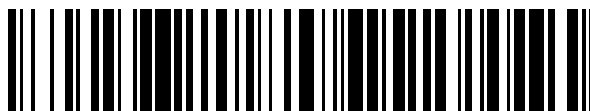


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 880**

51 Int. Cl.:

A61K 33/04	(2006.01) A61K 9/14	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01) A61K 9/19	(2006.01)
A61P 15/02	(2006.01)	
A61P 31/10	(2006.01)	
A61P 13/00	(2006.01)	
A61K 35/74	(2015.01)	
C12N 1/20	(2006.01)	
A61K 35/747	(2015.01)	
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 47/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/EP2013/064451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13734782 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2869825**

54 Título: **Utilización de tiosulfato para potenciar el efecto antipatógeno de los lactobacilos**

30 Prioridad:

09.07.2012 FR 1256570

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

09.03.2017

73 Titular/es:

**BIOSE (100.0%)
Rue des Frères Lumière
15130 Arpajon-sur-Cère, FR**

72 Inventor/es:

NIVOLIEZ, ADRIEN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 604 880 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

Utilización de tiosulfato para potenciar el efecto antipatógeno de los lactobacilos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden unos lactobacilos en asociación con tiosulfato, potenciando el tiosulfato el efecto antipatógeno de dichos lactobacilos.

10 En una mujer sana, la flora genitourinaria comprende casi 50 especies diferentes de microorganismos. Entre estos microorganismos, el 95% de la población está constituido por varias cepas de lactobacilos, denominados también "bacilos de Döderlein". Estos lactobacilos tienen un papel de protección contra los patógenos mediante varios mecanismos: producción de peróxido de hidrógeno, producción de ácido láctico, producción de bacteriocinas, inhibición de la adhesión y desarrollo de patógenos. En particular, estos lactobacilos mantienen un pH ácido
15 mediante la producción de ácido láctico a partir del glucógeno presente en el moco vaginal. Así, se inhibe el crecimiento de numerosos patógenos de la flora vaginal tales como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma*, *Mobiluncus* y, sobretodo *Candida albicans*.

20 Así, la flora vaginal normal está constituida principalmente por lactobacilos que forman una biopelícula protectora sobre la superficie de la mucosa. Los lactobacilos más frecuentemente identificados en la vagina son, en particular, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus inners* y *Lactobacillus gasseri*.

25 La candidiasis vulvo-vaginal afecta al 70-75% de las mujeres en periodo de actividad genital al menos una vez en su vida; aproximadamente el 40-50% de ellas presentarán un segundo episodio. Se ha estimado en un 5-8% la incidencia de candidiasis vulvo-vaginal recurrente (definida por la aparición de al menos 4 episodios por año, entre ellos dos confirmados mediante examen micológico). Esta afección benigna tiene un impacto muy negativo sobre la calidad de vida de las pacientes y genera importantes deterioros de la salud. Tratar tal patología es difícil debido a la patogénesis multifactorial de esta afección.

30 El tratamiento tradicional de mantenimiento utilizando un antifúngico oral o vaginal debe ser de al menos 6 meses, pero el índice de recaída sigue siendo alto con un 60-70% de mujeres que presentan una recurrencia en los dos meses siguientes a la interrupción del tratamiento. Además, los efectos secundarios de los antifúngicos son frecuentes y su uso a largo plazo puede favorecer la aparición de vaginosis bacteriana.

35 La vaginosis bacteriana se debe a un desequilibrio cualitativo y cuantitativo de la flora vaginal normal que puede desembocar en una desaparición casi completa de los lactobacilos en beneficio de la flora anaerobia, y también de la aparición de gérmenes tales como *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*. La vaginosis bacteriana es una de las infecciones vaginales más frecuentes, con un índice de frecuencia de 10 a 15. Esta patología benigna en mujeres puede ser grave durante el embarazo ya que puede causar partos prematuros, bajo peso en los recién
40 nacidos, así como abortos espontáneos.

La vaginosis bacteriana, así como otros desequilibrios de la microflora vaginal se tratan comúnmente mediante terapia con antibióticos. Este tratamiento tiene los inconvenientes habituales de los tratamientos antibióticos y resultan cada vez menos eficaces. Además, pretende eliminar la flora patógena pero destruye también la flora
45 beneficiosa normal.

Estado de la técnica

50 Se ha descrito la administración de lactobacilos "beneficiosos" por vía oral o vaginal para promover la salud vaginal. En particular, las solicitudes de patente WO 84/04675, WO 2000/035465, US 2002/0044926 y WO 2006/04575 describen la administración por vía oral o vaginal de bacterias lácticas para promover la salud vaginal y para prevenir las recaídas de candidiasis vulvo-vaginal.

55 La solicitud de patente WO 2010/004005 se refiere a la administración de prebióticos asociados a un extracto vegetal que contiene isoflavonas, para promover el desarrollo de la flora vaginal normal.

Los lactobacilos preferidos son *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus vaginalis*. Las patentes US nº 6.093.394, US nº 6.468.526 y US nº 7.807.440, así como la solicitud de patente US 2010/0151026, describen la administración de cepas específicas de *Lactobacillus crispatus*.
60

Estos lactobacilos pueden ser administrados en forma liofilizada o en solución y eventualmente en combinación con otros agentes activos. En efecto, aunque los lactobacilos tienen un efecto antipatógeno real y reconocido, éste es frecuentemente insuficiente para combatir una infección. Agentes activos suplementarios, o agentes que potencien el efecto antipatógeno de los lactobacilos son activamente buscados por la comunidad científica.
65

Se ha propuesto administrar lactobacilos en combinación con un agente antimicrobiano, estando la bacteria

microencapsulada (EP 0 732 916 B1); en presencia de ácido láctico y un extracto de ajo (EP 1 911 455 A1); en presencia de goma arábiga (EP 2 211 640 A1); en presencia de estrógenos y/o gestágenos (WO 2010/133314) o también en presencia de un antibiótico y de un ácido graso esterificado insaturado (WO 2011/066949).

5 Los resultados presentados en el artículo (Nivoliez *et al.*, 2012) indican que el procedimiento de fabricación de las bacterias probióticas podría desempeñar un papel importante en las características de los lactobacilos preparados de manera industrial.

10 Se utiliza el tiosulfato de sodio como un excipiente en numerosas composiciones farmacéuticas o veterinarias que contienen lactobacilos, tales como las composiciones TROPHIGIL, PROBIOS® y ALLBIO®. Por otro lado, la solicitud de patente CN 20091145852 describe un medicamento compuesto de extractos de plantas chinas y de tiosulfato de sodio. Se propone este medicamento en particular para el tratamiento de la gonorrea.

15 En estas composiciones, se utiliza el tiosulfato de sodio como un excipiente y no tanto como un agente activo.

La solicitud de patente de americana US 2011/0008467 describe unas composiciones farmacéuticas que comprenden solamente tiosulfato de sodio con grado farmacéutico. Las aplicaciones terapéuticas propuestas son las siguientes: tratamiento de pacientes que han sufrido un envenenamiento con cianuro, platino, tratamiento de la calcificación vascular y de las enfermedades dermatológicas.

20 Descripción de la invención

El efecto antipatógeno de los lactobacilos existe realmente, pero no es suficientemente fuerte, en la mayoría de los casos, para combatir la infección (véase la figura 2A) y por lo tanto, es necesario, frecuentemente, utilizar otros principios activos tales como antibióticos o antifúngicos en complemento.

La presente invención propone un medio para potenciar el efecto antipatógeno de los lactobacilos. Los inventores han descubierto en efecto que la asociación de tiosulfato, en particular tiosulfato de sodio, con lactobacilos permite potenciar el efecto antipatógeno de estos lactobacilos, cuando el tiosulfato está presente a una concentración de al menos 100 mg/gramo de polvo, para un polvo que comprende de 10^7 a 10^{10} UFC/g de lactobacilos.

Este efecto “antipatógeno” se caracteriza en particular por una inhibición del crecimiento de patógenos vaginales tales como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* y especialmente *Candida Albicans*.

35 La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende al menos 100 mg/g de tiosulfato de sodio en combinación con *Lactobacillus crispatus*.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a la utilización de tiosulfato para potenciar el efecto antipatógeno de bacterias *Lactobacillus*, estando el tiosulfato en una cantidad de al menos 100 mg/gramo de polvo, para un polvo que comprende de 10^7 a 10^{10} UDC/g de lactobacilos.

Definiciones

45 El término “potenciar” significa proporcionar una mayor eficacia, aumentar los efectos beneficiosos de un principio activo. En particular, el agente potenciador (aquí el tiosulfato) no tiene acción propia contra los patógenos, sino que actúa a través de lactobacilos, de los cuales potencia el efecto antipatógeno.

