

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 833**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/EP2013/064424**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13734435 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2870234**

54 Título: **Nueva cepa de Lactobacillus crispatus**

30 Prioridad:

09.07.2012 FR 1256569

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

26.12.2017

73 Titular/es:

**S.P.M.D (100.0%)
174 quai de Jemmapes
75010 Paris, FR**

72 Inventor/es:

NIVOLIEZ, ADRIEN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 647 833 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

Nueva cepa de *Lactobacillus crispatus*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva cepa específica de *Lactobacillus crispatus*, aislada a partir de muestras tisulares sanas, y a cualquier cepa que presente las mismas características, así como a unas composiciones que las comprenden.

10

En una mujer sana, la flora urogenital comprende cerca de 50 especies diferentes de microorganismos. Entre estos microorganismos, el 95% de la población está constituido por diversas cepas de lactobacilos, entre ellas el "bacilo de Döderlein". Estos lactobacilos desempeñan una función de protección contra los patógenos mediante diversos mecanismos: producción de peróxido de hidrógeno, producción de ácido láctico, producción de bacteriocinas, inhibición de la adhesión y de la expansión de los patógenos. En particular, estos lactobacilos mantienen un pH ácido mediante la producción de ácido láctico a partir del glicógeno presente en la mucosa vaginal. Así, se inhibe el crecimiento de numerosos patógenos de la flora vaginal, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Neisseria gonorrhoeae*, los micoplasmas, *Mobiluncus* y sobre todo *Candida albicans*.

15

20

La flora vaginal normal está así principalmente compuesta por lactobacilos que forman una biopelícula protectora en la superficie de la mucosa. Los lactobacilos más frecuentemente observados en la vagina son, en particular, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus gasseri*.

25

La candidiasis vulvovaginal afecta al 70-75% de las mujeres en periodo de actividad genital por lo menos una vez en su vida; aproximadamente el 40-50% de ellas presentarán un segundo episodio. La incidencia de la candidiasis vulvovaginal recidiva (definida por la aparición de por lo menos 4 episodios por año, incluidos dos confirmados por examen micológico) se ha estimado en el 5-8%. Esta afección benigna tiene un impacto muy negativo sobre la calidad de vida de las pacientes y genera unos gastos en salud importantes. Tratar una patología de este tipo es difícil debido a la patogénesis multifactorial de esta afección.

30

El tratamiento de mantenimiento tradicional por antifúngico oral o vaginal debe ser de 6 meses por lo menos, pero el porcentaje de recaídas sigue siendo elevado, con un 60-70% de las mujeres que presentan una recidiva en los dos meses siguientes a la interrupción del tratamiento. Además, los efectos secundarios de los antifúngicos son frecuentes y su utilización a largo plazo puede favorecer la aparición de una vaginosis bacteriana.

35

La vaginosis bacteriana se debe a un desequilibrio cualitativo y cuantitativo de la flora vaginal normal que puede llevar a una desaparición casi completa de los lactobacilos en beneficio de la flora anaerobia y también la emergencia de gérmenes tales como *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* implicados en la vaginosis bacteriana.

40

La vaginosis bacteriana es una de las infecciones vaginales más frecuentes con un porcentaje de frecuencia del 10 al 15. Esta patología benigna en la mujer puede ser grave durante el embarazo, ya que puede provocar un parto prematuro, pesos bajos en el nacimiento, así como abortos espontáneos.

45

La vaginosis bacteriana, así como los demás desequilibrios de la microflora vaginal son tratados comúnmente por antibioterapia. Este tratamiento presenta los inconvenientes habituales de los tratamientos antibióticos y resultan cada vez menos eficaces. Además, tiene como objetivo eliminar la flora patógena, pero destruye también la flora normal beneficiosa.

50

Estado de la técnica

Se ha descrito la administración de lactobacilos beneficiosos, por vía oral o vaginal, para promover la salud vaginal y para tratar las infecciones genitales. En particular, las solicitudes de patente WO 84/04675, WO 2000/035465, US 2002/0044926 y WO 2006/045475 describen la administración por vía oral o vaginal de bacterias lácticas para promover la salud vaginal y para prevenir las recaídas de la candidiasis vulvovaginal.

55

Los lactobacilos preferidos son *Lactobacillus rhamnosus* y el bacilo de de Döderlein (*Lactobacillus acidophilus 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

Entre estas cepas, se podrán citar las cepas *Lactobacillus crispatus* siguientes:

- las cepas *Lactobacillus crispatus* depositadas en la DSMZ (Alemania) con los números de depósito DSM 16735, 16736, 16738, 16739, 16740, 16741, 16742 y 16743, tales como se describen en la solicitud de patente EP 1 824 500; estas cepas son capaces de colonizar las mucosas vaginales, y favorecer así la

65

salud vaginal; tienen también buenas propiedades de adhesión a las células epiteliales;

- las cepas de *Lactobacillus crispatus* depositadas en la CNCM (Francia) con los números de depósito I-3483, I-3484 y I-3486, tales como se describen en la solicitud de patente EP 1 812 023; estas cepas se han seleccionado por su capacidad de adherencia a las células epiteliales; presentan una buena resistencia a los pH ácidos del entorno gástrico, así como un efecto anti-patógeno demostrado;
- la cepa de *Lactobacillus crispatus* depositada en la BCCM/LMG (Bélgica) con el número de depósito P-20558 tal como se describe en la patente EP 1 427 808 B1; esta cepa se utiliza en combinación con otras cepas lácticas, para ser administrada con la ayuda de un tampón, presentando esta cepa la capacidad de poder colonizar la cavidad vaginal, incluso durante la menstruación; y
- la cepa de *Lactobacillus crispatus* depositada en la ATCC (USA) con el número de depósito 202225, tal como se describe en la patente EP 1 011 721 B1; esta cepa presenta una buena adherencia a las células epiteliales, una viabilidad de larga duración, en particular en presencia de la matriz de conservación descrita en este documento, así como una buena producción de ácido láctico y de H₂O₂.
- la cepa de *Lactobacillus crispatus P-17631* tal como se describe en la solicitud de patente EP 949 330 es capaz de fermentar el glicógeno, e inhibir el crecimiento de las *Candida*.

