

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 432**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2005 E 12178634 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2561880**

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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.12.2014**

73 Titular/es:

**GRAF, FEDERICO, DR. (100.0%)**

**Sempacherstrasse 19**

**8032 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**GRAF, FEDERICO;**

**GROB, PHILLIP y**

**BASSART, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 524 432 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

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a una nueva cepa de bacterias probióticas y al uso de la misma en el tratamiento de problemas infecciosos provocados por diversos patógenos en mamíferos, más específicamente la prevención y/o el tratamiento de infecciones genitourinarias y/o gastrointestinales en seres humanos.

10

**Antecedentes de la invención**

Las infecciones genitourinarias siguen siendo un problema común, particularmente en la población femenina. La adherencia bacteriana al epitelio genitourinario se reconoce como un mecanismo importante en el inicio y la patogénesis de infecciones del tracto urinario (UTI) y, en particular, de infecciones vaginales. Los patógenos genitourinarios se originan predominantemente en el tracto intestinal y colonizan inicialmente la región periuretral y ascienden hacia la vejiga, dando como resultado bacteriuria sintomática o asintomática. Alternativamente, estas bacterias invaden y luego colonizan la vagina provocando en la misma diversos tipos de infecciones vaginales sintomáticas así como asintomáticas. Después de eso, dependiendo de factores del huésped y factores de virulencia bacteriana, los organismos pueden ascender adicionalmente y dar lugar a pielonefritis, o infecciones ascendentes del tracto genital en mujeres. Los patógenos genitourinarios expresan características de virulencia que les permiten resistir los mecanismos de defensa del huésped normalmente eficaces.

15

20

25

30

El uso de bacterias de la flora autóctona, tales como lactobacilos, para no permitir que patógenos genitourinarios colonicen el tracto genitourinario, es un concepto demostrado estudiado de manera bastante extensa desde hace años (véanse por ejemplo 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).

35

40

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

45

El uso de bacterias procedentes de la microflora autóctona, como por ejemplo lactobacilos, para no permitir que 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 prensa, disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science>). Algunas de las cepas de bacterias del ácido láctico mencionadas en la bibliografía anterior se han resaltado por su efecto en el tracto gastrointestinal y se han propuesto como posibles agentes activos adecuados para tratar diversos problemas o trastornos provocados por patógenos, por ejemplo diarrea.

50

El objetivo principal de una terapia con agentes bacterianos debe ser prevenir el crecimiento excesivo de patógenos hasta un tiempo tal que la microflora vaginal o intestinal normal pueda restablecerse. Además, la terapia probiótica se considera como "natural" y sin efectos secundarios en contraposición con tratamientos químicos o antibióticos convencionales.

55

Dentro de ese contexto se ha observado sorprendentemente que cepas de bacterias del ácido láctico representativas de la flora vaginal humana sana que presentaban 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-Zúrich) también eran provechosas y por consiguiente útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de infecciones o trastornos intestinales iniciados por patógenos gastrointestinales.

60

Hoy en día, a pesar de los progresos que ya se han realizado con respecto al conocimiento íntimo de cepas de bacterias del ácido láctico (LAB), sus propiedades y su posible uso en el área probiótica, todavía sigue existiendo la necesidad de proponer bacterias más convenientes y más eficaces, concretamente cepas de bacterias probióticas, a la comunidad médica.

65

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, o del tracto 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 quimioterápicos.

- 5 El fin de esta invención es proporcionar también nuevos tratamientos profilácticos o terapéuticos de tales infecciones o enfermedades inflamatorias que implican cepas probióticas específicamente seleccionadas.

### La invención

- 10 La invención comprende las siguientes realizaciones:

Realización 1: Una cepa de bacterias del ácido láctico que pertenece a la especie *Lactobacillus jensenii* identificada como L. jensenii KS 119.1, entregada el 4 de junio de 2004 en el CNCM del Instituto Pasteur con el número de registro CNCM 1-3217.

- 15 Realización 2: Una composición probiótica que comprende una cantidad eficaz de la cepa de bacterias del ácido láctico según la realización 1 en combinación con un sistema de administración adecuado.

- 20 Realización 3: La composición según la realización 2, en la que dicho sistema de administración adecuado comprende además factores de crecimiento y/o componentes prebióticos de bacterias del ácido láctico (LAB).

Realización 4: La composición según la realización 2 ó 3, en la que el sistema de administración adecuado está indicado para administración local, concretamente intrauretral, vaginal o anal.

- 25 Realización 5: La composición según la realización 2 ó 3, en la que el sistema de administración adecuado está indicado para administración oral.

- 30 Realización 6: La composición según la realización 5, en la que el sistema de administración adecuado es un producto alimenticio o una bebida, una composición alimenticia o de bebida, un complemento alimenticio o de bebida o adyuvante dedicado al consumo humano.

