeno *E. coli* tiene una adhesión específica a las manosas de las superficies epiteliales. Algunos lactobacilos han demostrado previamente que también tienen una adhesión específica a las manosas. Mediante el uso de este mecanismo algunos lactobacilos probióticos también pueden evitar que los patógenos se adhieran a las superficies mucosas como la mucosa vaginal y uretral y así prevenir las infecciones. Otros factores son mantener el pH de la vagina bajo mediante el metabolismo de la glucosa, la producción de peróxido de hidrógeno y la producción de análogos de bacteriocinas para suprimir la proliferación de patógenos y otros microorganismos no deseados.

60 La invención se refiere especialmente a las cepas de *Lactobacillus crispatus* VPC5, número de depósito DSM 16735, *Lactobacillus crispatus* VPC40, número de depósito DSM 16736, *Lactobacillus crispatus* VPC70, número de depósito DSM 16738, *Lactobacillus crispatus* VPC71, número de depósito DSM 16739, *Lactobacillus crispatus* VPC77, número de depósito DSM 16740, *Lactobacillus crispatus* VPC111, número de depósito DSM 16741, *Lactobacillus crispatus* VPC130, número de depósito DSM 16742, *Lactobacillus crispatus* VPC177, número de depósito DSM 16743 y *Lactobacillus gasseri* VPG44, número de depósito DSM 16737, que fueron depositados en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 17 de septiembre de 2004 y luego se les

asignaron los números de referencia mencionados antes. Dichas cepas tienen la capacidad de colonizar la vagina.

La invención también se refiere al uso de cepas bacterianas de *Lactobacillus plantarum* 9 HEAL, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que fueron depositadas en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 27 de noviembre de 2002 y luego se les asignaron los números de referencia mencionados.

La invención también se refiere al uso de las cepas bacterianas de *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, que fue depositada el 2 de julio de 1991, y *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843, que fue depositada el 16 de marzo de 1995 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y luego se les asignaron los números de referencia mencionados antes.

La frase "cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s)" según se usa en este documento en referencia a la invención quiere decir microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped. Además, cuando las cepas bacterianas se administran por vía oral, deben sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal y, cuando las cepas bacterianas se administran por vía vaginal o rectal, deben colonizar la vagina y el recto, respectivamente.

La frase "colonizar la vagina humana" según se usa en este documento en referencia a las cepas bacterianas de la invención significa que el recuento de lactobacilos viables (log ufc/hisopo) en el líquido vaginal y/o las heces esté al menos incrementado después de la administración de la cepa bacteriana por vía oral, rectal o vaginal en comparación con el recuento de lactobacilos totales inicial, es decir, antes de la administración de alguna de las cepas bacterianas.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Identificación genotípica por REA

Se examinaron las cepas (*Lactobacillus crispatus* VPC5, número de depósito DSM 16735, *Lactobacillus crispatus* VPC40, número de depósito DSM 16736, *Lactobacillus crispatus* VPC71, número de depósito DSM 16739, *Lactobacillus crispatus* VPC111, número de depósito DSM 16741, *Lactobacillus crispatus* VPC130, número de depósito DSM 16742, *Lactobacillus crispatus* VPC177, número de depósito DSM 16743 y *Lactobacillus gasseri* VPG44, número de depósito DSM 16737, como patrón de escisión del ADN cromosómico, mediante el análisis REA - análisis con endonucleasa de restricción -, según el método de Ståhl M, Molin G, Persson A, Ahné S & Ståhl S, International Journal of Systematic Bacteriology, 40:189-193, 1990, y posteriormente desarrollado por Johansson, M-L, et al., International Journal of Systematic Bacteriology 45:670-675, 1995. Esquemáticamente REA se puede describir como sigue: el ADN cromosómico de las cepas involucradas en el estudio se preparó y escindió con endonucleasas de restricción. Se digirió por separado 0.75 µg de cada ADN a 37 °C durante 4 h con 10 unidades de Hind III, CIA I y EcoRI; cada endonucleasa se utilizó por separado. Los fragmentos de ADN escindidos se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel utilizando geles de agarosa en placas horizontales sumergidos. Los geles consistían en 150 ml de agarosa al 0.9% (ultrapura calidad para ADN; de baja electroendósmosis; Laboratorios BioRad, Richmond, Estados Unidos) y se moldearon como geles en placas (150 por 235 mm). Se usaron como estándares 0.2 µg del marcador de ADN de alto peso molecular (Bethesda Research Laboratories, MD, EE.UU.) junto con 0.5 µg de un marcador de peso molecular de ADN VI (Roche, Alemania). Se lograron mínima distorsión de banda y máxima nitidez mediante la aplicación del ADN de muestra en tampón de carga Ficoll (2 g de Ficoll, 8 ml de agua, bromofenol al 0.25%).

Los geles se corrieron a una tensión constante de 40 V durante 18 h a aproximadamente 6-8 °C. El tampón (Tris 89 mM, H₃PO₄ 23 mM, EDTA sódico 2 mM, pH 8.3) se recirculó durante el período de corrida. Después de eso, los geles se tiñeron durante 20 minutos en bromuro de etidio (2 µg/ml) y se destiñeron en agua destilada, se observaron a 302 nm con un transiluminador UV (UVP Inc., San Gabriel, Estados Unidos) y se fotografiaron. Esta manera de correr la electroforesis en gel produjo una banda bien distribuida y relativamente bien separada hasta un peso molecular de 1.2 x 10⁶.

Los resultados del análisis se presentan en las figuras 4 a 10.

Ejemplos

Ejemplo 1

Voluntarias y cepas

Diez mujeres sanas de diferentes edades sin infecciones vaginales ni ninguna otra enfermedad intestinal participaron en el estudio. Los sujetos del estudio proporcionaron información acerca de su edad, ciclo menstrual y

comportamiento respecto a la salud mediante un cuestionario. Una semana antes de que se tomaran las primeras muestras las voluntarias tuvieron un período de reposo farmacológico en el cual evitaron todo tipo de fórmulas que contuvieran probióticos.