La mayoría de estas cepas probióticas, aisladas a partir de extracciones vaginales de mujeres sanas, no son capaces de sobrevivir en un medio que presenta un pH ácido, ni sobrevivir a un contacto prolongado con bilis.

El pH vaginal es un parámetro que varía de manera significativa durante la vida de la mujer: el pH fisiológico es de 7 en las chicas prepúberes, desciende hasta 3,8 en las mujeres púberes, y es superior a 5,5 durante la menopausia, en ausencia de tratamiento sustitutivo hormonal. Estas variaciones están relacionadas con múltiples factores tales como la presencia de estrógenos y la colonización por lactobacilos.

Por lo tanto, es importante para las cepas probióticas administradas de manera exógena poder resistir a los pH ácidos fisiológicos de la cavidad vaginal, y además poder resistir al pH de la cavidad gástrica durante una administración por vía oral.

Por otro lado, varias de estas cepas no son capaces de utilizar el glicógeno como fuente de carbono fermentable (Martin R. *et al.*, 2008). Ahora bien, esta propiedad es ventajosa, ya que es frecuente que la mucosa vaginal esté desprovista de glucosa, y el mantenimiento de la producción de ácido láctico por la cepa probiótica sólo se puede llevar a cabo en presencia de una fuente de carbono fermentable.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa aislada de *Lactobacillus crispatus*, identificada *IP174178*, depositada a la CNCM en fecha del 22 de junio de 2012 con el número de acceso I-4646.

Esta nueva cepa *IP174178* presenta las características estructurales siguientes:

- crece en condiciones aerobia-anaerobia;
- su perfil rep-PCR se presenta en la figura 1;
- la secuencia de su ADN ribosomal 16S se presenta en SEC ID nº 1.

Sus características funcionales principales son:

- su fuerte porcentaje de producción de H₂O₂ y de ácido láctico (más de 7 g/litro);
- su capacidad para crecer sobre glicógeno como único sustrato carbonado;
- su resistencia a la bilis;
- su resistencia a pH ácidos (en particular a pH comprendidos entre 2,5 y 4);
- su capacidad para inhibir el desarrollo de patógenos de la zona urogenital.

La cepa *Lactobacillus crispatus IP174178* presenta en particular una resistencia a los pH ácidos.

Más particularmente, la cepa *Lactobacillus crispatus IP174178* presenta una resistencia a la bilis y a los pH ácidos.

Más particularmente, la cepa *Lactobacillus crispatus IP174178* presenta una resistencia a la bilis y a los pH ácidos, y es capaz de metabolizar el glicógeno.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende por lo menos 10⁹ UFC de esta cepa *Lactobacillus crispatus IP174178*, sola o en combinación con otras cepas probióticas u otros principios

activos.

La invención se refiere asimismo a la utilización de esta cepa *IP174178* para la prevención y el tratamiento de infecciones genitales y urogenitales, recidivantes o no.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa aislada *Lactobacillus crispatus* identificada *IP174178*, y depositada en la CNCM con el número de acceso I-4646.

El término "lactobacilos" designa el conjunto de las bacterias lactobacilos, bacterias gram positivas, inmóviles, de formas y dimensiones variables, y anaerobias facultativas. La mayoría de los lactobacilos convierten la lactosa y otros azúcares simples en ácido láctico. Se encuentran en la vagina y en el tracto gastrointestinal y constituyen un elemento importante de la flora intestinal y vaginal.

El género "*Lactobacillus crispatus*" es una de las especies predominantes de la flora vaginal en Europa, en los Estados Unidos y en Japón (Antonio, MAD *et al.*, 1999).

La cepa aislada *Lactobacillus crispatus IP174178* presenta las características funcionales siguientes:

- fuerte producción de H₂O₂ y de ácido láctico (más de 7 g/litro);
- capacidad para crecer sobre glicógeno, sustrato endógeno segregado por la mucosa vaginal;
- resistencia a los pH ácidos, así como a la bilis;
- capacidad para inhibir el desarrollo de patógenos;
- adhesión a las células epiteliales vaginales.

Esta capacidad para crecer sobre glicógeno es relativamente rara, y reviste un interés particular para cepas destinadas a desarrollarse en el tracto genital, en el que la glucosa está frecuentemente ausente, y en el que la única fuente de carbono es el glicógeno. La producción de ácido láctico por esta cepa se mantiene, por lo tanto, incluso en ausencia de glucosa (véase la tabla 5).

La capacidad para resistir a pH ácidos es una característica muy interesante, ya que permite que la cepa según la invención, por un lado, resista al pH gástrico si se administra por vía oral y, por otro lado, se reproduzca en el tracto genital femenino incluso en caso de secreciones anormales ácidas.

La capacidad para resistir a la bilis permite considerar una administración de esta cepa por vía oral, y no únicamente en administración vaginal.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende la cepa *Lactobacillus crispatus IP174178*.

En la composición según la invención, el número de bacterias por gramo de composición es preferentemente superior a 10⁹, y está comprendido en particular entre 10⁸ y 10¹⁰. Según un aspecto particular de la invención, la composición comprende por lo menos 10⁹ UFC de la cepa de *Lactobacillus crispatus*. El término "UFC" significa "Unidad que forma colonia" y es la unidad de medición reconocida generalmente por el experto en la materia para cuantificar las bacterias capaces de fundar una colonia.

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 se liofiliza en un medio que comprende unos constituyentes adicionales, que se añadirán antes o después de la etapa de liofilización.

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.

Según un aspecto particular de la invención, la composición está en forma de polvo, que se puede colocar en una cápsula, o que se puede integrar en cualquier tipo de vehículo apropiado, tal como una crema o una composición nutracéutica.

En particular, esta composición puede comprender los principios activos siguientes: unas hormonas y/o unos agentes antiinflamatorios y/o unos agentes bactericidas y/o unos agentes antifúngicos. El experto en la materia sabrá determinar cuáles son los principios activos que pueden acoplarse ventajosamente a la cepa *Lactobacillus crispatus IP174178*.