Realización 7: La composición según una cualquiera de las realizaciones 2-6, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones genitourinarias en mujeres y/o infecciones gastrointestinales en seres humanos.

- 35 Otras cepas se dan a conocer en la descripción pero no constituyen la invención.

### Descripción detallada

- 40 Las cepas de bacterias probióticas descritas en el presente documento 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 de hecho una característica de selección de requisito previo puesto que condiciona la capacidad de dichas cepas para colonizar tejidos epiteliales, por ejemplo los del tracto genitourinario, y luego para competir con, inhibir o no permitir la adhesión de patógenos de esa ubicación específica.

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

- 50 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. Patógenos Gram-negativos o Gram-positivos tales como los mencionados a continuación en el presente documento son representativos de los que se ven afectados significativamente por los probióticos de esta invención en cuanto a adhesión, crecimiento o 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 es naturalmente no exhaustiva.

- 60 Las cepas de bacterias probióticas también tienen la capacidad para inhibir la interiorización de patógenos, concretamente patógenos Gram-negativos o Gram-positivos genitourinarios o gastrointestinales dentro de células epiteliales. Las LAB más eficaces dentro de ese marco son las que expresan altas cantidades de tanto peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como ácido láctico *in situ* en las que ambos factores actúan sinérgicamente. De hecho, este último se ha demostrado que es altamente eficaz frente a patógenos genitourinarios anaerobios como por ejemplo especies de *Gardnerella* y *Prevotella*.

- 65 Finalmente, las cepas de bacterias probióticas anteriores presentan 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 LAB tienen por consiguiente la capacidad de inhibir el síndrome inflamatorio de células inmunocompetentes cuando se exponen a contaminación por patógenos.

Es bastante interesante que la característica específica realiza la modulación de la respuesta inmunitaria a la que se hizo referencia anteriormente en el presente documento usando dos vías distintas, es decir mediante la inducción de citocinas o bien pro o bien antiinflamatorias como IL 10, respectivamente, IL 12, TNF o IFN. Se ha observado además que algunas cepas de LAB de esta invención presentan un alto potencial de inducción de IFN[gamma], concretamente *L. acidophilus* KS 116.1 y *L. gasseri* KS 124.3, una característica que favorece el uso de las mismas como agentes antiinfecciosos.

Esta especificidad de cepa proporciona por consiguiente al experto en la técnica la posibilidad de seleccionar la cepa o combinación de cepas más apropiadas para realizar el tratamiento farmacológico que se prevé.

Entre las cepas de LAB que presentan estas propiedades, a continuación en el presente documento se enumeran especies preferidas según esta invención: *L. jensenii* KS 109, *L. gasseri* KS 114.1, *L. crispatus* KS 116.1, *L. jensenii* KS 119.1, *L. crispatus* KS 119.4, *L. gasseri* KS 120.1, *L. jensenii* KS 121.1, *L. jensenii* KS 122.1, *L. gasseri* KS 123.1, *L. gasseri* 124.3, *L. gasseri* KS 126.2, *L. crispatus* 127.1, *L. jensenii* KS 129.1, *L. jensenii* KS 130.1, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400. La mayor parte de estas cepas también son representativas de la microflora vaginal humana sana.

Como especies particularmente preferidas, pueden mencionarse además las siguientes cepas:

*L. gasseri* KS 114.1 (CNCM I-3482): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 10,5 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 mg/l

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

negativa para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, LAC5, MEL, INU, MLZ, RAF5, AMD, GLYG, XLT, TUR, LYX, TAG, DFUC5, LFUC5, DARL, LARL, GNT, 2KG y 5KG

*L. crispatus* KS 116.1 (CNCM I-3483): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa positiva - producción de ácido láctico de 9,6 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2 mg/l

prueba API 50 CHI: positiva para GAL, FRU, MNE, NAG, ESC, SAL, MAL y SAC

negativa 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-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 7,4 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 20 mg/l

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

negativa 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

*L. crispatus* KS 119.4 (CNCM I-3484): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa positiva - producción de ácido láctico de 10,3 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> negativa

prueba API 50 CHI: positiva para GAL, GLU, FRU, MNE, NAG, ESC, MAL, LAC, SAC y AMD negativa 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

*L. gasseri* KS 120.1 (CNCM I-3218): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 10,6 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 mg/l

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

negativa 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

5 *L. jensenii* KS 121.1 (CNCM I-3219): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 10,6 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 mg/l

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

negativa 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

15 *L. gasseri* KS 123.1 (CNCM I-3485): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 8,5 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 mg/l

prueba API 50 CHI: positiva para: GLU, MNE, NAG, ESC, MAL y SAC - variable para RJB y 5KG