50 El término “efecto antipatógeno” designa la acción preventiva y curativa de lactobacilos con respecto a diferentes patógenos cuyo crecimiento puede ser inhibido por la presencia de lactobacilos. Se expresa este efecto mediante varios mecanismos: disminución del pH, producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producción de ácido láctico y/o ácido acético, producción y secreción de bacteriocinas, péptidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta, inhibición de la adhesión y desarrollo de patógenos. En particular, se mide este efecto antipatógeno en porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos, así como en porcentaje de producción de bacteriocinas, compuestos péptido que tienen propiedades antimicrobianas.

El término “patógenos” se refiere a todos los patógenos susceptibles de instalarse en el tracto urogenital y en particular *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma*, *Mobiluncus*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*, así como los patógenos susceptibles de provocar unas infecciones intestinales, tales como, por ejemplo las enterobacterias (de las cuales *Escherichia coli*), las salmonelas, los estafilococos, *Clorstridium difficile* y las *Shigellas*.

60 El término “lactobacilos” se refiere al conjunto de las bacterias del género *Lactobacillus*, bacterias Gram positiva, inmóviles, de formas y tamaños variables, y anaeróbicos facultativos. La mayoría de los lactobacilos convierten la lactosa y otros azúcares simples en ácido láctico. Los lactobacilos colonizan la vagina y el tracto gastrointestinal y

constituyen un elemento importante de la flora endógeno intestinal y vaginal.

La presente invención se refiere principalmente a lactobacilos que constituyen la flora vaginal; sin embargo, se debe comprender que la invención puede ser realizada con otros tipos de lactobacilos tales como aquellos presentes en el tracto gastrointestinal (en particular *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*).

El término "UFC" se refiere a la unidad de medición reconocida generalmente por los expertos en la materia para cuantificar a las bacterias capaces de fundar una colonia y significa precisamente "Unidad que forma una colonia".

El término "tiosulfato" se refiere a iones tiosulfato $S_2O_3^{2-}$. Es la forma básica del ácido tiosulfúrico ($H_2S_2O_3$), inestable en un medio acuoso.

Según un aspecto preferido de la invención, los patógenos cuyo crecimiento es inhibido por la asociación de tiosulfato y lactobacilos pertenecen a la familia de *Candida Albicans*, *Prevotella bivia*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* o *Mobiluncus*.

Candida albicans es la especie de levadura más importante y mejor conocida del género *Candida*. Provoca infecciones fúngicas (candidiasis o candida) esencialmente a nivel de las mucosas del tracto digestivo y ginecológicas.

Prevotella bivia es una bacteria anaeróbica que provoca esencialmente vaginosis e infecciones en el tracto urinario.

Garnerella vaginalis es una bacteria que se presenta en forma de bastoncillo pleomórfico o cocobacilus. Es una bacteria que se encuentra frecuentemente en casos de vaginosis (vaginitis no específica), ya sea como único germen patógeno o en asociación con otras bacterias. Produce una toxina perforante que afecta sólo a las células humanas. Se puede encontrar también en la sangre, la orina y la faringe.

El término micoplasmas (*Mycoplasma*) designa una familia de más de 100 especies de bacterias que son insensibles a las familias de antibióticos tales como penicilina y beta-lactama. En particular, *Mycoplasma genitalium* es responsable de infecciones genitales (uretritis, cervicitis, vaginitis, salpingitis) y problemas de esterilidad.

Mobiluncus es una bacteria anaeróbica Gram positiva que se encuentra frecuentemente asociada con *Gardnerella vaginalis* en vaginosis bacterianas.

El término "vaginosis" se refiere a un desequilibrio de la flora microbiana de la vagina. Se caracteriza por la desaparición de lactobacilos y la multiplicación de gérmenes anaeróbicos tales como *Gardnerella vaginalis*.

El término "candidiasis" se refiere a una infección fúngica causada por levaduras del género *Candida*. *Candida albicans*, la especie más frecuente, es parte de la flora común de la orofaringe y del tubo digestivo, y puede estar presente también en una pequeña cantidad en la flora vaginal normal. La candidiasis vulvo-vaginal es bastante común y puede estar sujeta a varias recidivas.

El término "infección urinaria" se refiere a la colonización de la orina por bacterias, lo que se traduce generalmente por unos síntomas de infección urinaria. Los gérmenes más frecuentemente implicados son *Escherichia coli* (un 75% de los casos), *Proteus mirabilis* y *Klebsiella* o cualquiera de las tres enterobacterias (bacilos Gram negativos).

Según la invención, ni la vaginosis ni la candidiasis ni las infecciones urinarias pueden ser consideradas como infecciones sexualmente transmisibles, tales como la gonorrea.

Según un aspecto de la invención, el tiosulfato se selecciona entre el tiosulfato de sodio o tiosulfato de potasio. Se utiliza preferentemente el tiosulfato de sodio. El tiosulfato de sodio está constituido de iones de sodio e de iones de tiosulfato. Preferentemente, la cantidad utilizada es de al menos 100 mg/g de polvo, preferiblemente al menos de 150 mg y más preferiblemente al menos de 200 mg de tiosulfato por gramo de polvo, comprendiendo este polvo entre 10^7 y 10^{10} bacterias lactobacilos (UFC). Preferentemente, la cantidad de tiosulfato de sodio en el producto final será de aproximadamente 230 mg/gramo de polvo, que comprende 10^7 a 10^{10} UFC de lactobacilos.

Según un aspecto preferido de la invención, se utiliza al tiosulfato en una cantidad de más o menos 230 mg/gramo de polvo, para un polvo que incluye entre 10^8 y 10^{10} UFC de lactobacilos por gramo y más preferiblemente entre 10^9 y 10^{10} UFC/gramo. El experto en la materia, especialista en liofilización, sabrá adaptar la cantidad de tiosulfato añadida antes de la liofilización para obtener la cantidad deseada en el polvo obtenido después de la liofilización. En particular, esta cantidad final de tiosulfato de sodio se obtiene mediante la adición de 113 g/litro de tiosulfato de sodio al medio de cultivo bacteriano antes de la liofilización. Sin embargo, los ejemplos demuestran que una simple adición de 1 g/litro de tiosulfato en el medio de cultivo bacteriano permite potenciar los efectos de los lactobacilos en el cultivo.

Según un aspecto preferido de la invención, los lactobacilos son unos *Lactobacills rhamnosus* y/o *Lactobacillus crispatus*. Las cepas preferidas son en particular la cepa Lcr35® y la cepa BLL2005.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos 100 mg de tiosulfato, preferiblemente al menos 150 mg y con más preferiblemente al menos 200 mg de tiosulfato por gramo de polvo, en combinación con una cepa *Lactobacillus crispatus*. Según una forma de realización preferida, la cantidad de lactobacilos por gramo de composición estará entre 10^7 y 10^{10} UFC, más preferiblemente entre 10^8 y 10^9 UFC/g.

Preferentemente, la cepa de *Lactobacillus crispatus* está en forma liofilizada. La cepa puede ser el único elemento liofilizado de la composición, pero preferentemente la cepa está liofilizada en un medio que comprende unos constituyentes adicionales, que serán agregados antes o después de la etapa de liofilización. En particular, se puede añadir el tiosulfato de sodio antes de la liofilización, en particular en una cantidad de 113 g/litro del medio bacteriano. Se puede agregar el tiosulfato de sodio en una cantidad de 1 g/litro, 5 g/litro, 10 g/litro, 20 g/litro, 30 g/litro, 50 g/litro o 100 g/litro del medio bacteriano.

Según otro aspecto particular de la invención, la composición farmacéutica comprende además una matriz de conservación y/o unos excipientes bien conocidos por el experto en la materia, y opcionalmente otros principios activos que tienen una acción complementaria.

En particular, esta composición puede comprender los siguientes principios activos: hormonas (estriol, progesterona, etc.), agentes antiinflamatorios y/o agentes bactericidas y/o agentes antifúngicos. El experto en la materia sabrá determinar cuáles son los principios activos que pueden ser combinados ventajosamente con una cepa de *Lactobacillus crispatus*. Esta composición comprende también, según un aspecto específico de la invención, varias cepas de lactobacilos.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el sobrenadante de cultivo de una cepa de *Lactobacillus*, preferiblemente de *Lactobacillus crispatus*, cultivada en presencia de tiosulfato, en particular tiosulfato de sodio, particularmente de al menos 100 g/litro de tiosulfato de sodio en el medio de cultivo. Este sobrenadante de cultivo contiene tiosulfato pero no contiene lactobacilos. Presenta una fuerte actividad antipatógena.

Tal como se demuestra en los ejemplos, la presencia de tiosulfato potencia la secreción de bacteriocinas, compuestos péptidos que tienen propiedades antimicrobianas. Por lo tanto, es probable que el "sobrenadante de cultivo" que ya no contiene lactobacilos, contenga grandes cantidades de bacteriocinas, secretadas previamente por los lactobacilos.

Estas composiciones farmacéuticas son formuladas para administración por vía vaginal o para administración por vía oral. En particular, las formas galénicas utilizadas serán en forma de cápsulas blandas, de comprimidos, de cremas, de suspensiones líquidas u oleosas, o cualquier otro dispositivo médico apropiado.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos 100 mg, preferiblemente al menos 150 mg y más preferiblemente al menos 200 mg de tiosulfato por gramo de polvo, en asociación con una cepa de *Lactobacillus crispatus*, para su uso en el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como vaginosis, candidiasis e infecciones urinarias.