Según un aspecto preferido de la invención, la composición comprende tiosulfato de sodio, preferentemente a una concentración de por lo menos 100 mg/gramo de polvo que comprende entre 10⁸ y 10¹⁰ UFC de

Lactobacillus crispatus IP174178. Los ejemplos siguientes ilustran una composición denominada "Formulación A" que comprende 113 g/l de tiosulfato de sodio antes de la liofilización, y al final 230 mg de tiosulfato de sodio/g de polvo. La presencia de tiosulfato de sodio permite potenciar el efecto anti-patógeno de la cepa IP174178 (véase la tabla 6C).

5

La composición según la invención puede comprender también otras cepas de lactobacilos.

10

Según la invención, la composición farmacéutica se puede formular para una administración por vía vaginal o por vía oral. En particular, las bacterias destinadas a ser administradas por vía oral se ensayaron por su resistencia a la bilis, su resistencia a los pH ácidos y por su capacidad de crecimiento en presencia de bilis. La cepa IP174178 de la invención presenta estas características que le permiten ser administrada por vía oral.

15

Para unas composiciones farmacéuticas para administración oral, las formulaciones apropiadas son en particular los comprimidos, las cápsulas, los polvos, los gránulos, las soluciones y las suspensiones orales.

Para composiciones farmacéuticas para administración vaginal, las formulaciones apropiadas son en particular las cremas, las cápsulas, así como los supositorios, óvulos o tampones vaginales.

20

La composición según la invención es destinada en particular a ser utilizada en el tratamiento de infecciones genitales y urogenitales, tales como vaginosis y candidiasis.

25

Se entiende por "vaginosis" un desequilibrio de la flora microbiana de la vagina. Se caracteriza por la desaparición de los lactobacilos y la multiplicación de gérmenes patógenos tales como se han enumerado anteriormente.

Se entiende por "candidiasis" una infección vaginal causada por levaduras del género *Cándida*.

30

Estas infecciones están relacionadas con la presencia de patógenos, en particular que pertenecen a la familia de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, microplasma o *Mobiluncus*.

Candida albicans es la especie de levadura más importante y más conocida del género *Cándida*. Provoca unas infecciones fúngicas (candidosis, también denominada candidiasis) esencialmente a nivel de las mucosas digestivas y genitales.

35

Gardnerella vaginalis es una bacteria que se presenta como unos bastoncillos pleomorfos o cocobacilos. Es una bacteria que se encuentra frecuentemente en casos de vaginosis (vaginitis no específica), o bien como único germen patógeno, o bien en asociación con otras bacterias. Produce una toxina perforante que afecta sólo a las células humanas.

40

El término micoplasmas designa una familia de más de 100 especies de bacterias, que son insensibles a las familias de antibióticos que tienen como diana las paredes celulares (penicilina o betalactamas). En particular, la *Mycoplasma genitalium* es responsable de infecciones genitales y urogenitales (uretritis, cervicitis, vaginitis, salpingitis) y de problemas de esterilidad.

45

Mobiluncus es una bacteria gram positiva, anaerobia, encontrada frecuentemente asociada a *Gardnerella vaginalis* en vaginitis bacterianas.

50

La invención se refiere también a una composición nutracéutica que comprende la cepa *Lactobacillus crispatus* IP174178. Una composición nutracéutica de este tipo se presentará en forma de una composición alimenticia o de un complemento alimenticio.

55

Una composición alimenticia estará compuesta por la cepa *Lactobacillus crispatus* IP174178, preferentemente liofilizada, mezclada con productos alimenticios tales como productos lácteos, materias grasas, productos a base de cereales, dulces, bebidas.

El complemento alimenticio se puede presentar en particular en forma de cápsulas o de cápsulas blandas de gelatina o materia vegetal, en el marco de la presente invención.

60

La invención se refiere también a un dispositivo médico que comprende una de las composiciones tales como se han descrito anteriormente, pudiendo este dispositivo médico ser en particular un tampón vaginal, una espátula, una toalla higiénica, un jabón para uso íntimo, etc.

65

La invención se refiere también a la utilización de la cepa aislada *Lactobacillus crispatus* IP174178, para la prevención y el tratamiento de infecciones genitales y urogenitales tales como las vaginosis y las candidiasis.

Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas óptimas de las composiciones según la

invención se pueden determinar según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico adaptado a un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados. La cepa aislada *Lactobacillus crispatus* IP174178 se utilizará al mismo tiempo en administración local (vaginal) o en administración oral, considerándose los dos tipos de administración solos o en combinación.

Según otro aspecto de la invención, la cepa aislada *Lactobacillus crispatus* IP174178 se utiliza para mantener una flora vaginal beneficiosa en una mujer que no presenta infecciones.

Según también otro aspecto de la invención, la cepa aislada *Lactobacillus crispatus* IP174178 se utiliza para la restauración de una flora vaginal beneficiosa tras un tratamiento antibiótico.

La invención se refiere por lo tanto a una composición farmacéutica que comprende la cepa aislada *Lactobacillus crispatus* IP174178, para su utilización en el mantenimiento o la restauración de una flora vaginal beneficiosa.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación gráfica en forma de dendrograma de la comparación de los perfiles genotípicos por rep-PCR.

Figura 2: Representación gráfica en forma de matriz de similitud de la comparación de los perfiles genotípicos por rep-PCR.

Figura 3: Ensayo de adherencia de la cepa IP174178 a células epiteliales vaginales.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Aislamiento y selección de la cepa *L. crispatus* IP174178

Se han aplicado siete ensayos a 10 cepas aisladas a partir de mujeres sanas, y pre-seleccionadas por su capacidad para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estos ensayos son: el crecimiento en medio MRS (Man JC *et al.*, 1960) modificado, la capacidad para producir H₂O₂, la capacidad para producir ácido láctico, la adhesión a células de línea vaginal, la capacidad para inhibir algunos patógenos genitales (método de los discos inhibidos) y la resistencia al metronidazol.