20 negativa para: KON, GLY, ERY, DARA, LARA, DXYL, LXYL, ADO, MDX, GAL, FRU, SBE, RHA, DUL, INO, MAN, SOR, MDM, MDG, AMY, ARB, SAL5CEL, LAC, MEL, TRE, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, GNT y 2KG

25 *L. gasseri* KS 124.3, (CNCM I-3220): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa negativa - producción de ácido láctico de 17,0 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 20 mg/l

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

30 negativa 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

35 *L. crispatus* KS 127.1 (CNCM I-3486): Gram-positiva - catalasa negativa - oxidasa positiva - producción de ácido láctico de 16,7 g/l - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> negativa

prueba API 50 CHI: positiva 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

40 negativa 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

45 *L. helveticus* KS 300 (CNCM I-3360): Gram-positiva - producción de ácido láctico de 10,45 g/kg - producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 mg/l

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

50 negativa 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. La invención se limita a la cepa según la reivindicación 1.

55 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 tracto o entorno genitourinario de mujeres y en el tracto y entorno gastrointestinal de seres humanos también.

60 Además, dichas cepas de bacterias probióticas pueden usarse de una manera 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.

65 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 administración, soporte o portador adecuado, si es necesario de calidad alimenticia, que se ha diseñado para lo mismo. El término "tratamiento

5 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 en el que luego se produce la administración de probióticos convenientes una vez que se ha completado la erradicación del patógeno y se ha detenido la administración de antibióticos. El término "adecuado" pretende definir un sistema de administración que mantiene intactas todas las propiedades de las cepas de bacterias probióticas que se usan para realizar los tratamientos anteriores.

10 Composiciones probióticas según esta invención pueden comprender además factores de crecimiento o prebióticos de LAB habituales, por ejemplo factores de crecimiento naturales específicos 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 las designadas para nutrición clínica, un complemento alimenticio o de bebida o adyuvante designado para consumo o bien humano o bien animal.

15 Productos alimenticios o bebidas lácteos como leches fermentadas, quesos frescos o yogures o sus equivalentes secados o liofilizados representan sistemas de administración adecuados. Como por ejemplo leche en polvo de complemento alimenticio o adyuvante o matrices de derivados de leche cargados con los probióticos seleccionados demostraron ser bastante convenientes. Si es necesario, dichas matrices en polvo pueden envasarse adicionalmente como por ejemplo cápsulas de gelatina o celulosa, grageas o comprimidos.

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

25 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  $10^6$  ufc (unidades formadoras de colonias) y aproximadamente  $10^{11}$  ufc por g o dosis o unidad, preferiblemente en una forma que mantiene su viabilidad y su especificidad intactas, por ejemplo en una forma encapsulada o liofilizada. Los detalles finales de dichas composiciones así como su dosificación dependerán, finalmente, de la aplicación específica a la que están destinadas, la edad o el estado de salud de los pacientes o la persona que va a tratarse, la naturaleza de la contaminación por patógenos o el beneficio esperado de la administración preventiva de los probióticos. Se encuentra dentro de las habilidades y pericia actuales de la comunidad médica o nutricional ajustar todos los parámetros relevantes.

35 En comparación con cepas de referencia conocidas anteriormente (véanse los ejemplos a continuación) las cepas de bacterias probióticas seleccionadas han mostrado una actividad antipatógena o bien similar o bien incluso superior dependiendo del modelo experimental que se ha seleccionado para las mismas.

Los siguientes ejemplos ilustran sólo algunas de las realizaciones de esta divulgación.

40 **Ejemplos**

Material y métodos

Cepas sometidas a prueba	Código
jensenii 109	KS 109
crispatus 116.1	KS 116.1
jensenii 119.1	KS 119.1
gasseri 120.1	KS 120.1
jensenii 121.1	KS 121.1
jensenii 122.1	KS 122.1
gasseri 124.3	KS 124.3
gasseri 126.2	KS 126.2
jensenii 129.1	KS 129.1
L. jensenii 130.1	KS 130.1
helveticus 300	KS 300
acidophilus 400	KS 400

45 Las cepas de lactobacilos de adherencia control son la cepa de *L. casei rhamnosus* GG (n.º de registro de la ATCC 53103), la cepa de *L. rhamnosus* GR-I (n.º de registro de la ATCC 55826) y la cepa de *L. fermentum* RC-14 (n.º de registro de la ATCC 55845).

50 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.

Patógenos bacterianos. La cepa de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL 1344 fue un obsequio de B.A.D.