Preferentemente, esta composición comprenderá de aproximadamente 230 mg de tiosulfato de sodio en combinación con 10^8 a 10^9 UFC/g de una cepa de *Lactobacillus crispatus*.

Se pueden determinar los modos de administración, las posologías y las formas galénicas de los compuestos y de las composiciones según la invención, según los criterios tomados generalmente en cuenta en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico adaptado para un paciente tales como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados. El tratamiento de las infecciones genitourinarias se realizará de manera preferida por administración de una o dos cápsulas blandas de 350 mg/día.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos 100 mg, preferiblemente al menos 150 mg y más preferiblemente al menos 200 mg de tiosulfato por gramo de polvo, en asociación con 10^7 a 10^{10} UFC de una cepa de *Lactobacillus*, para su uso en el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como vaginosis, candidiasis e infecciones urinarias, mediante la potenciación del efecto antipatógeno de los lactobacilos.

También se describe en la presente solicitud la utilización de tiosulfato y en particular de tiosulfato de sodio, para el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como vaginosis, candidiasis e infecciones urinarias, mediante potenciación del efecto antipatógeno de lactobacilos.

Se podrá utilizar el tiosulfato en combinación con lactobacilos, tal como se describió anteriormente. También se

describe la administración del tiosulfato sólo con el objetivo de potenciar el efecto antipatógeno de los lactobacilos presentes de manera endógena en la cavidad vaginal.

Descripción de las figuras

- figura 1. Influencia de la concentración de tiosulfato de sodio en la formulación de la cepa *L. Crispatus* BLL2005, para la inhibición del patógeno *C. albicans*. Se expresan los resultados como disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración T0 y en los diferentes puntos de muestreo (T=4h, 24h y 28h).
- figura 2. Composiciones que comprenden diferentes cepas de lactobacilos sin (figura 2A) o con (figura 2B) tiosulfato de sodio, para la inhibición del patógeno *C. albicans*. Se expresan los resultados como la disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración a T0 y en los diferentes puntos de muestreo (T=4h, 24h y 28h).
- figura 3. Composición que comprende la cepa *L. crispatus* BLL2005 sin (figura 3A) o con (figura 3B) tiosulfato de sodio, para la inhibición de diferentes patógenos. Se expresan los resultados como la disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración a T0 y en los diferentes puntos de muestreo (T=4h, 24h y 28h).
- figura 4. Efecto del tiosulfato de sodio (TS, 1g/litro o 3g/litro) utilizado solo, sobre el crecimiento del patógeno *C. albicans*.
- figura 5. Efecto de la 'formulación A' con o sin la presencia de *L. crispatus*, sobre el crecimiento del patógeno *C. albicans*. Los lotes E117 y E122 contienen unos *L. crispatus*; los lotes LYO A1 y LYO A1 no los contienen.
- figura 6. Cocultivo de la cepa Lcr35[®] (*L. rhamnosus*) formulada con 150 mg de tiosulfato (después de liofilización en el producto final) y de *Candida albicans*.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Asociación de la cepa *L. crispatus* BLL2005 y de diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio, para la inhibición del patógeno *C. albicans*

Se realizaron unos ensayos de coincubación entre la cepa patógena *Candida albicans* UMIP48.72 (ATCC10231) con la cepa *L. crispatus* BLL2005, formulada con diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio. La base de la formulación corresponde a la formulación A (ver a continuación), en la que se hizo variar la concentración de tiosulfato de sodio. Se añade este elemento al terminar la fermentación, antes de la etapa de liofilización.

La formulación A comprende los siguientes componentes:

- Medio de cultivo: 116 g/l de leche, 15 g/l de dextrosa, 10 g/l de autolizado de levadura, 2 ml/l de Tween,
- Medio de liofilización: 110 g/l de leche, 101,5 g/l de FOS, 9,5 ml/l de glutamato, 5,25 g/l de ácido ascórbico, 113 g/l de tiosulfato de sodio.

Se ensayaron las siguientes formulaciones (Tabla 1):

Referencia del lote	Formulación A asociada con una concentración de tiosulfato de sodio de:
E289-2005	0 g/l
E290-2005	10 g/l
E291-2005	25 g/l
E292-2005	50 g/l
E293-2005	75 g/l
E115-2005 = formulación A	113 g/l

Descripción del modo de puesta en práctica:

Medios de cultivo utilizados:

- Cepas de lactobacilos: Caldo/agar de MRS (a 37°C)

- Cepas patógenas: Caldo y agar de Sabouraud (a 25°C)
- Medio de cultivo del ensayo: mezcla homogénea de los dos medios de cultivo.

5 Preparación de los inóculos:

- Trabajar con muestras sin bloqueo en frío,
- Producto probiótico: se coloca 0,2 g en 20 ml de caldo MRS – en horno a 37°C durante 48 h,
- Cepa patógena: se coloca 0,2 ml en 20 ml de caldo de Sabouraud a 25°C durante 48 h,
- Se controla mediante aislamiento la pureza de las cepas.

15 Preparación de los controles:

- Para la fabricación del control *patógeno*, se colocan 5 ml de caldo de Sabouraud inoculado (titulación cerca de 1.10^8 UFC/ml) con 5 ml de caldo MRS no inoculado.
- Para la fabricación del control *probiótico*, se colocan 5ml de MRS inoculado (titulación cerca de 1.10^8 UFC/ml) con 5 ml de caldo de Sabouraud no inoculado.

Puesta en contacto de los inóculos:

- Colocar 5 ml de la cepa patógena con 5 ml de la cepa probiótica. Se realizan unas extracciones directamente de la mezcla.

Seguimiento:

- Determinación de la numeración del patógeno y del probiótico a T_0 , T_4 , T_{24} y T_{28h}
- Determinación del pH de la solución a T_0 , T_4 , T_{24} y T_{28h}

Resultados

Los resultados están representados en la figura 1 y en la tabla 2 siguiente. Se expresan los resultados como la disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración a T_0 y en los diferentes puntos de muestreo (T_4h , T_{24h} y T_{28h}).

	Reducción en $\log_{10}$		
	4 horas	24 horas	28 horas
<i>Candida albicans</i> vs E289-2005 (0 g/l)	0	1	2
<i>Candida albicans</i> vs E290-2005 (10 g/l)	0	3	3
<i>Candida albicans</i> vs E291-2005 (25 g/l)	0	3	5
<i>Candida albicans</i> vs E292-2005 (50 g/l)	0	3	3
<i>Candida albicans</i> vs E293-2005 (75 g/l)	0	3	7
<i>Candida albicans</i> vs E115-2005 (113 g/l)	0	6	7

Para todos los ensayos, la numeración de la cepa BLL2005 permanecía constante durante la coincubación.

Conclusión

Este experimento permite demostrar que a partir de 10 g/l de tiosulfato de sodio en la formulación A de la cepa *L. Crispatus* BLL2005, se observa después de 28 h de coincubación un aumento en la inhibición contra la cepa patógena *Candida albicans* ensayada, de al menos 1 log. A partir de una concentración de 75 g/l, se obtuvo *in vitro* una inhibición completa del patógeno.

Ejemplo 2 – Asociación de diferentes cepas *Lactobacillus* y tiosulfato de sodio, para la inhibición del patógeno *C. albicans*Cepas ensayadas

5 Las cepas siguientes se ensayaron con o sin la 'formulación A' que comprende 113 g/litro de tiosulfato de sodio (tabla 3)

PB 0003	CIP 69.17	<i>Lb jensenii T</i>
PB 004	CIP 101887	<i>Lb reuteri T</i>
PB 0033	CIP 105932	<i>Lb vaginalis T</i>
PB 0041	BLL2005	<i>Lb crispatus</i>
PB 0039	Lcr35 [®]	<i>Lb casei variedad rhamnosus</i>

10 El modo de puesta en práctica es equivalente al descrito en el ejemplo 1.

Para todos los ensayos, las numeraciones de las cepas de lactobacilos permanecían constantes durante la coincubación.

15 Se muestran los resultados en la figura 2. Se expresan los resultados como la disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración a T0 y los diferentes puntos de muestreo (T4h, T24h y T28h).

Conclusión:

20 En el estado natural, todas las cepas de *Lactobacillus* ensayadas tienen pocas o ninguna capacidades inhibitoras frente al patógeno *C. albicans* (véase la figura 2A).

25 Por el contrario, cuando se utiliza la formulación A en asociación con las cepas PB00033, BLL2005 y Lcr35[®], se observa una inhibición completa del patógeno después de 28 h de coincubación. La asociación de la formulación A con las cepas PB0003 y PB0004 permite obtener una inhibición del patógeno superior a 3 log.