Después de estos primeros ensayos, tres cepas identificadas como particularmente interesantes, en particular por su importante producción de H₂O₂ y de ácido láctico, fueron objeto de un ensayo de crecimiento en presencia de glicógeno, teniendo la cepa IP174178 solamente la capacidad de utilizar el glicógeno como fuente de carbono, que es un sustrato endógeno segregado por la mucosa vaginal. Esta cepa presenta por otro lado el mejor crecimiento en presencia de bilis.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 1 - Último ensayo de selección de la cepa IP174178

Cepa de referencia	Porcentaje de adhesión a las células epiteliales	Crecimiento en presencia de glicógeno	Crecimiento en presencia de bilis
PB 0040	37%	-	+
IP 174178	58%	++	++
PB 0042	62%	-	+

Ejemplo 2 - Perfil bioquímico

Los perfiles bioquímicos se obtienen a partir del equipo VITEK II compact (Biomérieux) que es un mecanismo para la identificación bacteriana por comparación de las capacidades de fermentación de azúcares específicos. Se obtiene el perfil bioquímico siguiente: 11033303414010.

Tabla 2. Perfil bioquímico de la cepa IP174178

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	+	4	dGAL	-	5	ODC	-	6	PheA	+	7	ARG	-	8	PVATE	-
9	BGAL	-	10	PYRA	-	11	SUCT	-	12	TyrA	+	13	dGLU	+	17	BGLU	-
18	dMAL	+	19	dMAN	+	21	BXYL	-	22	O/129 R	+	23	ProA	+	26	LIP	-
27	AMAN	-	30	dMLZ	-	31	URE	-	33	SAC	+	35	dTRE	+	36	CIT	-
37	BGURi	-	40	ILATk	-	41	AGLU	+	43	dSOR	+	44	AGAL	-	46	GlyA	-

Detalles bioquímicos																	
47	dMLT	-	50	dRIB	-	51	MTE	+	52	IGLM	-	53	OPS	(+)	54	BdFUC	-
56	CMT	+	59	2KG	-	61	ESC	-	62	ELLM	-	64	dXYL	-			

Ejemplo 3 - Perfil genotípico

5 El perfil genotípico de la cepa *IP174178* se ha establecido sobre el equipo DIVERSILAB (Biomérieux). Corresponde a la amplificación del ADN dentro de secuencias repetitivas no codificantes del genoma. La disposición y el tamaño de estos fragmentos son únicos para cada cepa y permiten así establecer unos perfiles únicos para cada una de ellas: véase la figura 1.

10 Se ha comparado entonces este perfil rep-PCR con el de las 26 cepas de *Lactobacillus crispatus*, entre ellas 11 cepas conservadas en el Instituto Pasteur con el fin de asegurar el carácter único de la cepa (véase la figura 2). La cepa *IP174178* comprende cada vez unas fuertes diferencias, prueba de su unicidad.

15 Además, la cepa *IP174178* es capaz de crecer sobre glicógeno solo, lo cual presenta una ventaja para su implantación en la mucosa vaginal, y presenta un fuerte porcentaje de producción de H₂O₂ y de ácido láctico.

Ejemplo 4 - Secuenciación e identificación de oligonucleótidos específicos

20 La secuenciación de la cepa *IP174178* se realizó mediante la técnica 454 ROCHE. Tras este trabajo, se ha realizado una anotación. Al final, se han identificado 1982 genes codificante para proteínas.

Tabla 3. Genes anotados en la cepa IP174178

Nombre de cepas anotadas	Proteínas conocidas	Proteínas hipotéticas		Total
		No específicas	Específicas	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1439	75	468	1982

25 La operación de secuenciación ha permitido llevar a cabo un trabajo complementario de biología molecular sobre la cepa con el fin de definirle unos pares de cebadores PCR específicos.

30 Al final, se han apartado tres cebadores PCR y son específicos de la cepa durante una amplificación que comprende 30 ciclos. Estos cebadores permiten identificar fácilmente y de manera muy específica la cepa de *L. crispatus IP174178* en una muestra biológica, por ejemplo.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores PCR específicos de la cepa IP174178

Nombre	Número de secuencia	Secuencia	sentido
Contig00070	SEC ID N°2	CAACAGGCATCCCTAAGTCT	sentido
	SEC ID N°3	CAACGTCTTCAGACCACATC	anti sentido
Contig00074	SEC ID N°4	TCTGCCTCATGTAGATCCAA	sentido
	SEC ID N°5	GCTCCATCTTTAAGACCCAA	anti sentido
Contig00145	SEC ID N°6	AAGTGTTATGGGCCTAGTCG	sentido
	SEC ID N°7	GCCACCACTTTTGCTTTAAT	anti sentido

Ejemplo 5 - Preparación de la "formulación A"

35 La cepa *IP174178* se cultiva en el medio siguiente:

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

40 Después de la inoculación del medio de cultivo, la fermentación se mantiene a una temperatura de 37°C por un dispositivo termostatado apropiado durante 48 a 72 horas. Al final de la fermentación, el cultivo, que alcanzó una numeración superior o igual a 10⁸ UFC/ml, se vierte en un recipiente de mezclado. El cultivo se agita fuertemente para romper la cuajada y se añaden los adyuvantes de liofilización siguientes: 110 g/l de leche, 101,5 g/l FOS, 9,5 ml/l de glutamato de sodio, 5,25 g/l de ácido ascórbico, 113 g/l de tiosulfato de sodio.

45 La liofilización se realiza después según las condiciones clásicas bien conocidas por el experto en la materia: las bacterias se reparten asépticamente en bandejas de acero inoxidable, se congelan rápidamente a -40°C, y después se someten a una operación de sublimación a -22°C. Se realiza después un horneado a 37°C.

50 El producto resultante se tritura después y se tamiza bajo atmósfera controlada. El polvo obtenido se puede mezclar ventajosamente con un 1% de estearato de magnesio con el fin de facilitar el llenado de las cápsulas/cápsulas duras.

El polvo así obtenido se reparte en unas cápsulas blandas de tamaño nº 0 a razón de 350 mg de polvo por cápsula dura.