## ES 2 524 432 T3

- Stacker (Stanford, California). Se hicieron crecer las bacterias durante la noche durante 18 h a 37°C en caldo Luria (Difco Laboratories).
- 5 Las cepas de *Escherichia coli* de adherencia difusa uropatógenas IHI 1128 y 7372, y la cepa diarreogénica C 1845 fueron obsequios 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 IHI 1128 porta el operón Dr. La cepa C 1845 porta el operón *Daa*. Se mantuvieron todas las cepas bacterianas sobre placas de LB y antes de la infección se hicieron crecer las bacterias en caldo LB a 37°C durante 18 h.
- 10 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).
- 15 Las cepas de *Streptococcus agalactiae* DSM 2134, *Gardnerella vaginalis* DSM 4944, *Prevotella bivia* CI-I (DSM 20514) y *Candida albicans* DSM 1386 eran de Medinova Ltd. (Zúrich, Suiza). 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). Se hizo crecer una cepa de *Streptococcus agalactiae* durante la noche a 37°C en caldo BHI (Difco Laboratories).
- 20 Se hizo crecer una cepa de *Candida albicans* durante la noche a 37°C en caldo Sabouraud. Se hizo crecer *Gardnerella vaginalis* sobre placas de agar para *Gardnerella* adquiridas de BioMerieux Francia.
- 25 Se suspendieron las bacterias en disolución de cloruro de sodio-peptona tamponada de pH 7,0 hasta aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Se extendieron 500  $\mu$ l de las suspensiones preparadas sobre la placa de agar. Se secaron las placas inoculadas en condiciones de flujo de aire laminar estéril. Luego se incubaron las placas de agar en condiciones anaerobias usando un frasco 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 frasco anaerobio sellado a 37°C durante 36 h como máximo.
- 30 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.
- 35 Líneas y cultivos celulares. Se cultivaron células HeLa cervicales humanas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>-el 95% de aire en RPMI 1640 con L-glutamina (Life Technologies) complementado con suero de ternero fetal (SBF; Boehringer, Mannheim, Alemania) al 10% inactivado por calor (30 min, 56°C). Se usaron las células para ensayos de infección antes de la confluencia, es decir, tras 5 días en cultivo.
- 40 La línea celular intestinal humana usada era el clon TC7 (Caco-2/TC7), establecido a partir de la línea celular Caco-2 original. Se hicieron crecer rutinariamente células en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (glucosa 25 mM) (Invitrogen, Cergy, Francia), complementado con suero de ternero fetal (Invitrogene) al 15% inactivado por calor (30 min, 56°C) y aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogene) tal como se describió anteriormente. Para fines de mantenimiento, se realizaron pases de las células semanalmente usando tripsina al 0,02% en EDTA 3 mM que contenía PBS libre de Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>. Se llevaron a cabo los experimentos y el mantenimiento de las células a 37°C en una atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub>/el 90% de aire. Se cambió el medio de cultivo diariamente. Se usaron células en posconfluencia tras 15 días de cultivo (células completamente diferenciadas) para el ensayo de infección de *S. enterica* serovar Typhimurium.
- 45
- 50 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 de células 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 gastado) 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 CO<sub>2</sub>/el 90% de aire. Las concentraciones finales de bacterias examinadas fueron  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^9$  y  $2 \times 10^9$  bacterias por ml.
- 55 Tras 1 h de incubación, se lavaron las monocapas cinco veces con PBS estéril, se fijaron con metanol, se sometieron a tinción con tinción de Gram y luego se examinaron microscópicamente con inmersión en aceite. Se realizó cada ensayo de adhesión por duplicado con células de tres pases sucesivos. Para cada ensayo, se determinó el número de bacterias adherentes en 20 áreas microscópicas al azar (puntuación de adhesión: de 0 a 5). Además, se determinó el nivel de lactobacilos de adherencia viables mediante determinación cuantitativa de bacterias asociadas con las monocapas de células infectadas. Tras infectarse, se lavaron las células dos veces con PBS estéril y se lisaron con H<sub>2</sub>O esterilizada. Se sembraron en placa diluciones apropiadas sobre agar de soja triptica (TSA) para determinar el número de bacterias asociadas a células viables mediante recuentos de colonias bacterianas.
- 60
- 65 Se realizó cada ensayo de asociación celular al menos por triplicado, con tres pases de células sucesivos. Se expresaron los resultados como UFC/ml de bacterias asociadas a células.

5 Actividad frente al crecimiento de patógenos. Se inoculó un medio de cultivo que contenía MRS (5 ml) y medio de cultivo del 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 los puntos de tiempo indicados, se retiraron alícuotas, se diluyeron en serie y se sembraron en placa sobre agar de soja tríptica para determinar los recuentos de colonias bacterianas del patógeno. Se realizó cada ensayo al menos por triplicado. Se expresaron los resultados como UFC/ml.