Así, la formulación de diferentes especies de lactobacilos con tiosulfato de sodio permite que las 5 cepas ensayadas aumenten muy significativamente su capacidad para inhibir el patógeno *Candida albicans*.

Ejemplo 3 – Asociación de *L. crispatus* BLL2005 y tiosulfato de sodio, para la inhibición de varios patógenos

Se realizaron diferentes ensayos de coincubación entre varias cepas *Candida* y la cepa *L. crispatus* BLL2005 formulada sin tiosulfato de sodio (figura 3A) o según la formulación A (figura 3B).

Tabla 4 - Cepas patogénicas ensayadas

PBp0001 - <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
PBp0016 - <i>Candida Albicans</i>	Aislamiento clínico
PBp0017 - <i>Candida kefir</i>	Aislamiento clínico
PBp0018 - <i>Candida tropi-calis</i>	Aislamiento clínico
PBp0019 - <i>Candida albicans</i>	Aislamiento clínico
PBp0020 - <i>Candida albicans</i>	Aislamiento clínico
PBp0021 - <i>Candida albicans</i>	Aislamiento clínico

El modo de puesta en práctica es equivalente al descrito en el Ejemplo 1.

40 Para todos los ensayos, la numeración de las cepas de lactobacilos permanece constante durante la coincubación. La determinación de la numeración del patógeno y del probiótico se realiza a T0, T4h, T24H y T28h. Para todos los ensayos, la numeración de la cepa BLL2005 permanece constante durante la coincubación.

45 Los resultados se presentan en la figura 3. Se expresan los resultados como la disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración a T0 y en los diferentes puntos de muestreo (T0, T4h, T24H y T28h).

Conclusión:

50 La formulación A de la cepa *L. crispatus* BLL2005 (lote ensayado: E115-2005) permite obtener, después de 28h de coincubación, una inhibición superior o igual a 3 log frente a todas las cepas de *Candida* ensayadas.

Ejemplo 4 – Preparación de la “formulación A”

Se cultiva la cepa *BLL2005* en el siguiente medio de cultivo:

116 g/l de leche, 15 g/l de dextrosa, 10 g/l de autolizado de levadura, 2 ml/l de Tween.

Después de la inoculación del medio de cultivo, se mantiene la fermentación a una temperatura de 37°C mediante un dispositivo termostáticamente apropiado durante 48 a 72 horas. Al final de la fermentación, se vierte en una cuba de mezcla el cultivo que ha alcanzado una numeración superior o igual a 10^8 UFC/ml. El cultivo se agita fuertemente para romper el coágulo y se añaden los siguientes adyuvantes de liofilización: 110 g/l de leche, 101,5 g/l de FOS, 9,5 ml/l de glutamato de sodio, 5,25 g/l de ácido ascórbico, 113 g/l de tiosulfato de sodio.

Después, se realiza la liofilización según las condiciones clásicas bien conocidas por el experto en la materia: se distribuyen las bacterias asépticamente sobre bandejas de acero inoxidable, se congelan rápidamente hasta -40°C y después se someten a una operación de sublimación a -22°C. Después, se realiza el secado en horno a 37 °C.

Después, se tritura y se tamiza el producto bajo atmósfera controlada. El polvo obtenido puede ser mezclado ventajosamente con un 1% de estearato de magnesio para facilitar el llenado de las cápsulas duras/cápsulas blandas.

Se distribuye el polvo así obtenido en cápsulas blandas de tamaño nº 0 a razón de 350 mg de polvo por cápsula blanda.

Ejemplo 5 - Efectos antipatógenos del sobrenadante de cultivo de la formulación A

Se ensayó la siguiente cepa *Candida*: PBpOOO1- *Candida albicans* ATCC 10231.

Medios de cultivos utilizados:

- Cepas Lactobacilos: Caldo/agar de MRS (a 37°C).
- Cepas patógenas: Caldo y agar Sabouraud (a 25°C).
- Medio de cultivo del ensayo: mezcla homogénea de los dos medios de cultivo.

Preparación de los inóculos:

- Trabajar con muestras sin bloqueo en frío,
- Producto probiótico:
 - Se coloca 0,2 gramos de la formulación A en 20 ml de caldo MRS - en horno a 37°C durante 48 h.
- Cepa patógena: Se coloca 0,2 ml en 20 ml de caldo Sabouraud a 25°C durante 48 h.
- Se controla la pureza de las cepas mediante aislamiento.

Preparación de los controles:

- Para la fabricación del control *patógeno*, se colocan 5 ml del caldo Sabouraud inoculado (titulación próxima a 1.10^8 UFC) con 5 ml de caldo MRS no inoculado.
- Para la fabricación del control *probiótico*, se colocan 5 ml de MRS inoculado (titulación próxima a 1.10^8 UFC/ml) con 5 ml de caldo Sabouraud no inoculado.

Puesta en contacto de los inóculos:

- Colocar 5 ml de la cepa patógena con 5 ml del sobrenadante de cultivo de la cepa probiótica. Se obtuvo el sobrenadante mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos y después una filtración a 0,22 µm. Se realizan los muestreos directamente en la mezcla.

Resultados:

Se expresan los resultados en disminución logarítmica decimal ($\log_{10}$) del número de UFC entre la numeración de T0 y los diferentes puntos de muestreo (T24h, T48h y T72h).

Tabla 5

	Disminución en log ₁₀		
	24h	48h	72h
<i>Candida albicans</i> frente al sobrenadante de la formulación A BLL2005	0	7	7
Control <i>Candida albicans</i>	0	0	0

5 Conclusión:

Después del precultivo durante 48h en caldo MRS, el sobrenadante de la formulación A, obtenido mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos y después filtración a 0,22 µm, permite iniciar la inhibición completa de la cepa patógena *C. albicans* a partir de 48h después de la coincubación.

10

Ejemplo 6 - Efecto del tiosulfato de sodio solo sobre el crecimiento del patógeno *C. albicans*Descripción del protocolo:

- 15 - Inoculación de la cepa 66h antes de realizar el ensayo.
- Puesta en contacto del precultivo con el tiosulfato de sodio.
- 20 - Determinación de la titulación a T0h, 724h, T48h, T72h y T96h.

Preparación del ensayo:

- Cepa Patógena:

25 *Candida albicans*: Caldo Sabouraud – 0,5 ml del tubo de trabajo en 50 ml a 25°C durante 48h.

- Tiosulfato: Se prepara el medio MRS (DeMan, Rogosa y Sharpe) + tiosulfato de sodio (TS) a las diferentes concentraciones como se indica a continuación:

30 Medio MRS + 1 g/l de tiosulfato de sodio: se coloca 0,3 g de TS en 30 ml de caldo.

Medio MRS + 3 g/l de tiosulfato de sodio: se coloca 0,1 g de TS en 10 ml de caldo.

Puesta en contacto:

35 El medio de cultivo del ensayo es una mezcla homogénea del medio de cultivo de patógeno y del medio MRS que contiene tiosulfato de sodio.

- 40 - *Candida albicans* + medio MRS + TS (1 g/l): se colocan 5 ml de caldo Sabouraud inoculado con la cepa patógena y 5 ml del medio MRS + TS (1 g/l).
- *Candida albicans* + medio MRS + TS (3 g/l): se colocan 5 ml de caldo Sabouraud inoculado con la cepa patógena y 5 ml del medio MRS + TS (3 g/l).
- 45 - Controles de *Candida*: Se colocan 5 ml de caldo de Sabouraud inoculado con la cepa patógena y 5 ml de caldo MRS.

Los resultados se presentan en la figura 4.

50 La "formulación A" que comprende 113 g/litro de tiosulfato de sodio también se ha ensayado por su acción anti-*Candida*.

Preparación del control *Candida*:

55 Para la fabricación del control *Candida*, se colocan 5 ml de caldo Sabouraud inoculado con la cepa patógena (titulación próxima a 1.10⁸ UFC/ml) y 5 ml de caldo MRS no inoculado.

Se realizan los muestreos y las determinaciones de las titulaciones a T0, T4h, T24h y T28h.

Tabla 6

	0	4h	24h	28h
<i>Candida albicans</i> frente a la formulación A sin lactobacilos	6,00E+06	5,50E+06	8,00E+06	9,00E+06
Control <i>Candida</i> sobre Sabouraud	5,00E+06	9,00E+06	1,50E+07	9,8E+06

La figura 5 ilustra varios tipos de cultivos:

- El control “*Candida*” cultivado solo;
- Dos lotes (E117 y E112) que comprenden la cepa BLL2005 en la formulación A, tal como se ha descrito anteriormente;
- Dos lotes (LYO 2005 A1 y A2) que comprenden la formulación A sola, sin bacterias.

Es evidente que la formulación A, que contiene 113 g/litro de tiosulfato de sodio, no tiene ninguna actividad de inhibición del crecimiento de *Candida*.

Conclusión: No se observa ningún potencial antipatógeno en presencia de tiosulfato de sodio, sea cual sea la concentración estudiada. Este experimento demuestra que el tiosulfato por sí mismo no permite inhibir el crecimiento de *Candida albicans* y que actúa solamente como un agente potenciador de lactobacilos.