5 Las cepas bacterianas utilizadas en el estudio se presentan en la tabla 1. Se eligieron entre una batería de 23 *Lactobacillus* después de evaluar cualidades tales como recuento de viables luego del cultivo en el laboratorio, fermentación de la papilla de avena y capacidad para soportar la congelación y descongelación.

10 Se seleccionaron 12 de las cepas más resistentes para la administración a las voluntarias; la concentración bacteriana y el tiempo de incubación para el cultivo se indican en la tabla 1. La administración se realizó durante 10 días. Las cepas bacterianas se prepararon a partir de un cultivo fresco en medio de lactobacilos LCM (*Lactobacillus carrying medium*) (Efthymiou C, Hansen CA. An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. J Infect Dis 1962; 110: 258-267). Se cosecharon por centrifugación células de cada cultivo equivalentes a una concentración de aproximadamente 10⁹ bacterias en un volumen total de 100 ml y se lavaron una vez en H₂O Millipore. Después los sedimentos se disolvieron en 20 ml de leche de avena (Beneviva, Finlandia) y 80 ml de sopa de arándanos (Ekströms, Suecia), que fue la bebida administrada a los sujetos.

Tabla 1. Cepas bacterianas de *Lactobacillus* (L.) seleccionadas para la administración.

Especie bacteriana	Número de cepa	Fuente (humana)	Conc. de administración (× 10 ⁹)	Tiempo de incubación (d)
<i>L. crispatus</i>	VPC77	vagina	1.1	2
<i>L. crispatus</i>	VPC111	vagina	1.0	2
<i>L. crispatus</i>	VPC130	vagina	2.7	2
<i>L. crispatus</i>	VPC5	vagina	1.2	2
<i>L. crispatus</i>	VPC40	vagina	1.3	2
<i>L. crispatus</i>	VPC70	vagina	1.6	2
<i>L. crispatus</i>	VPC71	vagina	1.1	2
<i>L. crispatus</i>	VPC177	vagina	1.6	2
<i>L. gasseri</i>	VPG44	vagina	1.1	1
<i>L. plantarum</i>	HEAL19	mucosa intestinal	1.3	1
<i>L. plantarum</i>	HEAL9	mucosa intestinal	2.2	1
<i>L. plantarum</i>	HEAL99	mucosa intestinal	1.2	1

20 Recolección de las muestras

Las voluntarias entregaron muestras fecales y de líquido vaginal que se cultivaron en placas de agar en el transcurso de 3 horas después de la entrega al laboratorio. La recolección de muestras se hizo al principio del tratamiento (T0), a los 10 días de la administración (T1) y 7 días después de finalizada la administración (T2).

25 Se tomaron muestras vaginales introduciendo un hisopo vaginal (hisopos de gel de agar Amies Copan ; Copan innovation, Italia) a través de un capuchón para evitar la contaminación bacteriana. Los hisopos vaginales se agitaron en 9 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) estéril de pH 7.2 y se diluyeron en serie. Se agitó 1 gramo de heces en 9 ml de PBS y se diluyó en serie. Se sembraron en placas alícuotas de cada dilución de las muestras vaginales y de las tres últimas diluciones de las muestras fecales en medio Rogosa agar (Oxoid AB, Sollentuna, Suecia) y se incubaron en anaerobiosis durante tres días en un sistema Gas Pack de BBL a 37 °C.

35 Se recogieron con ansa, al azar, seis colonias tanto de las muestras fecales como de las vaginales luego de la incubación. Además, se buscaron las colonias con aspecto morfológico típico y cuando se encontraron también se recogieron con ansa.

Tipificación de la cepa

40 En total se agruparon 338 cepas aisladas utilizando amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) junto con las cepas administradas. Se volvieron a cultivar en Rogosa agar (Oxoid) para verificar que no estuvieran contaminadas.

El cebador utilizado en la amplificación por PCR fue un 9-mero con la secuencia 3'-ACG CGC CCT - 5'

(Scandinavian Gene Synthesis AB, Köping, Suecia). La amplificación por PCR y la electroforesis en gel siguientes se realizaron como describió previamente Quednau M, Ahrné S, Pettersson AC, Molin G. Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) *Curr. Microbiol.* 1998; 36: 332-6. Se usó 1 µl de plantillas de PCR en un volumen total de reacción de 50 µl con tampón para PCR con 1.5 mM de MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 0.2 mM de cada nucleótido (Roche) y 2.5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (Roche). La amplificación por PCR se realizó según el perfil de temperatura siguiente: 94 °C durante 45 s, 30 °C durante 120 s, 72 °C durante 60 s, por cuatro ciclos seguido de 94 °C durante 5 s, 36 °C durante 30 s (con extensión de 1 s por cada ciclo), 72 °C durante 30 s, por 26 ciclos. La sesión de PCR concluyó con 72 °C durante 10 minutos, seguida de enfriamiento hasta 4 °C. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y se escanearon los negativos de las fotos de los geles de RAPD con un Hewlett Packard ScanJet 5300C en una computadora con una resolución de 300 dpi. Las imágenes del gel se analizaron y agruparon después mediante GelCompar 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) con un coeficiente de correlación de Pearson del producto-momento (r) y el método de promedio aritmético de grupo de pares no ponderados (UPGMA).

15 Identificación de la cepa

Análisis con endonucleasa de restricción (REA)

20 Se seleccionaron treinta y seis cepas aisladas junto con las cepas administradas del agrupamiento RAPD y se identificaron por REA (análisis con endonucleasas de restricción) para asegurar la presencia de las cepas exógenas en las muestras fecales y vaginales de los sujetos.

25 La preparación del ADN cromosómico se llevó a cabo según un procedimiento descrito previamente (Ulrich RL, Hughes TA. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other gram-positive bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2001; 32: 52-56). La electroforesis en gel se hizo de acuerdo con un protocolo anterior de Johansson *et al* (Johansson ML, Quednau M, Ahrné S, Molin, G. Classification of *Lactobacillus plantarum* by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using conventional agarose gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 670-5).