10 Actividad frente a la viabilidad de patógenos. Se realizaron ensayos de recuentos de colonias incubando el patógeno  $10^8$  UFC/ml (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 a intervalos predeterminados, se retiraron alícuotas, se diluyeron en serie y se sembraron en placa sobre agar de soja tríptica para determinar los recuentos de colonias bacterianas del patógeno. Se realizó cada ensayo al menos por triplicado. Se expresaron los resultados como UFC/ml.

15 Inhibición de la adhesión de *E. coli* uropatógena sobre células HeLa epiteliales. Para la infección de una monocapa de células, 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 las monocapas de células, preparadas en placas de cultivo tisular TPP de veinticuatro pocillos (ATGC, París, Francia), dos veces con PBS. Se suspendieron las bacterias infectantes en el medio de cultivo y se añadió un total de 0,5 ml de DMEM + 0,25 ml de patógeno de cultivo ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) +  
20 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 CO<sub>2</sub>/el 90% de aire durante un tiempo diferente de infección tal como se indicó y luego se lavaron tres veces con PBS estéril y se lisaron con H<sub>2</sub>O esterilizada. Se sembraron en placa diluciones apropiadas sobre agar de soja tríptica para determinar el número de bacterias asociadas a células viables mediante recuentos de colonias bacterianas. Se realizó cada ensayo por triplicado con tres pases sucesivos de células HeLa.

25 Análisis. Se expresan los resultados como medias + error estándar de la media. Para comparaciones estadísticas, se realizó una prueba de la t de Student.

## 30 Resultados

### Ejemplo 1

35 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.

Se determinó el nivel de adhesión de las cepas anteriores una vez que se inocularon las células con cuatro concentraciones de lactobacilos ( $5 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$ ;  $5 \times 10^8$ ;  $1 \times 10^9$  UFC/pocillo). En general, se observó una adhesión dependiente de la concentración.

40 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 aparecieron como las mejores cepas adherentes ( $7,5 \log$  UFC/ml a  $5 \times 10^8$  UFC/pocillo) en comparación con las cepas adherentes control, cepas de *L. casei rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* GR-I.

45 En células Caco-2/TC7 intestinales, los niveles de adhesión observados muestran que todas las cepas de Medinova son adherentes. Las cepas de *L. crispatus* KS 116.1, *L. jensenii* 119.1, 129.1 y KS 130.1, *L. gasseri* 124.3 aparecieron como las mejores cepas adherentes ( $7,5-8 \log$  UFC/ml a  $5 \times 10^8$  UFC/pocillo) en comparación con las cepas adherentes control, cepas de *L. casei rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* GR-I.

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

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

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

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

60 Para *Staphylococcus aureus*, la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control inhibieron el crecimiento de bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y mostraron una disminución en el número de bacterias viables. Cuando se compararon las actividades de las cepas de lactobacilos, la *L. jensenii* 119.1 apareció como la cepa más activa.

65



Para las cepas de *E. coli* uropatógenas IH11128 y 7372, la cepa de *L. rhamnosus* GR-1 y la cepa de *L. fermentum* RC14 control inhibieron el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1 inhibieron el crecimiento de *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de las cepas de lactobacilos, la *L. jensenii* 119.1 apareció como la cepa más activa.

Para la cepa de *E. coli* diarreogénica C1845, la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC14 control inhibieron el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* KS 119.1 inhibieron el crecimiento de *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de las cepas de lactobacilos, se encontró la misma actividad para todas las cepas de lactobacilos examinadas.

Para la cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium diarreogénica SLI 344, la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control inhibieron el crecimiento de las bacterias. De manera similar, *L. jensenii* 119.1 inhibió el crecimiento de *S. enterica* serovar Typhimurium. Cuando se compararon las actividades de las cepas de lactobacilos, se encontró la misma actividad para la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control y *L. jensenii* KS 119.1. En contraposición, la *L. crispatus* KS 116.1 mostró una actividad inferior.

Para *Candida albicans* no se encontró actividad para la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y *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.

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

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

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

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

Para la cepa de *E. coli* diarreogénica C1845, tanto la cepa de *L. rhamnosus* GR-I como la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y *L. crispatus* KS 116.1 y *L. jensenii* 119.1 mostraron una baja actividad sobre la viabilidad de las bacterias C 1845 (2 log de disminución).

Para la cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium diarreogénica SL1344, tanto la cepa de *L. rhamnosus* GR-I como la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y *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).

Para *Gardnerella vaginalis*, la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y la cepa de *L. fermentum* RC-14 y *L. jensenii* 119.1 disminuyeron en 2 log la viabilidad de *Gardnerella*. En contraposición, la *L. crispatus* KS 116.1 no mostró actividad.

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

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

Se ha examinado si dichos lactobacilos pueden inhibir la adhesión de la cepa de *E. coli* uropatógena IH 1128 sobre células HeLa. Se midió el efecto de la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y *L. jensenii* 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 a tres concentraciones:  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  bacterias por pocillo.