Ejemplo 7 - Cocultivo de la cepa Lcr35[®] (*L. rhamnosus*) formulada con 113 g/litro de tiosulfato y *Candida albicans*, y la producción de bacteriocinas mediante esta cepa con o sin tiosulfato

A. Inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de la cepa Lcr35[®] (*L. rhamnosus*)

Los recuentos han mostrado una inhibición total de T=24H de la cepa patógena con un formulación de Lcr35[®] que contiene 113 g/l de tiosulfato (figura 6).

B. Potenciación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas por el tiosulfato.

La cepa *L. rhamnosus* Lcr35[®] es capaz de inhibir el crecimiento de patógenos. Además, la cepa formulada con tiosulfato es más eficaz que la cepa sola. Para comprender los mecanismos que difieren entre estas dos condiciones, se buscan unos genes implicados en la producción de bacteriocinas. En Lcr35[®], se encontraron 7 genes que codifican a las bacteriocinas.

Materiales y Métodos

En la bibliografía, varias bacteriocinas están asociadas con bacterias lácticas. Las secuencias de genes que codifican a estas últimas se descargaron de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y después se alinearon frente a los genomas de nuestra cepa probiótica gracias al BLAST.

La Tabla 7 siguiente presenta los diferentes genes que codifican las bacteriocinas encontradas en los genomas de Lcr35[®].

<i>entA</i>	Enterocina
<i>pedC/papC</i>	Pedocina
<i>spaR</i>	Subtlina
<i>cvpA</i>	Colicina
<i>Bac1</i>	Bacteriocina desconocida
<i>spiA</i>	Sakacina
<i>lec1</i>	Leucocina

Seguimiento y cuantificación de genes de interés

Se han diseñado unos pares de cebadores específicos de los genes objetivos anteriores con el fin de seguir su expresión por RT-PCRq. Se realizaron dos cultivos puros y un cocultivo para Lcr35[®], los primeros con la cepa probiótica nativa, los segundos con una formulación de 1 g/litro de tiosulfato y las últimas con una formulación de 113 g/l de tiosulfato y *C. albicans*.

Resultados: Tabla 8 a continuación:

Bacteriocinas y genes de codificación		Lcr35	Lcr35 [®] + 1 g/l de tiosulfato	Lcr35 [®] + 113 g/l de tio-sulfato
Enterocina	<i>entA1</i>	1	1	1
	<i>entA2</i>	1	3	6
Pediocina	<i>papC</i>	1	3	5
Subtilina	<i>spaR</i>	1	2	1
Colicina	<i>cvpA</i>	1	3	5
Bacteriocina desconocida	<i>bac1</i>	1	2	2
Sakacina	<i>spiA</i>	1	4	4
Leucocina	<i>lec1</i>	1	2	3

5 El seguimiento de la expresión de estos genes mediante RT-PCR cuantitativo demostró una sobreexpresión de 6 genes que codifican para unas bacteriocinas cuando se formula la cepa con 1 g/l de tiosulfato. Cuando esta formulación comprende 113 g/l de tiosulfato, se sobreexpresan también con más fuerza 3 genes implicados en la secreción de las bacteriocinas. Por lo tanto, la presencia de tiosulfato puede favorecer la secreción de bacteriocinas que participarán entonces en la inhibición de patógenos tal como *C. albicans*.

10 Por lo tanto, se ha demostrado que el tiosulfato permite potenciar a los lactobacilos en la inhibición del patógeno *Candida Albicans*, permitiendo en particular la sobreproducción de bacteriocinas.

Referencias - documentos de patentes

15 WO 84/04675
 WO 2000/035465
 WO 2006/045475
 WO 2010/004005
 20 WO 2010/133314
 WO 2011/066949
 US 2002/0044926
 US nº 6.093.394
 US nº 6.468.526
 25 US nº 7.807.440
 US 2010/0151026
 US 2011/0008467
 EP 0 732 916 B1
 EP 1 911 455 A1
 30 EP 2 111 640 A1
 CN 20091145852

Referencias bibliográficas

35 Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C, Veisseire P. "Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35[®]". J. Biotechnol. 31 de agosto de 2012; 160(3-4): 236-41. Epub 19 de abril de 2012.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Tiosulfato para su utilización en el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como vaginosis, candidiasis e infecciones urinarias, para potenciar el efecto antipatógeno de bacterias lactobacilos, estando el tiosulfato en una cantidad de por lo menos 100 mg/gramo de polvo, para un polvo que comprende de 10^7 a 10^{10} UFC/g de lactobacilos.
- 10 2. Tiosulfato para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado por que el tiosulfato se selecciona de entre el tiosulfato de sodio o el tiosulfato de potasio.
3. Tiosulfato para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el tiosulfato se utiliza en una cantidad de aproximadamente 230 mg/gramo de polvo, para un polvo que comprende entre 10^7 y 10^{10} UFC/g.
- 15 4. Tiosulfato para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado por que los lactobacilos son *Lactobacillus rhamnosus* y/o *Lactobacillus crispatus*.
5. Composición farmacéutica que comprende por lo menos 100 mg de tiosulfato por gramo, en combinación con una cepa de *Lactobacillus crispatus*.
- 20 6. Composición farmacéutica que comprende un sobrenadante de cultivo de una cepa *Lactobacillus* cultivada en presencia de tiosulfato de sodio, no conteniendo dicho sobrenadante lactobacilos.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, formulada para una administración por vía vaginal o por vía oral.
- 25 8. Composición según una de las reivindicaciones 6 a 7, para su utilización en el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como la vaginosis, la candidiasis y las infecciones urinarias.
- 30 9. Composición farmacéutica que comprende por lo menos 100 mg de tiosulfato por gramo, en combinación con 10^7 a 10^{10} UFC/g de una cepa *Lactobacillus*, para su utilización en el tratamiento de infecciones genitourinarias tales como la vaginosis, la candidiasis y las infecciones urinarias, mediante potenciación del efecto antipatógeno de los lactobacilos.