30 Se digirió ADN (0.75 µg) por separado a 37 °C durante 4 horas con 10 unidades de *HindIII* y *EcoRI* (Roche). Se usaron geles en placas de agarosa al 0.9% horizontales sumergidos (agarosa de calidad analítica de alta fuerza: baja electroendósmosis, Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.) de 150 por 235 mm de tamaño. Se usaron como estándares cantidades de 0.2 µg del marcador de ADN de alto peso molecular (Gibco, Invitrogen Corporation, Suecia) junto con 0.5 µg de un marcador de peso molecular de ADN VI (Roche). Los geles se corrieron a una tensión constante de 35 40 V durante 18 h a 5 °C. Después de eso, se visualizaron las bandas a 302 nm con un transiluminador UV (UVP Inc., San Gabriel, CA, EE.UU.) y se fotografiaron.

Resultados

40 Se recuperaron cinco de las cepas administradas de 8 de los 10 sujetos, tanto después de los 10 días de tratamiento (T1) como 1 semana después de finalizada la administración (T2). Las cepas reaisladas en T1 fueron *L. crispatus* VPC177, *L. gasseri* VPG44 y *L. plantarum* HEAL 19; mientras que *L. plantarum* HEAL 99 y *L. plantarum* HEAL 9 se recuperaron tanto en T1 como en T2 (Tabla 2).

45 Tabla 2. Cepas reaisladas encontradas en muestras de materias fecales y vaginales de sujetos (S). "d" entre paréntesis indica que la cepa se reaisló de una colonia escogida al azar, es decir, que la cepa representó una parte dominante de la flora de lactobacilos total.

La cepa	Número de sujetos	Tiempo de muestreo	
		T1	T2
<i>L. crispatus</i>	S7	heces	-
VPC177			
<i>L. gasseri</i>	S2	heces	-
VPG44	S10	heces (d) *	-
<i>L. plantarum</i>	S3	heces (d)	-
HEAL19	S4	heces	-
	S5	heces (d);	-
	S6	vagina	-

La cepa	Número de sujetos	Tiempo de muestreo	
		T1	T2
	S7	heces (d)	-
	S8	heces (d);	-
	S9	vagina (d)	-
	S10	heces (d)	-
		heces	
		vagina (d)	
<i>L. plantarum</i>	S3	heces (d)	vagina (d)
HEAL99/9	S4	-	vagina (d)
	S7	heces (d)	-
	S9	heces (d)	-
	S10	heces (d)	-

RAPD - amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

5 Las cepas bacterianas más interesantes también se analizaron con el método basado en la PCR de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) descrito por Johansson et al. 1995 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. Lett. Appl. Microbiol.21:155-159, con las modificaciones siguientes. Se prepararon extractos crudos de células de 3 a 5 colonias de un cultivo puro de las placas de agar MRS. Las células del cultivo puro se lavaron dos veces en 1 ml de agua estéril Milli-Q y se rompieron en un tubo Eppendorf con perlas de vidrio (2 mm de diámetro) utilizando un mezclador de Eppendorf (5432; Eppendorf, Hamburgo Alemania) durante 10 minutos. El cebador utilizado tenía la secuencia 5'-CCGCAGCCAA-3' y una concentración de 15 µM. Se usó la mastermix Taq de Qiagen en la reacción de PCR. Se analizaron los patrones de banda para los geles con coeficiente de correlación de Pearson del producto-momento (r) y el método de promedio aritmético de grupo de pares no ponderados (UPGMA; Romersburg, 1984) usando BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). El análisis computarizado de grupos de los patrones de RAPD se combinó con una comparación visual.

20 Mediante el método RAPD descrito antes se pudieron identificar ocho cepas de *L. crispatus* y una cepa de *L. gasseri* de dos grupos de la tabla 1 que contienen cepas con 80% de similitud (véase el dendrograma de la figura 1). Las cepas dentro de un grupo de ese tipo son consideradas como variantes una de otra y se prevé que tengan propiedades similares. Uno de los grupos contiene las cepas VPC 70, VPC 71 y VPC 5 y el otro contiene las cepas VPC 177, VPC 40 y VPC 111. Por ejemplo la cepa VPC 177 se pudo encontrar en la vagina tras la administración oral y por lo tanto, es probable que otras cepas dentro del mismo grupo RAPD también tengan la capacidad para hacerlo.

25 Conclusión

30 El experimento demuestra una inesperada capacidad de las cepas de *L. plantarum* elegidas, para colonizar la vagina por administración oral y establecimiento intestinal. Se debe señalar que el resultado se logra con dosis relativamente bajas de probióticos administrados por tiempos cortos y que las cepas de *L. plantarum* se compararon con cepas más típicas de la vagina, es decir, especies que aparecen con más frecuencia y cepas aisladas de vagina.

Ejemplo 2

35 Aglutinación de levadura como una medida de la adhesión a las manos

40 En este experimento la capacidad de las bacterias para aglutinar células de levadura se determinó a ojo como precipitación visible de las células de levadura y bacterias. Las bacterias lavadas se suspendieron a una concentración de 2×10^{10} células por ml en PBS (pH 7.2). Una solución de 2.5% (peso/vol) de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) suspendida en PBS o PBS con 0.125% (peso/vol) de D-Manosa se agregó a un volumen igual de solución bacteriana en un portaobjetos de microscopio. Las soluciones de bacterias y levaduras se mezclaron balanceando suavemente el portaobjetos y se calculó el número de veces hasta que apareció una precipitación de células de levadura y bacterianas aglutinadas. Este número de veces se comparó

entre la solución con y sin manosa. La aglutinación de levadura se clasificó como sensible a la manosa si el número de veces hasta que aparecía una precipitación visible difería más de diez veces entre las muestras con o sin manosa.