Se encontró de un 30 a un 40% de inhibición de la adhesión de IH11128 a una concentración de  $1 \times 10^8$  bacterias por pocillo para la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control. A esta concentración, la *L. jensenii* KS 119.1 y la *L. crispatus* KS 116.1 eran inactivas. La inhibición de la adhesión de IH11128 era eficaz a una concentración de  $5 \times 10^8$  bacterias por pocillo para *L. jensenii* 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 y se observó una inhibición similar a las obtenidas con la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control. Se observó un alto nivel de inhibición similar de la adhesión de IH11128 con la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 control, y *L. jensenii* KS 119.1 y *L. crispatus* KS 116.1 a la concentración de  $1 \times 10^9$  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 las cepas de *E. coli* uropatógenas y diarreogénicas IH11128 y 7372. Se midió el crecimiento de patógenos a las 5, 8, 18 y 24 h.

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

15 Con respecto a *Staphylococcus aureus*, la cepa de *L. rhamnosus* GR-I y la cepa de *L. fermentum* RC-14 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 las cepas de lactobacilos, la *L. helveticus* KS 300 apareció como la cepa más activa.

20 Para cepas de *E. coli* uropatógenas IH11128, las cepas control *L. rhamnosus* GR-I 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 las cepas de lactobacilos, apareció una actividad inferior para *L. gasseri* KS 124.3 y *L. acidophilus* KS 400.

25 Para la cepa de *E. coli* uropatógena 7372, ambas cepas control *L. rhamnosus* GR-I y *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, era activa sólo a las 25 horas.

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

30 Se ha examinado si dichos lactobacilos son activos sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *E. coli* uropatógena IH11128 y 7372, *E. coli* diarreogénica C 1845 y *Gardnerella vaginalis*. Se midió el efecto sobre la viabilidad de los patógenos a las 2, 3 y 4 h.

35 Para *Staphylococcus aureus*, las cepas control *L. rhamnosus* GR-I 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 control y *L. gasseri* KS 124.3, *L. helveticus* KS 300 y *L. acidophilus* KS 400 no mostraron actividad.

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

45 Con respecto a cepas de *E. coli* uropatógenas 7372, las cepas 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 eran activas dentro de las mismas condiciones.

50 Para *Gardnerella vaginalis*, ambas cepas 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 control anteriores.

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

## Ejemplo 3

60 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.

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

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

5 Para cepas de *E. coli* uropatógenas IH11128, *L. jensenii* KS 121.1 y KS 122.1 no mostraron actividad mientras que, en contraposición, *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 control de *L. fermentum* RC-I disminuyeron en 2 log la viabilidad de *E. coli* sólo en condiciones sin agitación.

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

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

20 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 control *L. fermentum* RC-14 eran bastante activas (6 log de disminución) en condiciones sin agitación. *L. gasseri* KS 120.1 siguió siendo activa incluso en condiciones con agitación.

25 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.

30 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 control *L. fermentum* RC-14 inhibieron dicha actividad a un nivel todavía superior.

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

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

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

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

45 La cepa de *L. fermentum* RC-14 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.

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

4. Inhibición de la adhesión e internalización de la cepa de *E. coli* uropatógena IHI 1128 sobre células HeLa por KS 120.1, KS 121.1 y KS 300.

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

60 Se examinó el efecto de *L. gasseri* KS 120.1, *L. helveticus* KS 300 y de las cepas control RC-14 y la cepa GG con respecto a la *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 de las cepas control han mostrado unos 4 log de disminución de la *E. coli* internalizada.

Ejemplo 4

65 Determinación de la resistencia a la pepsina (% de supervivencia en T0+X min).

4.1 Se han hecho crecer las cepas de LAB seleccionadas para ese 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. Luego se lavó el sedimento así obtenido 3 veces en un tampón PBS (pH 7) y se suspendió posteriormente en 1 ml de dicho tampón PBS.

4.2 Se añadieron 200 µl 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 µl de NaCl acuoso. Inmediatamente tras la inoculación (T0) se preparó una serie de dilución de 10 veces de 100 µl de suspensión celular del tubo n.º 1 usando una disolución de Ringer y posteriormente se sembró 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 los recuentos de bacterias (UFC) correspondientes en la tabla I a continuación en el presente documento:

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

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

#### Ejemplo 5

Determinación de la resistencia a la pancreatina (% de supervivencia en T0+X min)

5.1 Se han hecho crecer las cepas de LAB seleccionadas para ese 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. Luego se lavó el sedimento así obtenido 3 veces en un tampón PBS (pH 7) y se suspendió posteriormente en 1 ml de dicho tampón PBS.