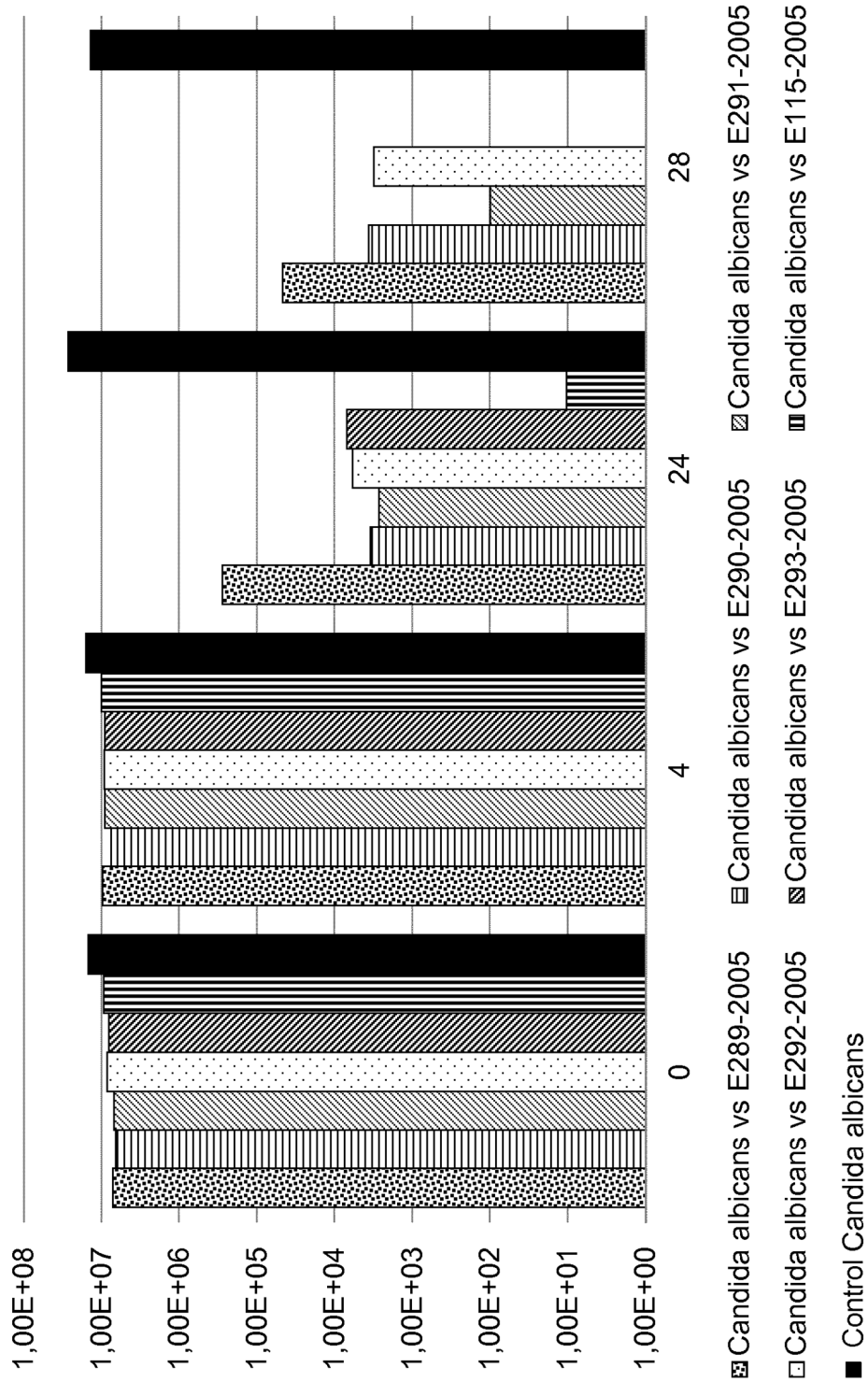


Figura 1

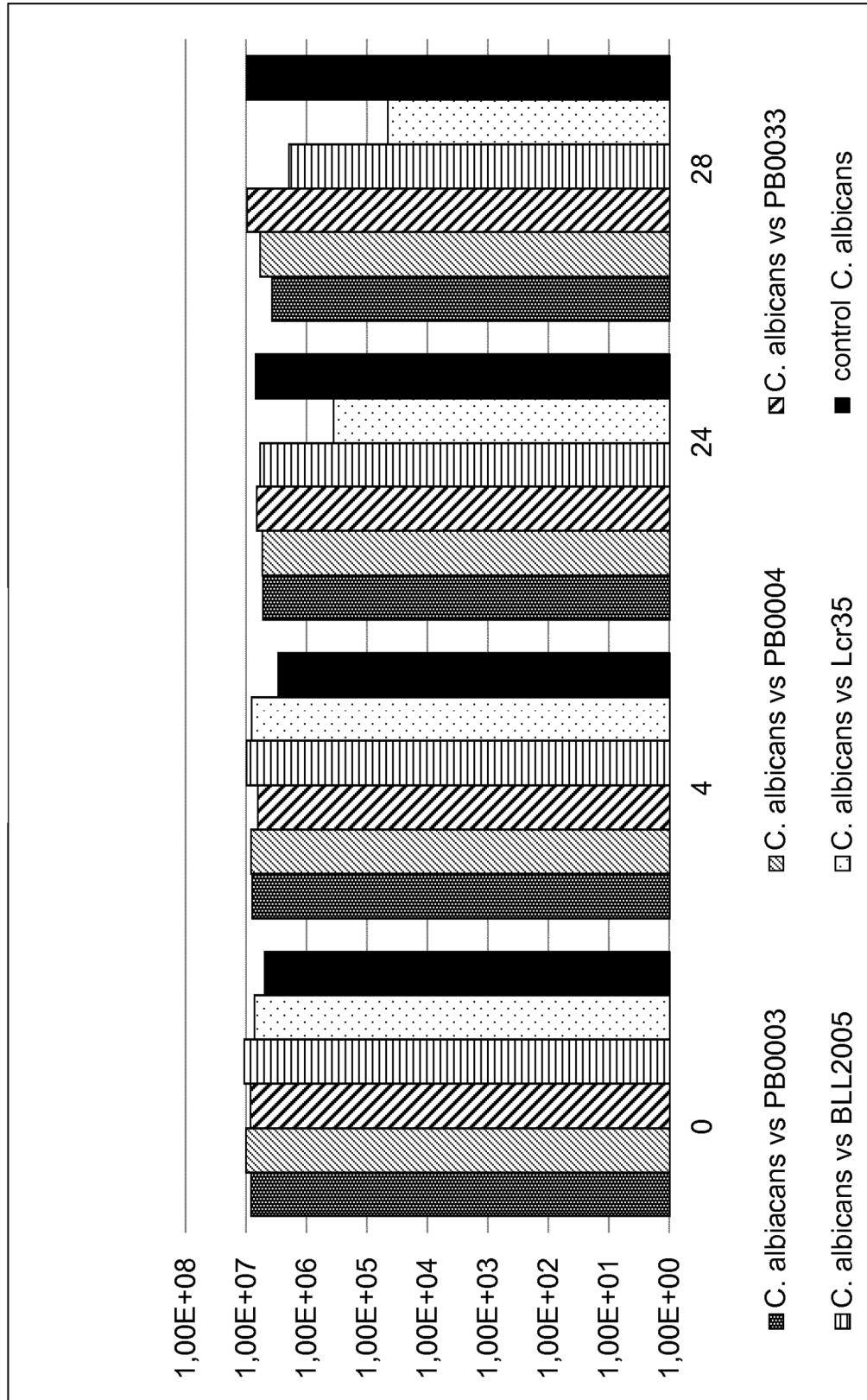


Figura 2A

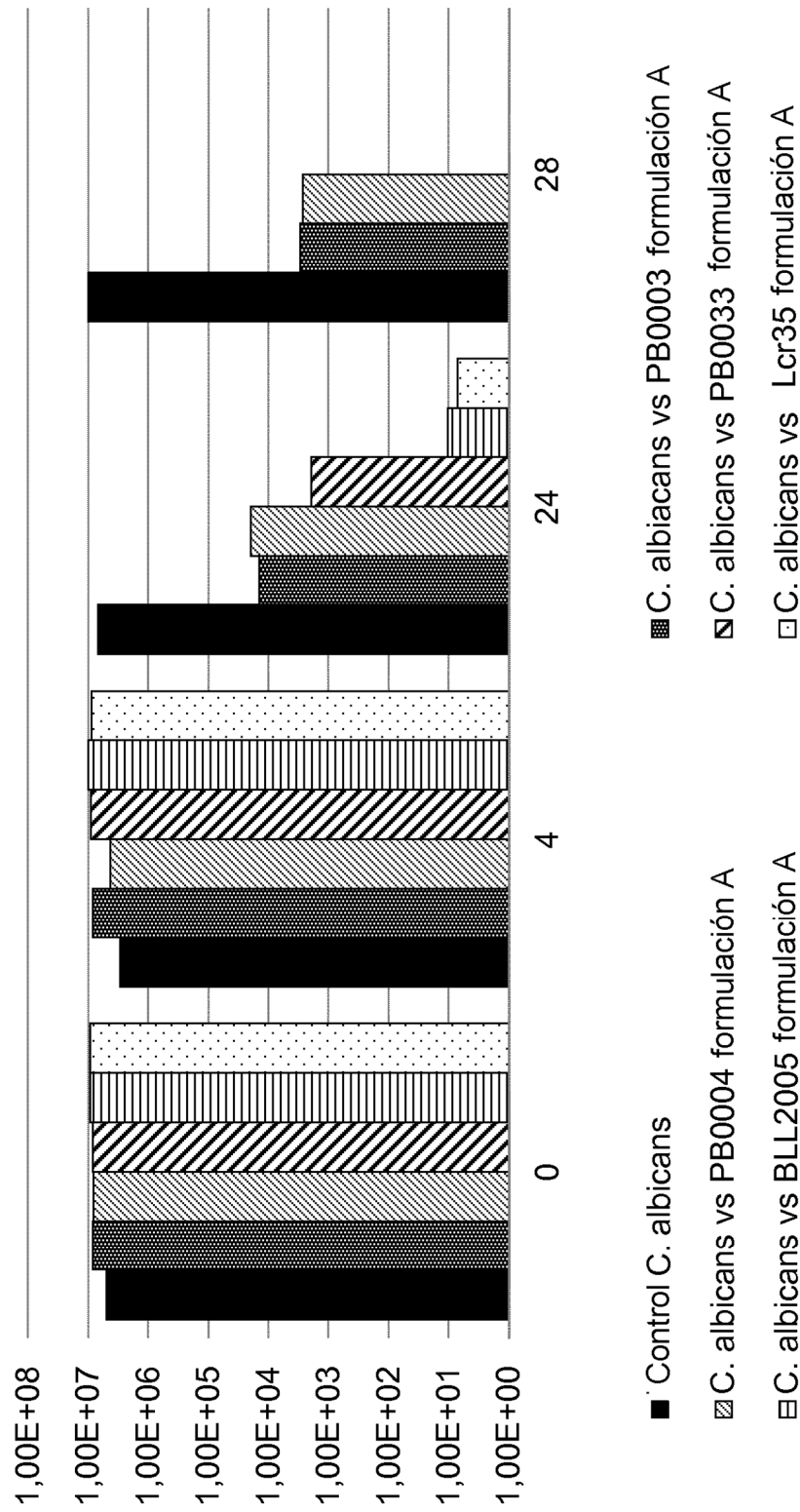