5 **Ejemplo 6 - Características funcionales de la cepa IP174178 y de la "formulación A"**

Las cepas identificadas IP174178 sola o en su "formulación A" tal como se presenta en el ejemplo 5, se han ensayado en paralelo para determinar sus características funcionales.

10 A continuación en los ejemplos, se entiende por "cepa pura" o "cepa sola" o "cepa IP174178" la cepa IP174178 sin ningún adyuvante, y en particular sin los compuestos de la formulación A, procedente de colonias aisladas sobre gelosa después de la conservación en criotubo en un medio de conservación clásico.

15 Actividades antimicrobianas

Puesta en evidencia de la producción de peróxido de hidrógeno:

20 Las bacterias lácticas se cultivan en un medio MRS gelosado adicionado con vitamina B12, con peroxidasa y con tetrametilbenzidina. Después de la incubación durante 48h en anaerobiosis, las cajas se ponen en contacto con el oxígeno ambiente y las colonias que producen peróxido de hidrógeno se vuelven azules rápidamente. Una escala arbitraria de 0 a 5 permite anotar la intensidad de la producción de H₂O₂.

Tabla 5. Características funcionales de la cepa IP174178

	Producción de H ₂ O ₂	Producción de ácido láctico en g/litro	
		Glucosa fuente	Glicógeno fuente
Formulación A	5	D-LACT: 3,69 L-LACT: 4,88	D-LACT: 3,91 L-LACT: 4,74
Cepa IP174178	5	D-LACT: 5,90 L-LACT: 3,10	D-LACT: 5,65 L-LACT: 3,16

25 Los resultados detallados antes ilustran que:

- * la producción de peróxido de hidrógeno es máxima según la escala arbitraria utilizada;
- 30 * la cepa utiliza de manera casi-equivalente, tanto con glucosa como glicógeno, las vías metabólicas que permiten la síntesis de los D- y L-lactatos. Ahora bien, el glicógeno es una de las principales fuentes de carbono en medio vaginal, por lo tanto, esta cepa posee las propiedades necesarias para la producción de ácido láctico *in vivo*.

35 Inhibición del crecimiento de *C. albicans* y de *G. vaginalis*

Objetivo: Evaluar la capacidad de cepas de lactobacilos para inhibir el crecimiento de una cepa patógena: *Candida albicans*; se aplica el mismo protocolo para *G. vaginalis*, adaptado a este patógeno.

40 Descripción del protocolo:

Seguir el crecimiento de los patógenos solos y en presencia de un cultivo de una cepa de lactobacilos con determinación del título de T0 a T28h.

45 Medios de cultivo utilizados para la preparación de los inoculados y lectura de los títulos:

- caldo Sabouraud y gelosa Sabouraud para *Candida albicans* (a 37°C)
- caldo/gelosa de MRS para las cepas de lactobacilos.

50 El caldo de cultivo del ensayo es una mezcla homogénea del medio de cultivo del patógeno y del medio de cultivo del probiótico.

Preparación del ensayo:

55 Preparación de los inoculados:

- *Candida albicans*: cultivo sobre caldo Sabouraud - 0,3 ml en 30 ml a 37°C durante 48h.
- Cepa probiótica:

* Formulación A: se coloca 0,35 g de polvo de formulación A en 10 ml de caldo MRS - en horno a 37°C durante 48h.

5 * cepa pura IP174178: 0,2 ml de cepa pura, procedente de colonias aisladas sobre gelosa, previamente conservada en criotubo en un medio de conservación, se coloca en 10 ml de caldo MRS - en horno a 37°C durante 48h.

Preparación del control *Candida*:

10 Para la fabricación del control *Candida*, se colocan 5 ml de caldo Sabouraud inoculado con la cepa patógena (título próximo de 1,108 UFC/ml) y 5 ml de caldo MRS no inoculado.

Puesta en contacto de los inoculados:

15 Colocar 5 ml de la cepa patógena con 5 ml de la cepa según la invención en estas diferentes configuraciones.

20 Se realizan las extracciones y las determinaciones del título a T0, T4h, T24h y T28h. Los resultados se expresan en UFC/ml. La concentración en UFC a T0 ciertamente no es la misma en los tres casos comparados (esto se debe a las condiciones de trabajo) pero los valores en T0 son del mismo tipo de magnitud, de manera que la diferencia no tiene ningún efecto sobre el resultado.

Tabla 6A. Inhibición *Candida albicans*

	Tiempo de contacto en horas			
	0	T4h	T24h	T28h
Cepa pura IP174178	$1,24 \cdot 10^7$	$7,87 \cdot 10^6$	$1,40 \cdot 10^6$	$4,60 \cdot 10^5$
Formulación A	$5,43 \cdot 10^6$	$5,47 \cdot 10^6$	0	0
Control <i>Candida albicans</i>	$6,20 \cdot 10^6$	$9,72 \cdot 10^6$	$1,72 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^7$

25 Tabla 6B. Inhibición *Gardnerella vaginalis*

	Tiempo de contacto en horas			
	0	T4h	T24h	T28h
Cepa pura IP174178	$1,53 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^6$	0	0
Formulación A	$3,87 \cdot 10^6$	$6,73 \cdot 10^1$	0	0
Control <i>Gardnerella vaginalis</i>	$6,33 \cdot 10^7$	$3,83 \cdot 10^7$	$6,71 \cdot 10^7$	$5,05 \cdot 10^7$

30 Tabla 6C - Inhibición *Candida albicans* - influencia de la concentración en tiosulfato de sodio en la formulación de la cepa IP174-178

Se ha preparado una formulación A1 y una formulación A2 procediendo como para la formulación A, con la diferencia de que la formulación A1 no contiene tiosulfato de sodio y que la formulación A2 contiene sólo 50 g/l. La inhibición del crecimiento de *C. albicans* se ha medido en los tres casos.