5.2 Se añadieron 200 µl 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 µl de NaCl acuoso. Inmediatamente tras la inoculación (T0) se preparó una serie de dilución de 10 veces de 100 µl de suspensión celular del tubo n.º 1 usando una disolución de Ringer y se sembró en placa posteriormente 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 los recuentos de bacterias (UFC) correspondientes en la tabla II a continuación en el presente documento:

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

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

#### Ejemplo 6

Modulación de la respuesta inmunitaria (prueba *in vivo* usando CMSP humanas)

Se han sometido a prueba las siguientes cepas dentro de las condiciones fijadas más adelante 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*

5 119.1, *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 (CMSP) aisladas. Entre las citocinas inducidas durante estas pruebas, se encuentran las interleucinas 10 y 12 (IL 10 e IL 12), interferón gamma ( $\gamma$ -IFN) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

Procedimientos experimentales

10 Preparación de CMSP: Se diluyó sangre humana reciente obtenida de sujetos sanos (cuatro donantes) a una razón 1:2 con PBS-Ca (GIBCO) y se purificó en un gradiente de Ficoll (GIBCO). Tras la centrifugación a 400 x g durante 30 min a 20°C las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) formaron una capa anular de interfase en el suero. Se aspiraron las CMSP 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.

15 Se resuspendieron posteriormente las CMSP usando medio RPMI (GIBCO) completo, complementado con L-glutamina al 10% p/v (GIBCO) y gentamicina (150 [mu] g/ml) (GIBCO). Se contaron las CMSP bajo el microscopio y se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y se distribuyeron (en alícuotas de 1 ml) en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Corning, Inc.).

20 Preparación de bacterias: Se lavaron cultivos de LAB durante la noche dos veces con tampón PBS, pH 7,2 antes de resuspenderse en PBS a una concentración de  $2 \times 10^9$  ufc/ml.

25 Incubación de CMSP: A partir de estas suspensiones se transfirieron 10  $\mu$ l al interior de los pocillos de las placas de CMSP que se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>/el 95% de aire. Tras 24 horas de incubación se aspiró el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante y se almacenó a -20°C. El control consistió en tampón libre de bacterias.

30 Cuantificación de citocinas: Se han determinado los niveles de la expresión de citocinas mediante pruebas de ELISA (“ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas”). Se recubren placas de ELISA con anticuerpo anti-citocina (procedimiento durante la noche) y se bloquea el anticuerpo con PBS/BSA al 1%. Se preparó un patrón apropiado con concentraciones conocidas de citocinas, que cubrían el intervalo de detección de 15,62 a 2000 pg/ml (incubado durante la noche).

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

Tabla III

40

	IL10	IL12	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL10/IL12
<b>Control</b>	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

Observaciones

- 45 - un alto nivel de inducción de TNF[alfa] para todas las cepas de LAB sometidas a prueba
- un nivel relativamente bajo de INF[gamma] con respecto a *L. jensenii* KS 121.1
- el potencial de inducción de IL 10 más alto con respecto a *L. crispatus* KS 116.1 y KS 400
- 50 - en contraposición a las dos cepas de *L. jensenii*, las dos cepas de *L. gasseri* han mostrado un perfil similar, especialmente cuando se consideran las razones en IL10/IL12 y en TNF-alfa/INF-gamma.

Dentro del marco de pruebas anteriores, queda claro que el perfil de inducción de citocinas es específico de la cepa.

55 Ejemplo 7

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

5 Se ha adaptado un modelo agudo de ratones 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. Luego 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 han sacrificado los animales en el día +2 y se han sometido finalmente a puntuación tanto macroscópica (puntuación de Wallace - tabla IV) como histológica (puntuación de Ameho - tabla V).

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

Ejemplo 8: Composición probiótica para administración local

15 8.1 Cápsulas vaginales

Se han cultivado muestras de las cepas de LAB de esta invención (véase anteriormente) durante 24 horas como mínimo en condiciones similares a las mencionadas anteriormente en el presente documento. Se han aislado, lavado y liofilizado individualmente las cepas cultivadas, se han suspendido individualmente en una mezcla de polvo de lactosa/MSK y finalmente se han dividido en dosis unitarias conteniendo cada una de ellas aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  ufc (unidades formadoras de colonias). Luego se han vertido dichas dosis unitarias en el interior de cápsulas vaginales de gelatina comprendiendo cada una de ellas aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  ufc de cepas de LAB seleccionadas de esta invención.

25 8.2 Supositorios vaginales

Se han preparado supositorios vaginales blandos usando los siguientes componentes:

- disolución de ácido láctico tamponada

30 - lactosa

- PEG 4000

35 - PEG 600

Luego se ha añadido la cantidad adecuada de cepas de LAB liofilizadas seleccionadas de esta invención a dosis unitarias para proporcionar supositorios vaginales comprendiendo cada uno aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  ufc.