Figura 2B

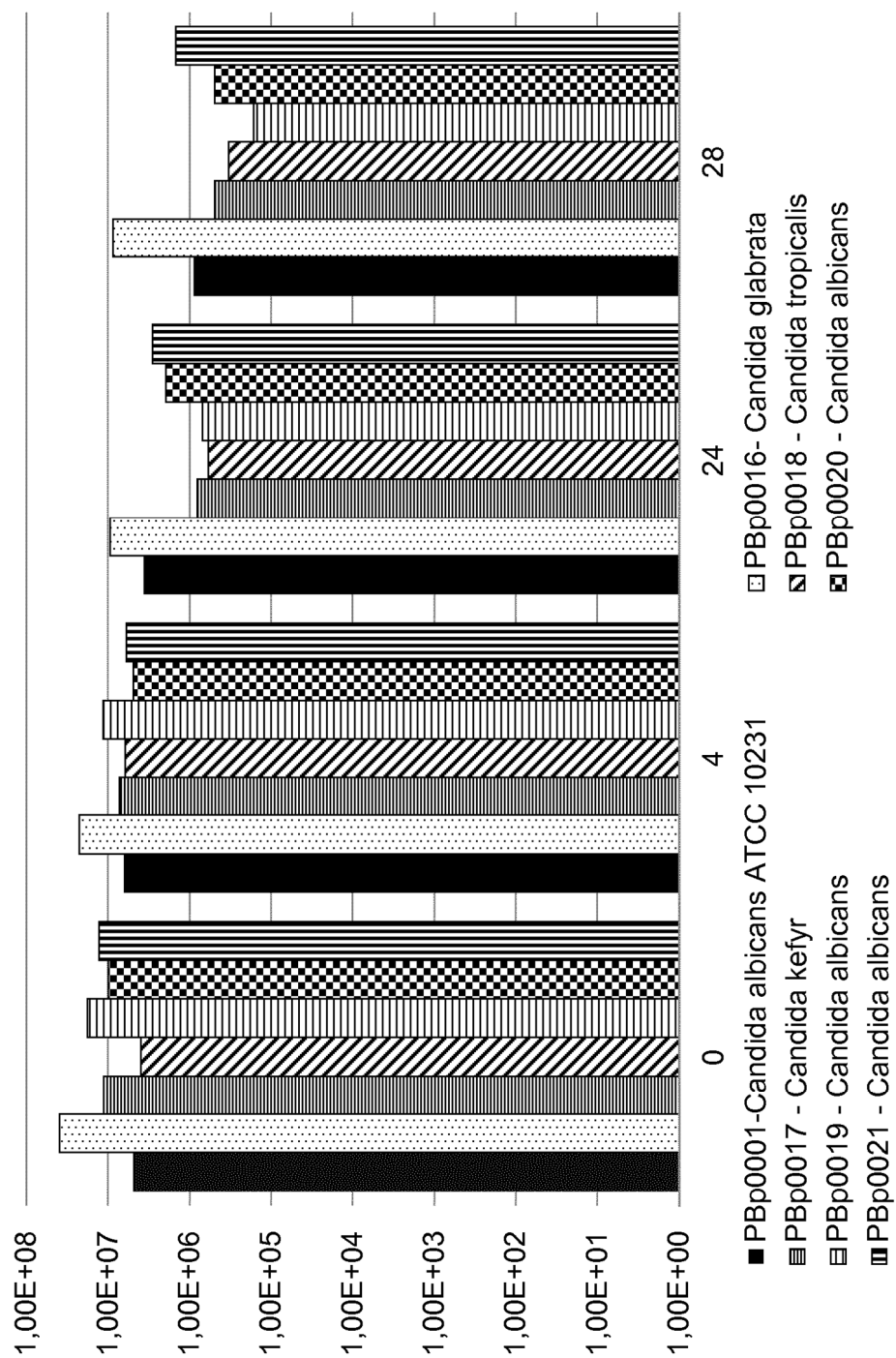


Figura 3A

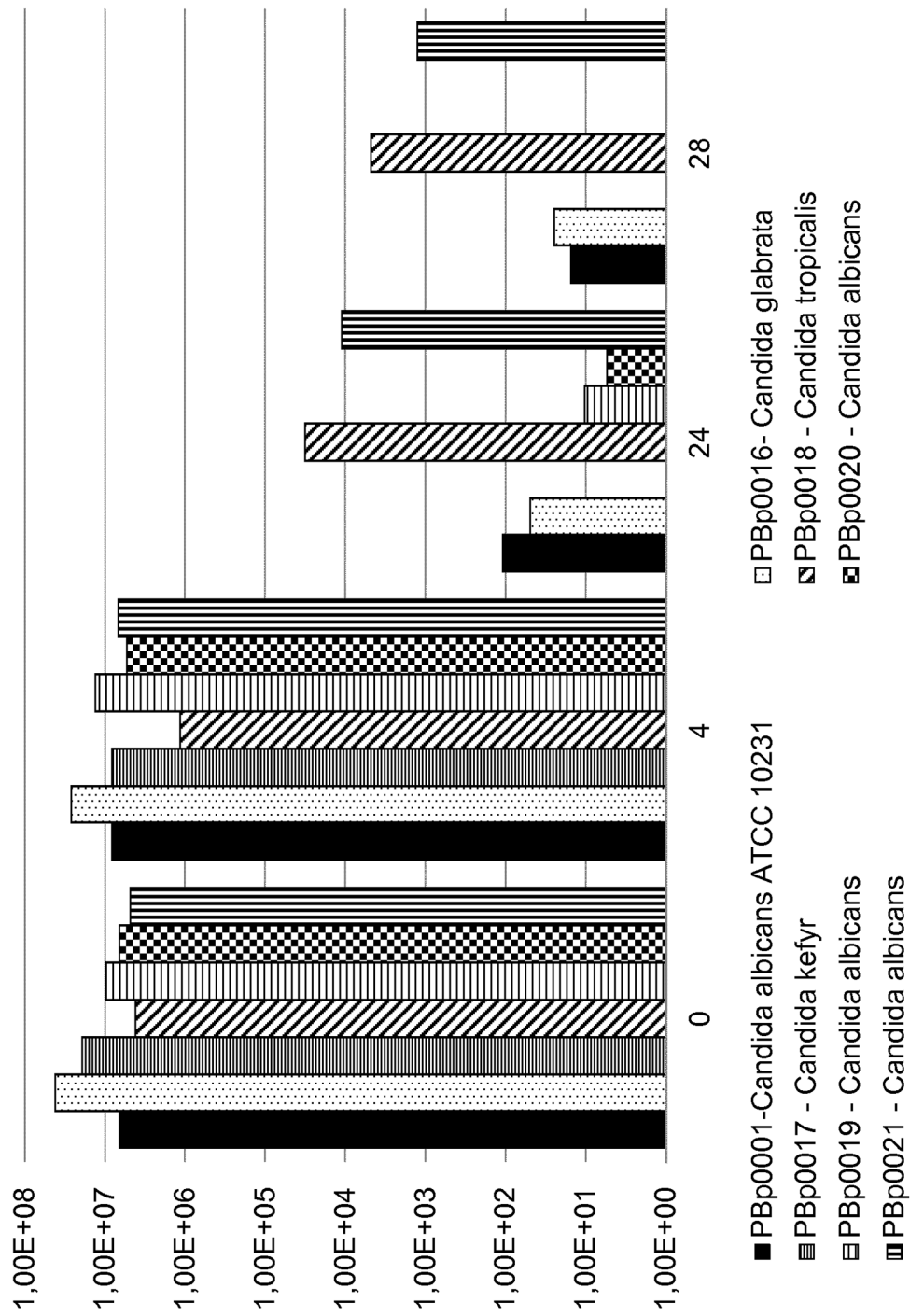


Figura 3B