	Disminución en log ₁₀		
	4h	24h	28h
Formulación A1 (0 g/l tiosulfato)	0	1	2
Formulación A2 (50 g/l tiosulfato)	0	3	3
Formulación A (113 g/l tiosulfato)	0	6	7

35 En esta tabla, los resultados se expresan como la disminución logarítmica decimal (log₁₀) del número de UFC entre la numeración a T0 y en los diferentes puntos de extracción (T4h, T24h y T28h).

40 Los resultados presentados anteriormente, en las tablas 6A-6C indican que:

* la inhibición del crecimiento del patógeno *C. albicans* es real a partir de 24h, ya sea por la cepa pura o por la cepa en formulación A. Sin embargo, sólo la formulación A permite una inhibición completa al cabo de 24 horas.

45 * la inhibición del crecimiento del patógeno *G. vaginalis* es completa al cabo de 24 horas de co-cultivo, en presencia de la cepa sola o en su formulación A; la inhibición del crecimiento del patógeno es, no obstante, más rápida con la cepa en su formulación A (a partir de 4h).

50 * la presencia de tiosulfato de sodio en la formulación A permite potencializar el efecto anti-patógeno de la cepa IP174178. En efecto, cuando más importante sea la concentración de tiosulfato de sodio, más fuerte

será la inhibición observada a 24h.

Resistencias gástricas

5 Según los individuos y sobre todo el momento del día, el pH gástrico varía entre 2,5 y 5. La resistencia de la cepa IP174178, sola o en la formulación A, se ha ensayado en medios a pH=2,5, 3 y 4. Los resultados se expresan en disminución de la cantidad de bacterias, a lo largo del tiempo.

10 Tabla 7. Resistencia de la cepa sola o en su formulación A, a pH bajos

	Resistencia a pH 2,5 Reducción en Log10		Resistencia a pH 3 Reducción en Log10		Resistencia a pH 4 Reducción en Log10	
	45 min	90 min	45 min	90 min	45 min	90 min
Formulación A	-1,12 log	-4,36 log	-0,18 log	-0,72 log	-0,02 log	-0,15 log
Cepa IP174178	-0,73 log	-2,59 log	-0,51 log	-0,58 log	-0,68 log	-0,80 log

Los resultados muestran que, al cabo de 90 minutos, a pH=3 o 4, la pérdida de bacterias es débil, de menos de un logaritmo 10. La resistencia a pH=2,5 es más baja, en particular cuando la cepa se utiliza en su formulación A.

15 La resistencia a la bilis también se ha ensayado, a lo largo del tiempo (60, 120, 180 y 240 minutos), en presencia de un 3% de bilis. Los resultados se expresan comparando la cantidad de bacterias supervivientes en el medio control sin bilis, y en el medio que comprende un 3% de bilis.

20 Tabla 8. Resistencia de la cepa sola o en su formulación A, a la presencia de bilis

Presencia de un 3% de bilis en el medio de cultivo	Comparación medio sin bilis/medio con bilis en log decimal				
	0	60 mn	120 mn	180 mn	240 mn
Cepa pura IP174178	-0,46	-0,50	-0,54	-0,63	-0,86
Formulación A	-0,56	-0,66	-0,58	-0,68	-0,79

Al cabo de 240 minutos, es decir 4 horas, la diferencia entre el control cultivado sin bilis y el medio con bilis es de menos de un logaritmo decimal, lo cual significa que el crecimiento de la bacteria IP174178 está poco afectado por la presencia de bilis.

25 Resistencia a los antibióticos

Tabla 9. Resistencia a los antibióticos de la cepa sola o en su formulación A

Antibióticos ensayados	Formulación A	Cepa pura IP174178	Antibióticos ensayados	Formulación A	Cepa pura IP174178
Tetraciclina	Sensible	Sensible	Ácido nalidíxico	Resistente	Resistente
Colistina	Resistente	Resistente	Eritromicina	Sensible	Sensible
Ácido fusídico	Resistente	Resistente	Polimixina	Resistente	Resistente
Cloramfenicol	Sensible	Sensible	Ácido pipemídico	Resistente	Resistente
Estreptomicina	Resistente	Resistente	Clindamicina 25 µg	Sensible	Sensible
Trimetoprim sulfametoxazol	Resistente	Resistente	Clindamicina 2 µg	Sensible	Sensible
Metronidazol 50 µg	Resistente	Resistente			

30 Los genes siguientes, conocidos por estar implicados en la resistencia a los antibióticos enumerados en la tabla 10 siguiente, se han identificado como expresados en la cepa *L. crispatus*:

Antibióticos		<i>L. crispatus</i> IP174178
Familia	Nombre	
Aminoglicósido	Gentamicina	<i>aac3</i>
	Neomicina	
	Kanamicina	
	Estreptomicina	
Diaminopirimidina	Trimetoprima	<i>dfrA</i>
Fusidánina	Ácido fusídico	<i>fusA</i>
Quinolona	Ácido nalidíxico	<i>gyrA,norA</i>
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	<i>gyrA,norA</i>

Adhesión a las células epiteliales vaginales CRL-2616

Los resultados se presentan en la figura 3, y se refieren sólo a la cepa única *IP174178*.

- 5 A lo largo del tiempo, el porcentaje de adhesión de las bacterias *IP174178* a las células CRL-2616 aumenta y alcanza el 15% de adhesión al cabo de 3 horas, cuando la multiplicidad de la infección es de 10 o 1.