5 Durante el experimento se demostró que el *Lactobacillus crispatus* VPC 177 y VPC 70 tienen la capacidad de aglutinar la levadura de manera sensible a la manosa. Se demostró previamente que la aglutinación de la levadura sensible a la manosa se correlaciona con la capacidad de adherirse a las células de la línea celular de carcinoma de colon humano HT-29. (Adlerberth, I., Ahrné, S., Johansson, M-L., Molin, G., Hanson, L-Å., y Wold, A.E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2244-2251.), y por lo tanto es un factor que promueve la colonización y la persistencia de la bacteria en cuestión en el intestino. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que sea cierto que esta característica de las bacterias también sea de importancia para la colonización de la vagina y del aparato urinario, y por consiguiente un mecanismo para competir con las cepas bacterianas uropatógenas de *Escherichia coli*. Esta característica, un mecanismo de adhesión específica a manosa, también se ha demostrado previamente para *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, y *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843.

Ejemplo 3

20 El objetivo del experimento siguiente era investigar el establecimiento de 4 cepas de *Lactobacillus* en los intestinos y la vagina mediante el estudio de su presencia en las heces y el líquido vaginal después de la ingestión de bacterias del ácido-lácticas en una fórmula liofilizada.

25 Es importante enfatizar que el experimento se lleva a cabo *in vivo* en seres humanos, porque ni los estudios *in vitro* ni los estudios en animales reflejarían el grado de supervivencia cuando se administran a los seres humanos. La capacidad de estas bacterias para establecerse en el intestino cuando se administran directamente después de cultivarlas está documentado en un estudio anterior (Moreno, Alejandra Vásquez 2004 tesis doctoral: Systematics of *Lactobacillus* spp. of probiotic potential Food Technology; Lund University.) En dicho estudio se utilizaron células bacterianas frescas de un cultivo de toda la noche. Sin embargo, sería más conveniente utilizar un producto liofilizado en un producto real. Por lo tanto, por ese motivo en este experimento se eligió una formulación liofilizada.

El objetivo principal era investigar la presencia en las heces y el líquido vaginal de cuatro cepas de *Lactobacillus*, originarias de la vagina, después de la administración oral de las cepas en un estudio abierto.

35 Puesto que muchas enfermedades de la vagina como infección del aparato urinario se originan en la mucosa rectal es beneficioso ver un aumento en el recuento de lactobacilos saludables viables en las heces y el líquido vaginal. Si las cepas bacterianas saludables de la invención afectan al recto además de a la vagina, los lactobacilos saludables de la invención suprimirán las bacterias no deseadas del recto, evitando enfermedades vaginales que ascienden desde el recto.

40 Materiales y métodos

Diseño del experimento

45 El experimento fue un estudio abierto y se llevó a cabo en un grupo de sujetos. El experimento se dividió en ocho periodos:

1. Un período de reposo farmacológico de 14 días (días 1-14)
2. Un periodo de ingestión de *Lactobacillus crispatus* VPC 111 durante 14 días (días 15-28).
3. Un período de reposo farmacológico de 14 días (días 29-42)
- 50 4. Un periodo de ingestión de *Lactobacillus gasseri* VPG 44 durante 14 días (día 43-56).
5. Un período de reposo farmacológico de 14 días (días 57-70)
6. Un periodo de ingestión de *Lactobacillus crispatus* VPC 177 durante 14 días (días 71-84).
7. Un período de reposo farmacológico de 14 días (días 85-98)
8. Un periodo de ingestión de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 durante 14 días (días 99-112).

55 Sujetos y elección de los mismos

60 Se reunieron 36 mujeres sanas de 18-65 años de edad mediante el envío de información a las empleadas de Ideon and Chemical Centre (Universidad de Lund) en Lund. Se excluyeron las empleadas de Probi AB, que se sabía que tenían intolerancia o alergia a cualquiera de los ingredientes de las formulaciones, las que estaban en tratamiento por trastornos gastrointestinales graves o que estaban en tratamiento por trastornos vaginales.

Los productos experimentales contenían *Lactobacillus crispatus* VPC 177, *Lactobacillus crispatus* VPC 111, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 y *Lactobacillus gasseri* VPG 44, respectivamente. Se agregaron sacarosa,

maltodextrina y gelatina hidrolizada como crioprotectores.

La ingesta diaria fue de 2 x 1 g de lactobacilos liofilizados (aproximadamente 1 x 10⁹ ufc/día). Las dosis se tomaron por la mañana y por la tarde y se debían ingerir junto con una comida. El producto se suministró en sobres.

5 Instrucciones con relación a la dieta

Desde el día 1 al día 113, los sujetos no podían ingerir productos que contuvieran bacterias probióticas. A cada sujeto se le proporcionó una lista de los productos probióticos que no debía consumir durante el periodo de estudio. Esto se hizo para asegurar que otras bacterias probióticas no pudieran interferir con el experimento.

10 Medicación concomitante

Toda la medicación concomitante se debía anotar en el cuaderno de recogida de datos (CRD) y en el diario.

15 Los criterios de exclusión durante el estudio fueron sujetos que no habían tomado > 4 dosis (2 días) sucesivas o no habían tomado un total de > 8 dosis (4 días) durante cada periodo de ingestión del estudio, sujetos que no habían seguido las instrucciones con relación a la dieta, sujetos que habían comenzado una tanda de tratamiento médico para una enfermedad gastrointestinal grave entre el día 1 y el 112 (a discreción del investigador principal) y sujetos que deseaban suspender el estudio.

20 Las muestras fecales y vaginales se entregaron los días 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99 y 113. La muestra del día 15, 43, 71 y 99 se recogió antes de tomar la primera dosis de los periodos del producto experimental. Las muestras se recogieron no más de 18 horas antes de ser entregadas para su análisis y durante este periodo se almacenaron en un refrigerador. Las muestras se analizaron para detectar presencia de lactobacilos.