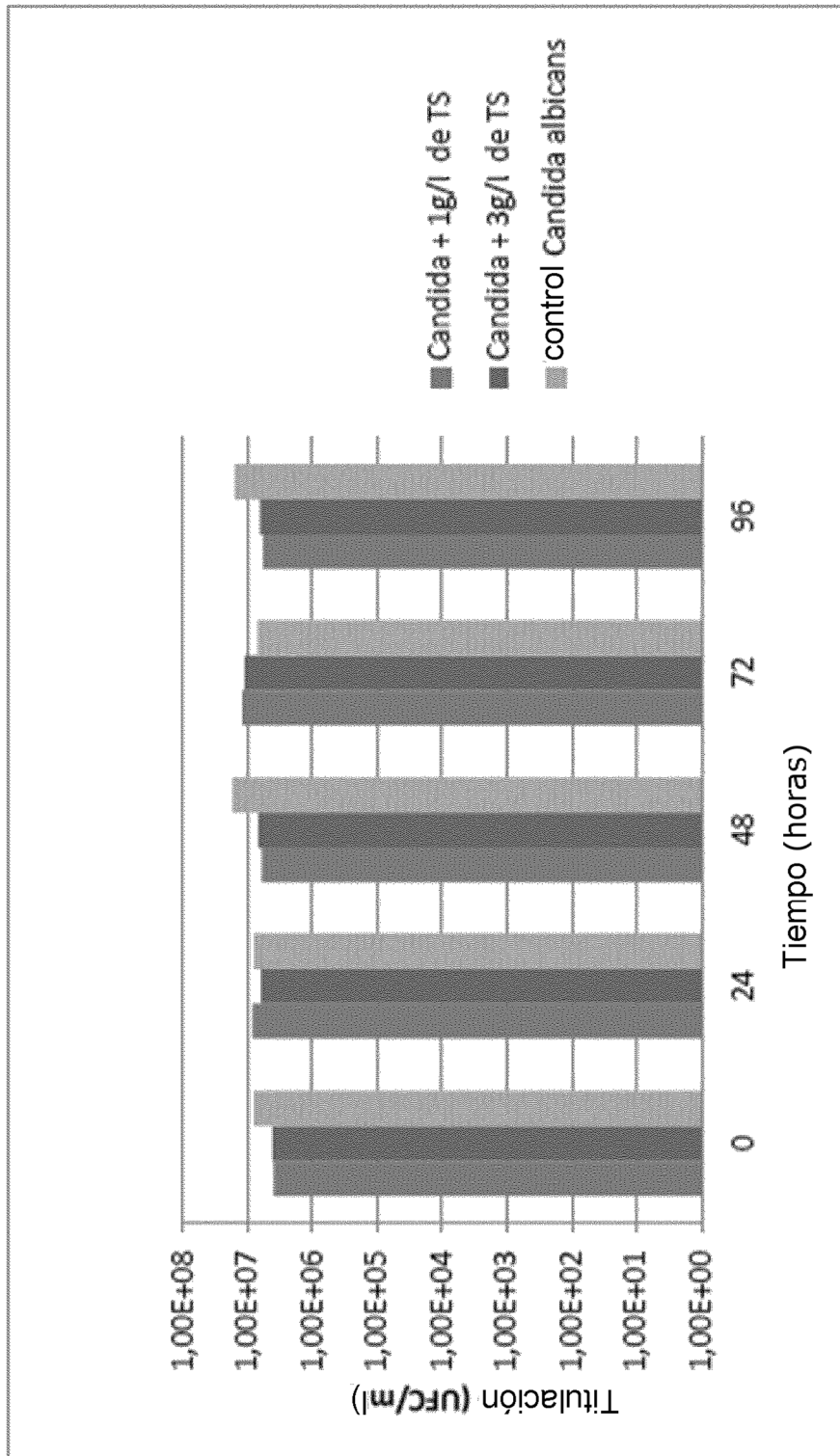


Figura 4

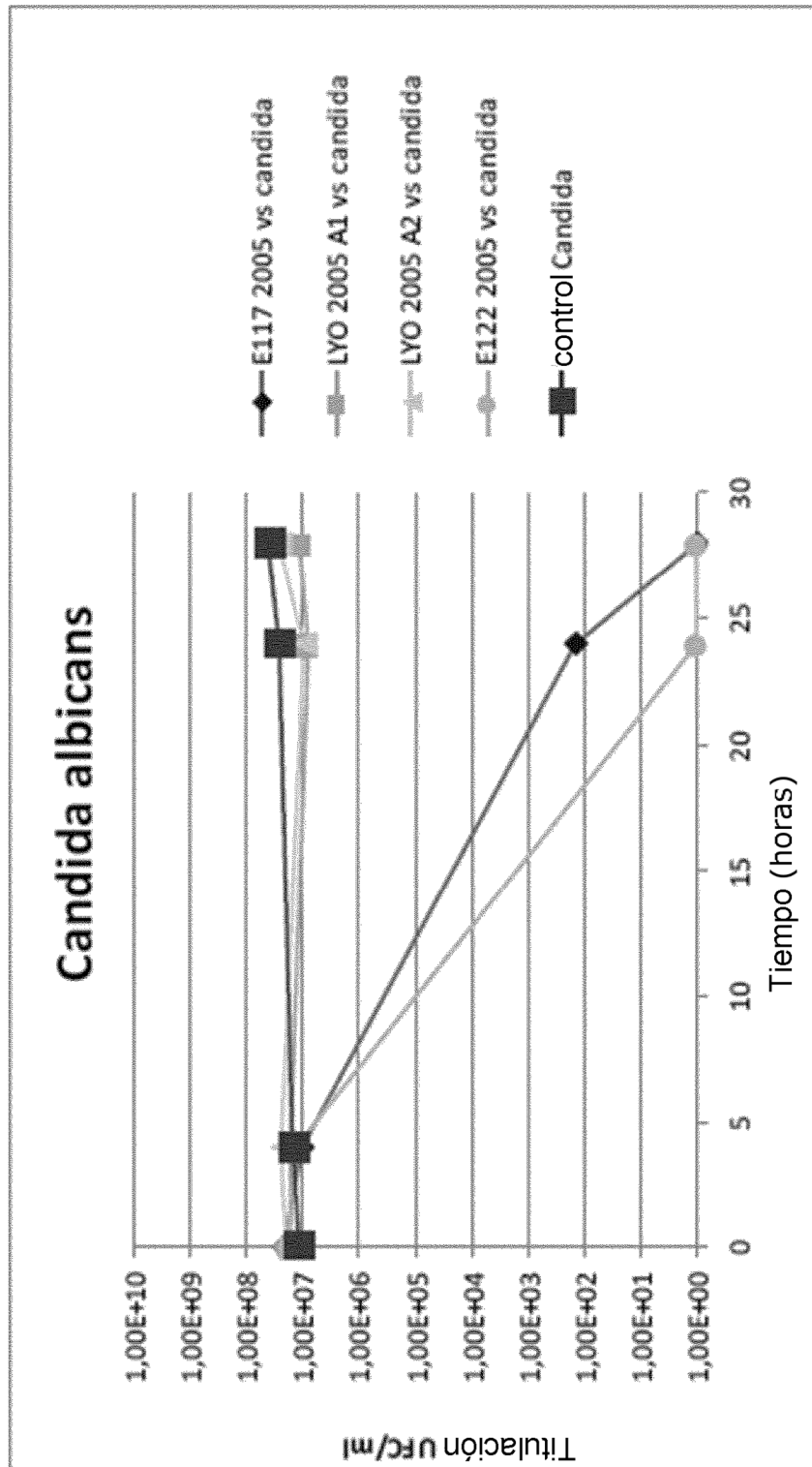


Figura 5

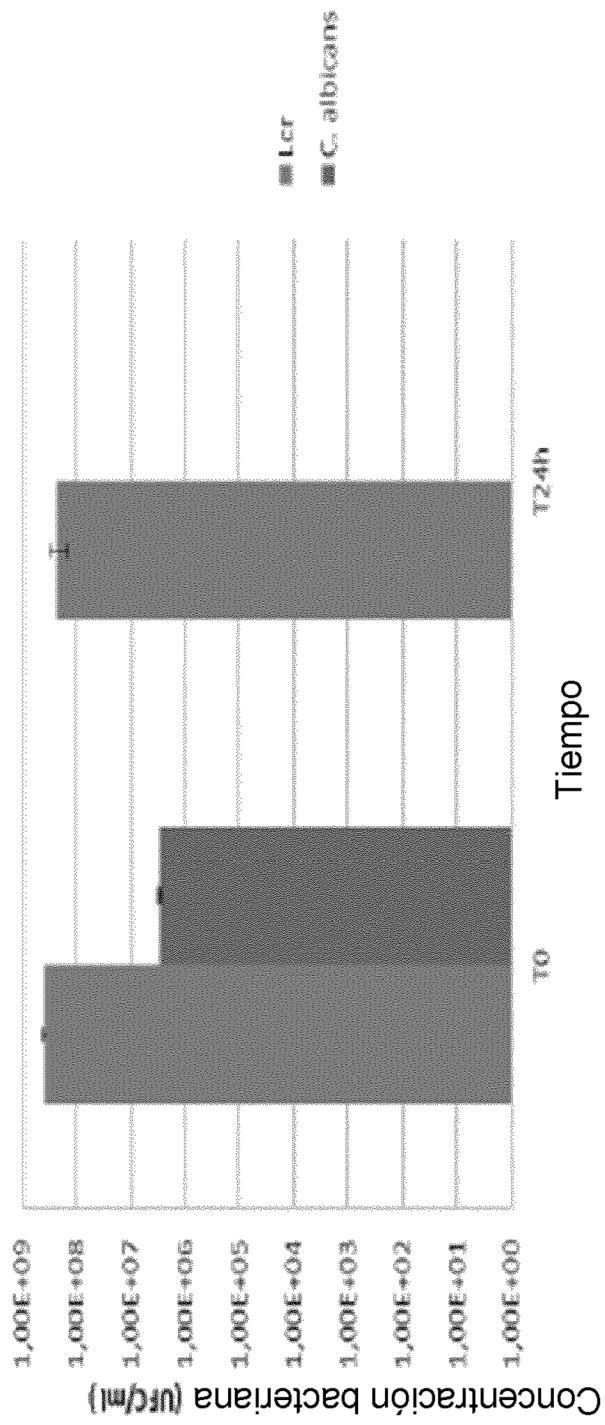


Figura 6