Referencias

10 Documentos de patente

- WO 84/04675
WO 2000/035465
WO 2006/045475
15 US 2002/0044926
US nº 6.093.394
US nº 6.468.526
US nº 7.807.440
US 2010/0151026
20 EP 0 949 330
EP 1 824 500
EP 1 812 023
EP 1 427 808
EP 1 011 721

25 Documentos de bibliografía científica

- Martin R, Soberón N, Vaneechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Suárez JE. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol.* Dic 2008; 11 (4):261-6.
30 Antonio, MAD, SE Hawes, y SL Hillier. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* (1999) 180: 1950-1956.
Man J.C., de Rogosa M. y Sharpe, ME. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, *Appl. Bact.* (1960) 23, 130-135
35

Listado de secuencias

- <110> SPMD
40 <120> Nueva cepa de *Lactobacillus crispatus*
<130> D30896
45 <150> FR 1256569
<151> 2012-07-09
<160> 7
50 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 1061
<212> ADN
55 <213> *Lactobacillus crispatus*
<400> 1

ES 2 647 833 T3

```

agccatgca caccctgtctt agcgtccccg aagggaactt tgtatctcta caaatggcac      60
tagatgtcaa gacctggtaa gtttcttcgc gttgcttcga attaaaccac atgctccacc      120
gcttgtgcgg gccccgtoa attcctttga gtttcaacct tgcggtcgta ctccccagge      180
ggagtgccta atgcgtagc tgcagcaactg agaggcggaa acctcccaac acttagcact      240
catcgtttac ggcatggact accagggtat ctaatctctg tcgctacca tgctttcgag      300
cctcagcgtc agttgcagac cagagagccg ccttcgccac tgggtttctt ccatatatct      360
acgcattcca ccgctacaca tggagtcca ctctctctt ctgcaactca gaaaaacagt      420
ttccgatgca gttcctcggg taagccgagg gctttcacat cagacttatt cttccgctg      480
cgctcgcttt acgcccaata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcgctg      540
ctggcacgta gttagccgtg actttctggt tgattaccgt caaataaagg ccagttacta      600
cctctatcct tcttcaccaa caacagagct ttacgatccg aaaaccttct tcaactcagc      660
ggcgttgctc catcagactt gcgtccattg tggaagattc cctactgctg cctcccgtag      720
gagtttgggc cgtgtctcag tcccaatgtg gccgatcagt ctctcaactc ggctatgcat      780
catgccttg gtaagccttt accttaccaa ctagctaag caccgcgggg ccattccata      840
gcgacagctt acgcccctt ttaaaagctg atcatgcgat ctgctttctt atccggtatt      900
agcacctgtt tccaagtggg atcccagact atggggcagg ttccccacgt gttactcacc      960
catccgcgc tcgctttctt aagtcatta ccgaagtaaa tctgttagtt ccgctcgtc      1020
gacttgcatg tattaggcac gccgccagcg ttcgtctctga g                                1061

```

5 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 2

caacaggcat ccctaagtct 20

15 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 3

25 caacgtcttc agaccacatc 20

30 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

35 <400> 4

tctgcctcat gtagatccaa 20

ES 2 647 833 T3

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 5
 10 gctccatctt taagaccaa 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20
 <400> 6
 aagtgttatg ggcctagtcg 20
 25 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 7
 35 gccaccactt tgctttaat 20

REIVINDICACIONES

1. Cepa aislada de *Lactobacillus crispatus*, identificada IP174178 y depositada en la CNCM con el número de acceso I-4646.
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende una cepa según la reivindicación 1.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende por lo menos 10⁹ CFU de dicha cepa.
- 10 4. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 2 o 3, que comprende, además, una matriz de conservación y opcionalmente otros principios activos.
- 15 5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende, además, tiosulfato de sodio.
- 20 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, formulada para una administración por vía vaginal o por vía oral.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para su utilización en el tratamiento y la prevención de infecciones genitales y urogenitales tales como las vaginosis y las candidiasis.
- 25 8. Dispositivo médico, en particular tampón vaginal, que contiene una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para su utilización en el tratamiento y la prevención de infecciones genitales y urogenitales tales como las vaginosis y las candidiasis.
- 30 9. Composición nutracéutica que comprende una cepa según la reivindicación 1.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para su utilización en el mantenimiento o la restauración de una flora vaginal beneficiosa.