40 Ejemplo 9: Composición para administración oral

9.1 Complemento alimenticio

45 Se han fabricado cápsulas de celulosa comestibles (hidroxipropilmetilcelulosa) comprendiendo cada una aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  ufc de cepas de LAB seleccionadas de esta invención, usando una carga que comprende los siguientes componentes:

- polvo de yogur deshidratado

50 - dextrosa anhidra

- almidón de patata

- celulosa microcristalina

55 - cepa de LAB liofilizada seleccionada.

9.2 Producto lácteo fermentado (yogur)

60 Se han preparado porciones de un denominado "yogur natural light" usando el siguiente procedimiento: a un lote de leche con un contenido en grasa del 1,5% normalizado se le añadió el 3% de leche desnatada en polvo (MSK) y luego se pasteurizó la totalidad a 90°C durante 30 minutos. Se ha añadido el 1% en volumen de cultivos iniciadores comerciales de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a la leche pasteurizada; luego se agitó suavemente la totalidad a temperatura ambiente, se dispuso en envases de 100 ml que se incubaron finalmente todos a 40°C durante aproximadamente 4 horas para proporcionar el pH deseado.

65 Luego se añadieron porciones de cepas de LAB liofilizadas seleccionadas de esta invención a los tarros de yogur en

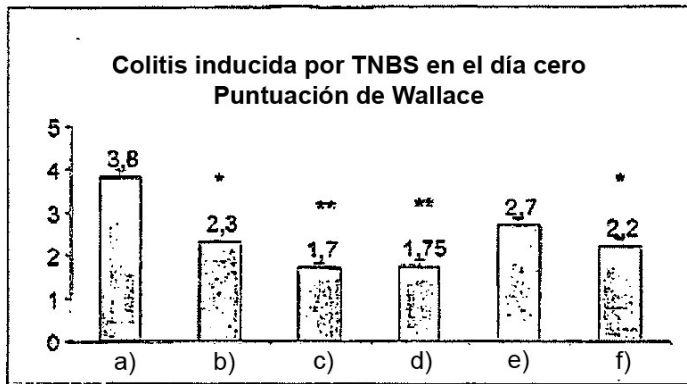
## ES 2 524 432 T3

una cantidad tal que tenían aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  ufc por ml de tarro de yogur y se llevó a cabo una incubación adicional durante aproximadamente 30 min hasta que se proporcionó un pH de aproximadamente 4,5 a 4,7. Pueden almacenarse estas porciones de yogur a 4°C antes de su consumo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de bacterias del ácido láctico que pertenece a la especie *Lactobacillus jensenii* identificada como *L. jensenii* KS 119.1, depositada el 4 de junio de 2004 en el CNCM del Instituto Pasteur con el número de registro CNCM I-3217.
2. Composición probiótica que comprende una cantidad eficaz de la cepa de bacterias del ácido láctico según la reivindicación 1 en combinación con un sistema de administración adecuado.
- 10 3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho sistema de administración adecuado comprende además factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico (LAB) y/o componentes prebióticos.
- 15 4. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que el sistema de administración adecuado está indicado para administración local, concretamente intrauretral, vaginal o anal.
5. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que el sistema de administración adecuado está indicado para administración oral.
- 20 6. Composición según la reivindicación 5, en la que el sistema de administración adecuado es un producto alimenticio o una bebida, una composición alimenticia o de bebida, un complemento alimenticio o de bebida o adyuvante dedicado al consumo humano.
- 25 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.

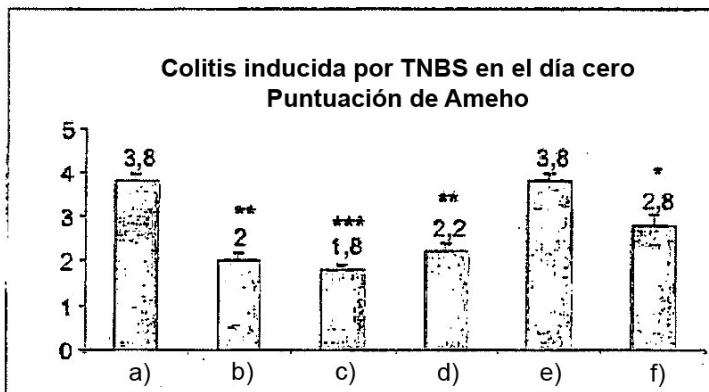




- a) control
- b) KS 121.1
- c) KS 116.1
- d) KS 124.3
- e) KS 300
- f) KS 400

Tabla IV

Fig. 1



- a) control
- b) KS 121.1
- c) KS 116.1
- d) KS 124.3
- e) KS 300
- f) KS 400

Tabla V

Fig. 2