30 Las muestras vaginales se recogieron introduciendo un hisopo vaginal (hisopos de gel de agar Amies Copan; Copan Innovation, Italia) a través de un capuchón para evitar la contaminación bacteriana. Las muestras se recogieron no más de 3 horas antes de ser entregadas para su análisis y durante este periodo se almacenaron en un refrigerador.

35 Las muestras se analizaron microbiológicamente (según Johansson et al., 1998) con respecto a la flora de lactobacilos. (Agar rocosa, anaeróticamente, 3 días a 37 °C.) Se identificaron los diferentes lactobacilos con un análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) según Johansson et al., Lett. Appl. Microbiol. 1995; 21: 155-159.

Se calcularon los valores estadísticos según la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, ver tablas 1 y 2.

Resultados

40 De las 36 mujeres incluidas 31 participaron en los periodos 1 y 2 (WO + VPC111), 34 en los periodos 3 y 4 (WO + VPG44), 28 en los periodos 5 y 6 (WO + VPC177) y 31 en los periodos 7 y 8 (HEAL 9). 25 de las mujeres participaron en todos los periodos de estudio.

45 Tabla 1 Lactobacilos (media (mín-máx)) en muestras fecales antes y después de una ingesta de 2 semanas del producto experimental. Los valores inferiores al nivel de detección se fijan en 3.0 y los valores superiores al nivel de detección se fijan en 9.0 para habilitar el cálculo.

Cepa en producto exp.	Recuentos fecales (ufc/g) de	
	lactobacilos totales	cepa exp. administrada
VPC111		
Antes de la ingesta	4.9 (<3-7.3)	3.0 (<3-4.6)
Después de la ingesta	6.2 (<3->9)	3.0 (<3)
	p = 0.01	
VPG44		
Antes de la ingesta	5.8 (<3->9)	3.0 (<3-4.2)
Después de la ingesta	6.1 (3.8-8.7)	3.3-(<3-5.9)
VPC177		
Antes de la ingesta	5.4 (<3.0-9.0)	3.1 (<3-4.5)

VPC177		
Después de la ingesta	7.0 (<3.0-9.8)	3.3 (<3-8.1)
	p = 0.000	
HEAL9		
Antes de la ingesta	6.9 (<3->9)	3.0 (<3)
Después de la ingesta	7.2 (4.0-9.4)	5.8 (<3-8.0)
		p = 0.000

Tabla 2 Lactobacilos (media (mín-máx)) en muestras vaginales antes y después de 2 semanas de ingesta del producto experimental. Los valores inferiores al nivel de detección se fijan en 2.0 para las muestras vaginales para habilitar el cálculo.

Cepa en producto exp.	Recuentos (log ufc/hisopo)	
	lactobacilos totales	Cepa exp. administrada
VPC111		
Antes de la ingesta	5.0 (<2 - 8.2)	2.0 (<2-4.6)
Después de la ingesta	4.9 (<2 -8.0)	2.3 (<2 - 7.3)
VPG44		
Antes de la ingesta	5.1 (<2 - 8.8)	2.0 (<2)
Después de la ingesta	5.2 (<2 - 8.4)	2.0 (<2)
VPC177		
Antes de la ingesta	4.7 (<2 - 8.0)	2.2 (<2-6.6)
Después de la ingesta	5.3 (<2 - 8.2)	2.2 (<2-7.2)
	p = 0.03	
HEAL9		
Antes de la ingesta	5.4 (<2 - 8.3)	2.0 (<2)
Después de la ingesta	5.3 (<2 - 8.5)	2.1 (<2-4.2)

Las dos cepas de *Lactobacillus crispatus* VPC111 y VPC177 causaron aumentos significativos de los lactobacilos totales en la flora fecal. Además se observaron aumentos significativos en los lactobacilos totales en el líquido vaginal después de la ingesta de VPC177. Por lo tanto, es muy interesante notar que después de la administración oral de las bacterias probióticas *Lactobacillus crispatus* VPC111 y VPC177 se observa un aumento total de los lactobacilos en las heces. También se observó un aumento significativo de lactobacilos totales en el líquido vaginal después de la administración de *Lactobacillus crispatus* VPC177 por vía oral. Por lo tanto, no es necesario lograr efectos beneficiosos en la vagina o el recto en términos de lactobacilos saludables por administración de la cepa en un supositorio o un inserto vaginal. Ahora se ha demostrado que la ingesta de determinados lactobacilos, tales como *L. crispatus* VPC111 y VPC177, conduce a un aumento total de lactobacilos en las heces, así como en el líquido vaginal.

La falta de efecto de *L. plantarum* HEAL9 tanto sobre la flora fecal como la vaginal puede ser debido a la alta concentración inicial de lactobacilos totales. Se podría especular que el período de reposo farmacológico después de la ingesta de VPC177 no fue suficiente (Fig. 1 y 2). Sin embargo, cabe señalar que en 27 mujeres de 31, *L. plantarum* HEAL9 se pudo recuperar por análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) según Johansson et al., Lett. N° de 1995; 21: 155-159. Las otras cepas experimentales también se recuperaron en mujeres analizadas por (RAPD) después de la ingesta.

En conclusión, el aumento significativo de la concentración de lactobacilos totales en las heces y el líquido vaginal indica que los lactobacilos eran activos y estaban establecidos. Puesto que no se había suministrado ningún otro material probiótico durante cada período de ingesta debe ser la cepa bacteriana probiótica ingerida la que logra el efecto.