DENDROGRAMA

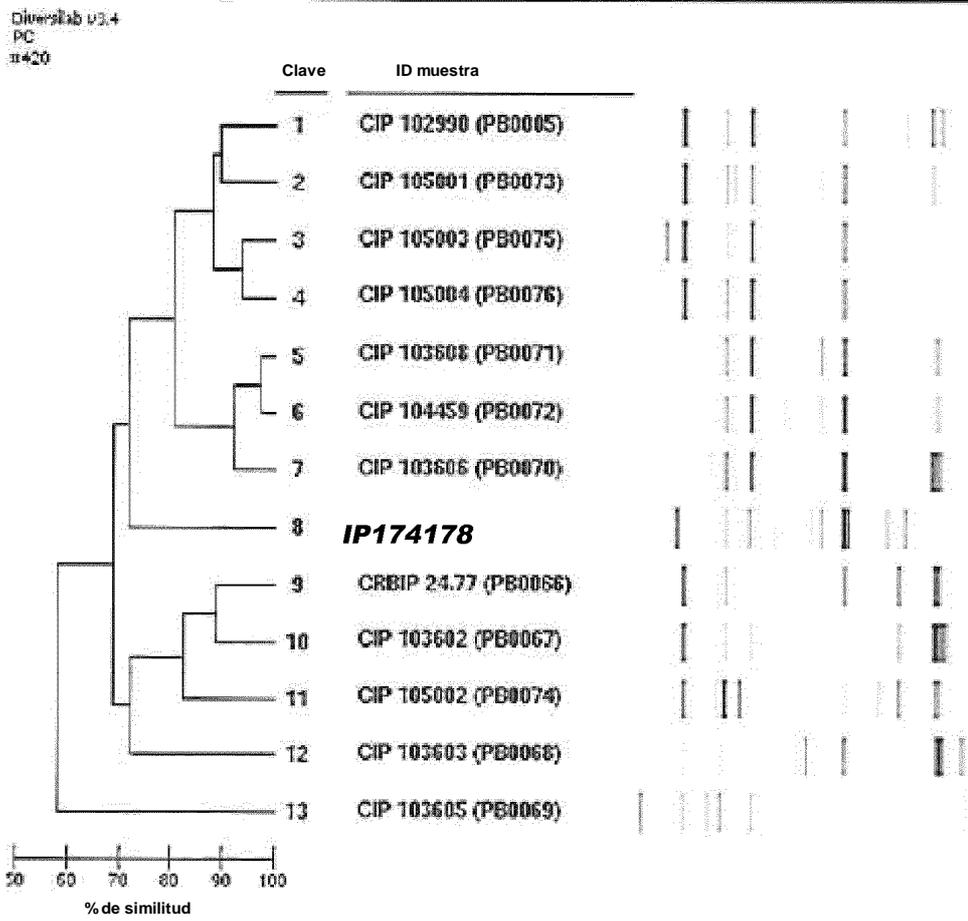


Figura 1

MATRIZ DE SIMILITUD

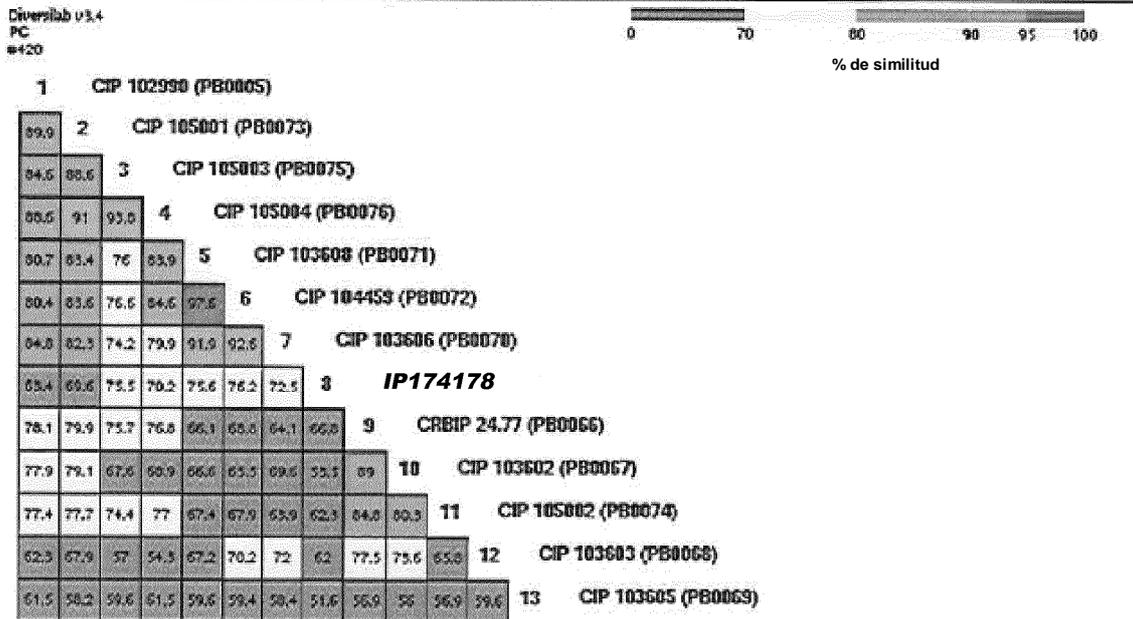


Figura 2

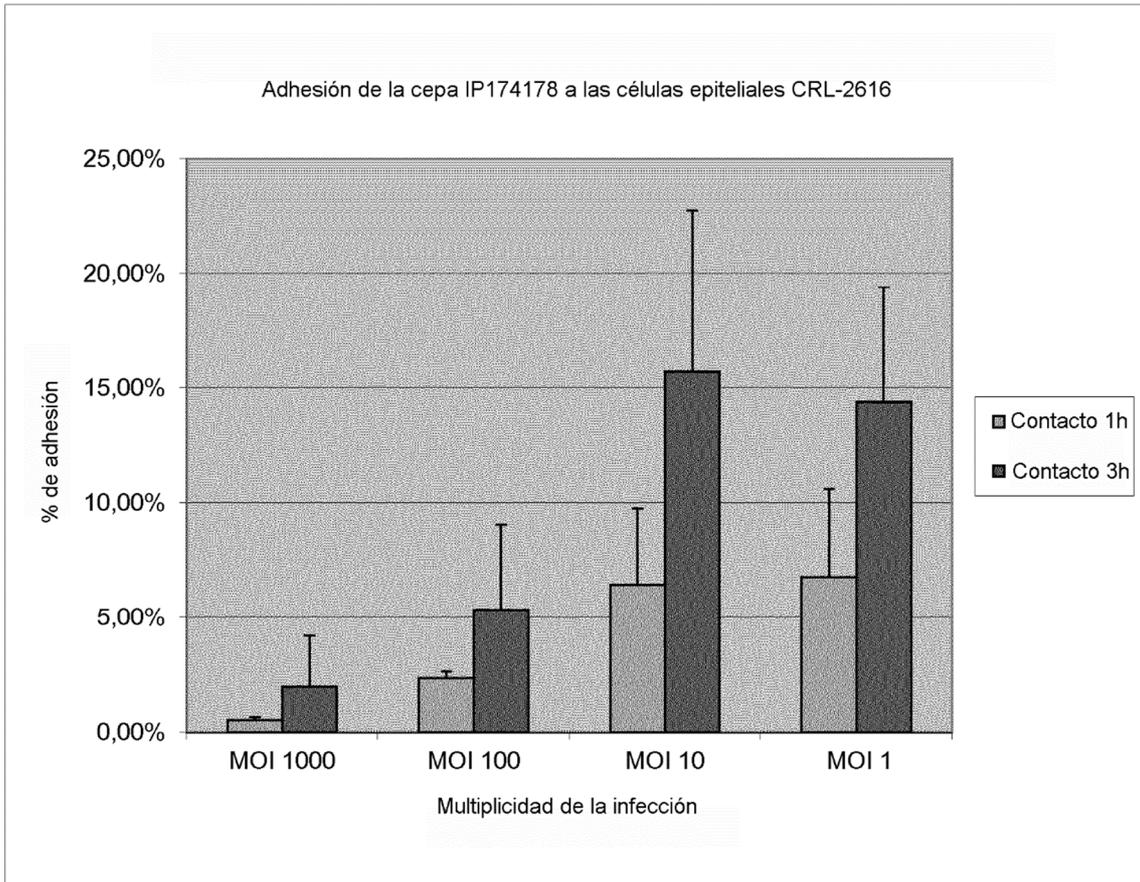


Figura 3