Por lo tanto, las cepas de lactobacilos vaginales, es decir, las cepas que se aislaron de la vagina originalmente,

- 5 pueden sobrevivir al pasaje a través del tracto gastrointestinal mediante un producto liofilizado administrado por vía oral y son capaces de volver a colonizar la vagina. El *Lactobacillus crispatus* VPC177 en particular, aumenta la concentración total de lactobacilos en la vagina. Esto es muy sorprendente ya que se sabe que la estabilidad de las cepas de lactobacilos vaginales aisladas es muy baja debido a una muy alta sensibilidad. Para aumentar los efectos beneficiosos de las cepas bacterianas de la invención en términos de salud vaginal, la administración de la cepa bacteriana tanto por vía oral como por vía vaginal ayudará a la vagina a mantenerse aún más saludable.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana probiótica elegida del grupo integrado por *Lactobacillus crispatus* VPC5, número de depósito DSM 16735, *Lactobacillus crispatus* VPC40, número de depósito DSM 16736, *Lactobacillus crispatus* VPC570, número de depósito DSM 16738, *Lactobacillus crispatus* VPC71, número de depósito DSM 16739, *Lactobacillus crispatus* VFC77, número de depósito DSM 16740, *Lactobacillus crispatus* VPC111, número de depósito DSM 16741, *Lactobacillus crispatus* VPC130, número de depósito DSM 16742, *Lactobacillus crispatus* VPC177, número de depósito DSM 16743, y *Lactobacillus gasseri* VPG44, número de depósito DSM 16737, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.
2. Una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la reivindicación 1, que es viable.
3. Una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es genéticamente modificada.
4. Una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar como un medicamento.
5. El uso de una cepa bacteriana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la profilaxis de la vaginosis bacteriana, la vaginosis viral, la vaginitis por levaduras, las infecciones vaginales y la infección del aparato urinario.
6. El uso de una cepa bacteriana elegida del grupo integrado por *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la profilaxis de la vaginosis bacteriana, la vaginosis viral, la vaginitis por levaduras, las infecciones vaginales y la infección del aparato urinario.
7. Una composición que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, o *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene un material portador.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que es un producto alimenticio.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que es un complemento alimenticio.
11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, donde dicho material portador se elige del grupo integrado por papilla de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, inulinas, carbohidratos, proteínas y proteínas glucosiladas.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9 u 11, donde dicho producto se elige del grupo integrado por pan, queso, yogur, jugo, barritas nutritivas, alimentos para untar, galletas y cereales.
13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está encapsulada o recubierta.
14. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está presente en una cantidad que, cuando se consume, aporta una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^9 a 10^{10} UFC.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que es una composición farmacéutica.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha composición se administra por vía oral, vaginal o rectal, o se instila en la vejiga urinaria.
17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha composición se administra en un tratamiento combinado de administración oral y vaginal, oral y rectal, u oral, vaginal y rectal.
18. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde dicho material portador es al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
19. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que se administra en forma de

comprimidos, pastillas para chupar, golosinas, chicle, cápsulas, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, supositorios, microenemas, tabletas vaginales, cápsulas de gelatina vaginales, trociscos vaginales, crema, gel, ungüento, lociones, tampones, apósitos, compresas, láminas fundibles, preservativos, pesarios, aerosoles y productos de nutrición clínicos.

5 20. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que se administra por vía oral, donde dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está presente en una cantidad que aporta una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^9 a 10^{10} UFC.

10 21. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que se administra por vía vaginal o rectal, donde dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está presente en una cantidad que aporta una dosis diaria eficaz de 10^3 a 10^{12} UFC, preferentemente de 10^5 a 10^9 UFC.

15 22. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, donde dicha al menos una cepa bacteriana probiótica está encapsulada o recubierta.

23. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 21, que contiene aditivos elegidos del grupo integrado por vitaminas, minerales y prebióticos.

20 24. Un producto de higiene que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o 15 a 23.

25 25. Un producto de higiene de acuerdo con la reivindicación 24, elegido del grupo integrado por tampones, toallas higiénicas, compresas higiénicas, pañales, jabones, champús, geles, ungüentos, cremas, aerosoles y lociones.

26. Un cultivo biológico de al menos una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, o *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.

30 27. Un alimento que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, o *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.

35 28. Un complemento alimenticio que contiene al menos una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, número de depósito DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, número de depósito DSM 15313, o *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, número de depósito DSM 15316, que tiene la capacidad de colonizar la vagina humana.

40

45

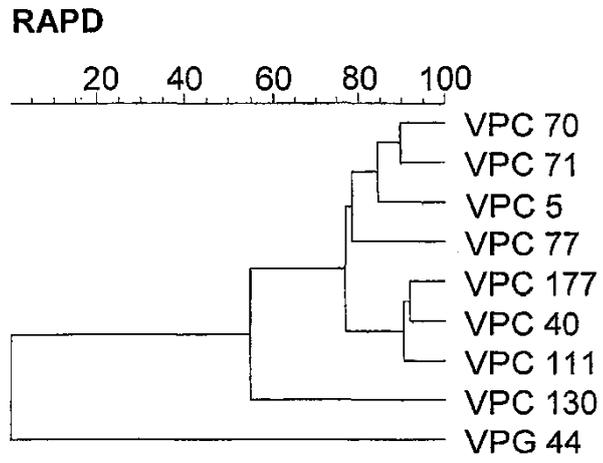


Figura 1

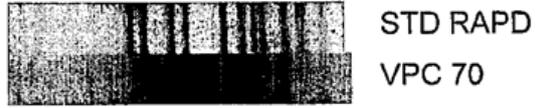


Figura 2A

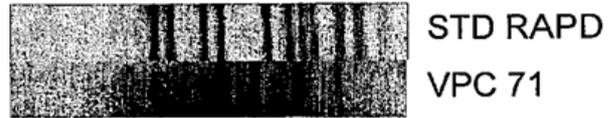


Figura 2B

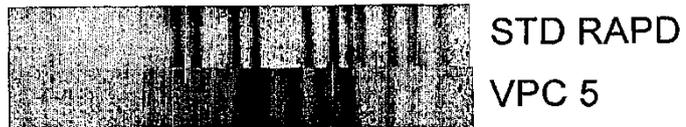


Figura 2C

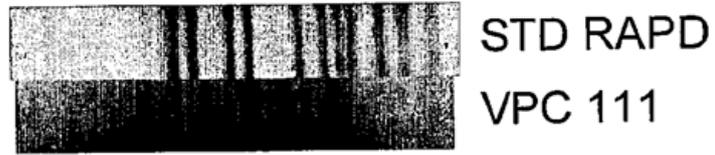


Figura 2D

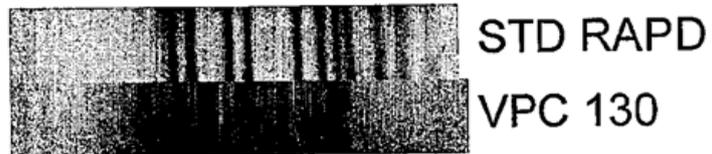


Figura 2E

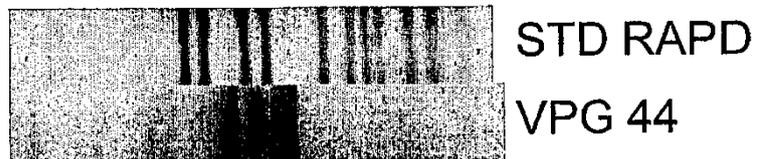


Figura 2F

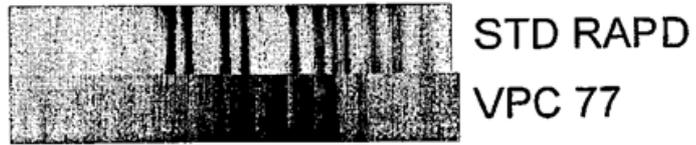


Figura 2G

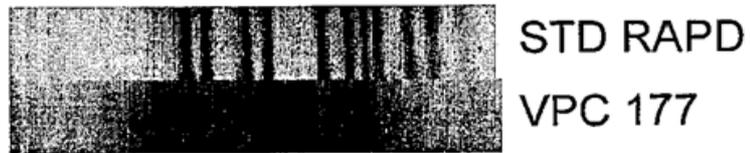


Figura 2H

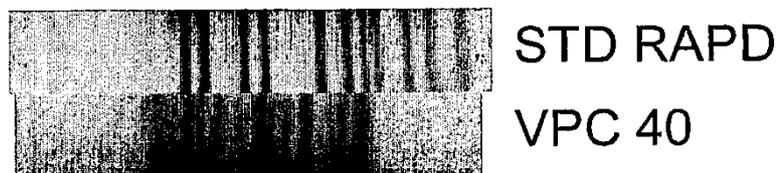


Figura 2I

Figura 3A

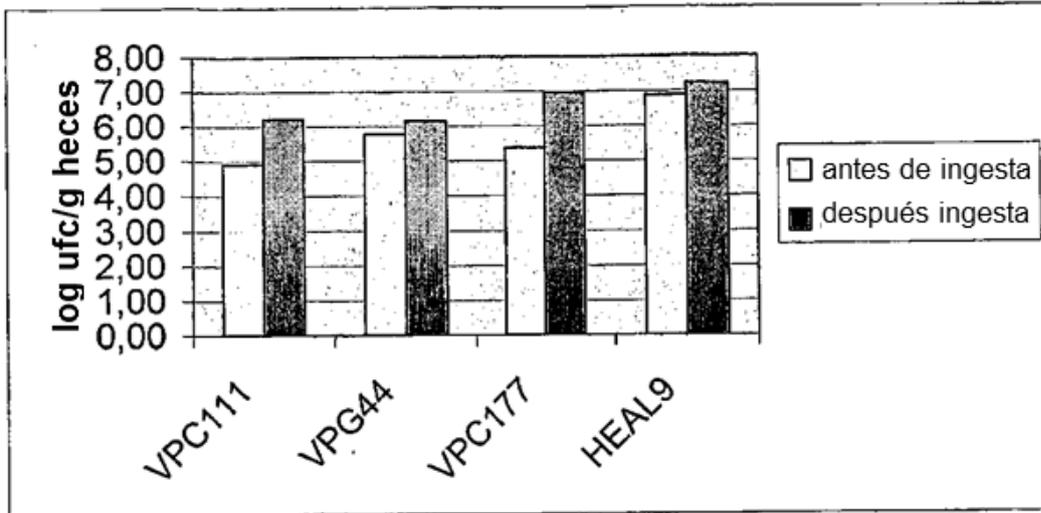


Figura 3B

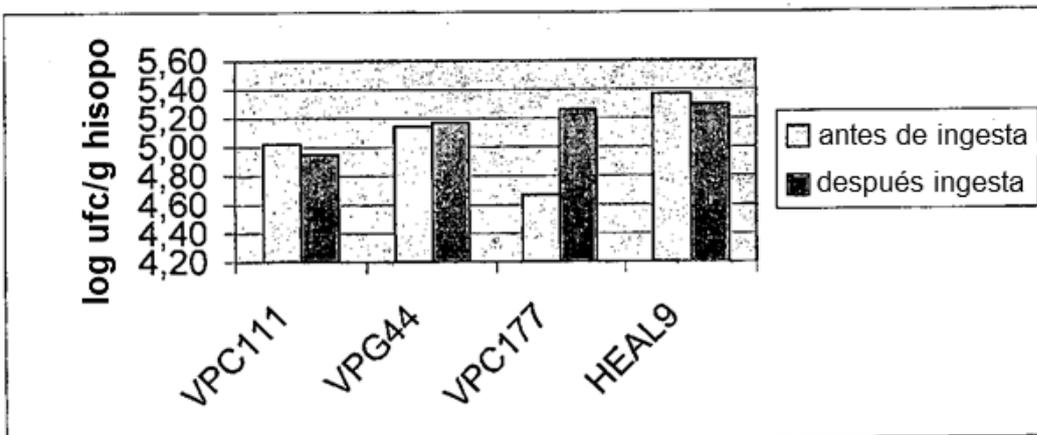


Figura 4



Figura 5

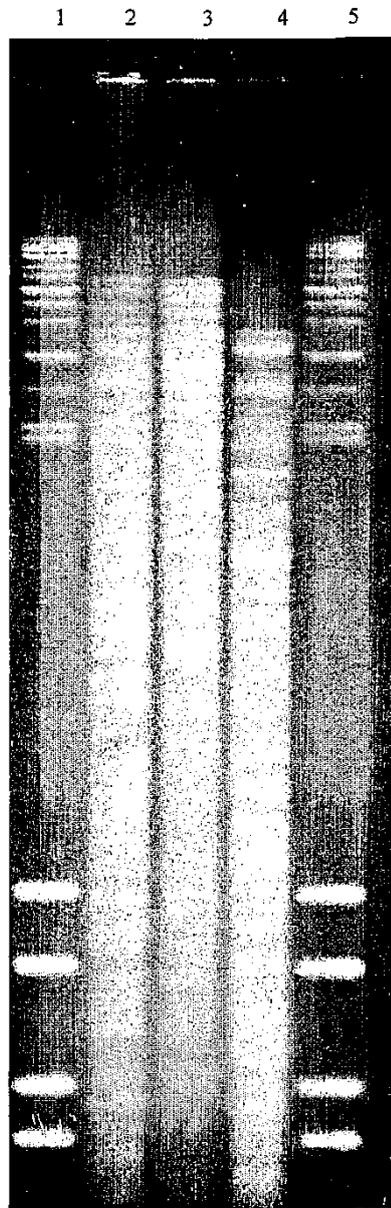


Figura 6

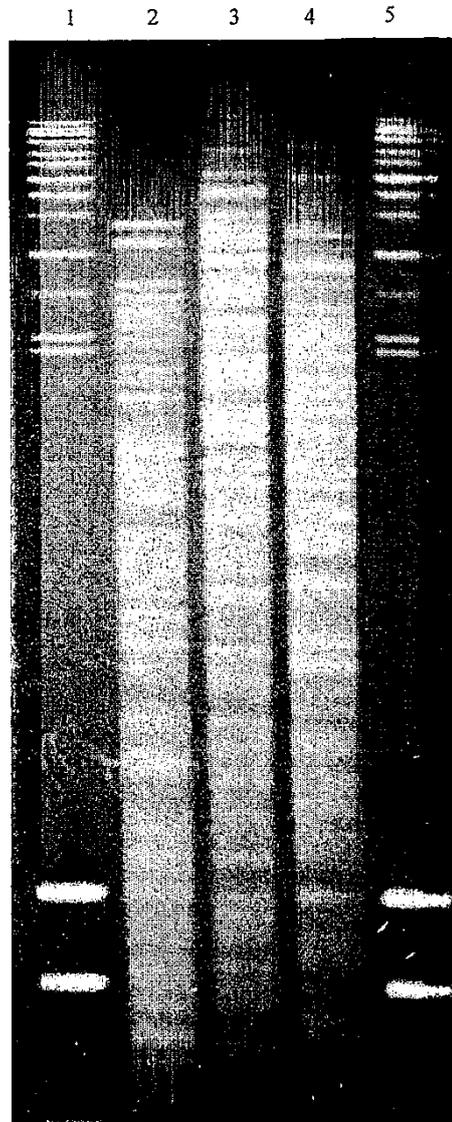


Figura 7

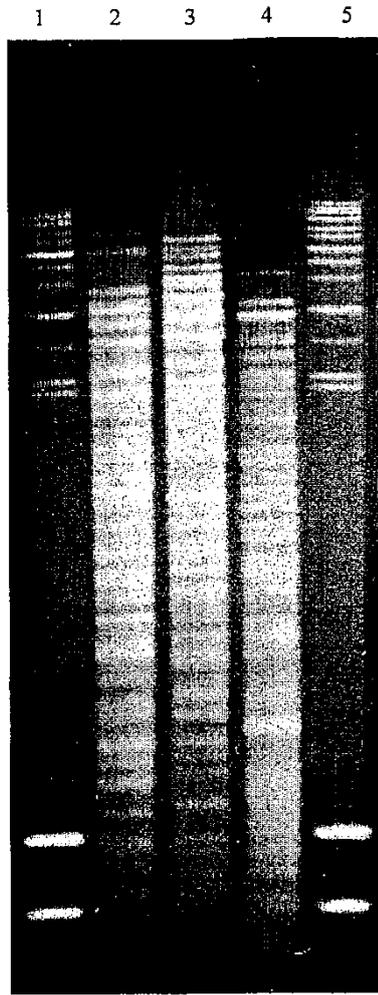


Figura 8



Figura 9

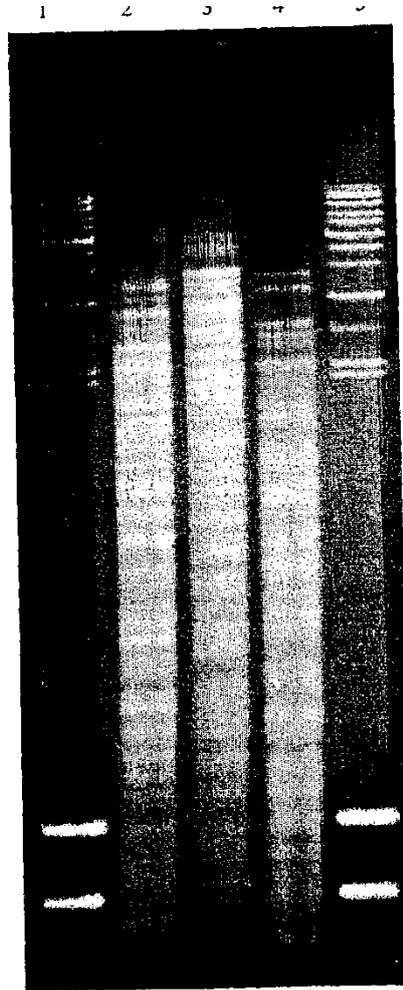


Figura 10

